

“Diferenciación celular en el queratinocito epidérmico de caninos durante la carcinogénesis”

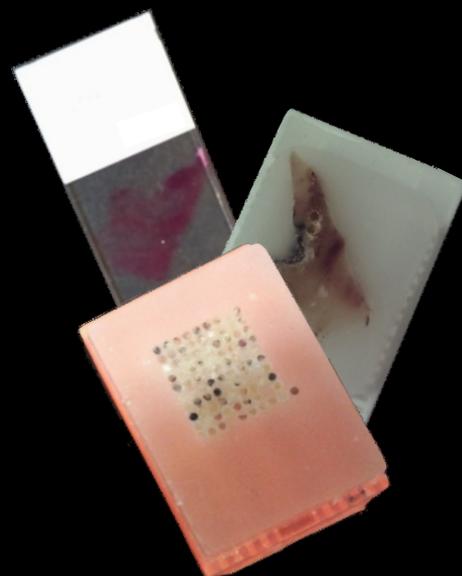
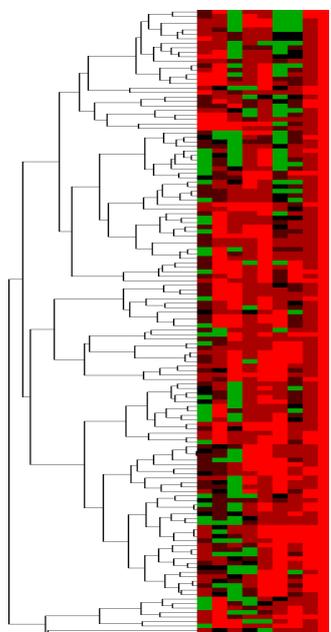
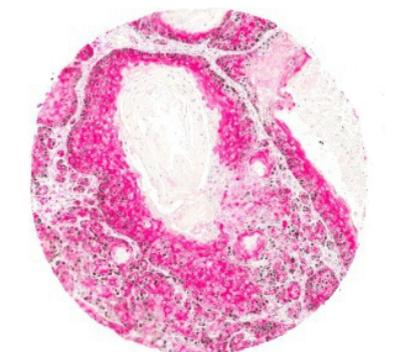
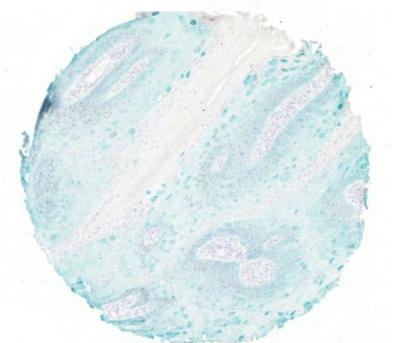
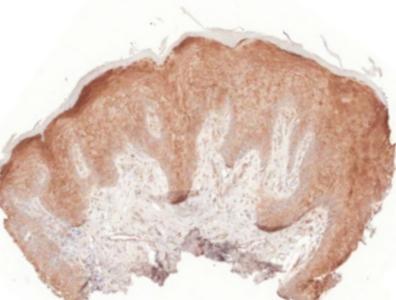
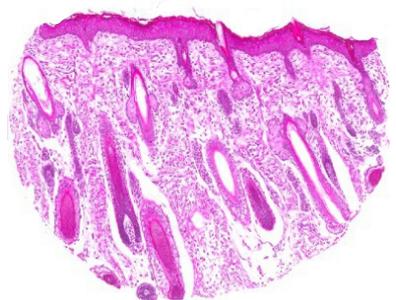
Trabajo de tesis realizado para optar al título de Doctora en Ciencias Veterinarias

Autora
M.V. Sanz Ressel Berenice Liyare

Directora
D.M.V. Massone Adriana Raquel

Codirector
D.M.V. Barbeito Claudio Gustavo

2019



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias

**“Diferenciación celular en el queratinocito epidérmico de
caninos durante la carcinogénesis”**

Trabajo de tesis realizado para optar al título de Doctora en Ciencias Veterinarias

Autora: M.V. Sanz Ressel, Berenice Liyare

Directora

D.M.V. Massone, Adriana Raquel

Codirector

D.M.V. Barbeito, Claudio Gustavo

Lugar De Trabajo

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

Miembros del jurado

D.M.V. Fernández, Patricia

D.M.V. Minatel, Leonardo

D.M.V. Rosciani, Adriana Silvia

2019



Dedicada a mi mamá, Celia Cristina Ressel

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfredo Molinolo le agradezco enormemente las oportunidades brindadas, sus enseñanzas, consejos y el trabajo compartido, ya que permitieron un progreso sustancial en mi formación académica y profesional.

Al Dr. Stephen Hewitt y a Kris Ylaya les agradezco enormemente por enseñarme la técnica de micromatrices de tejidos.

A mis directores, Dr. Claudio Barbeito y Dra. Adriana Massone, les agradezco las oportunidades brindadas, el trabajo compartido, la confianza y la libertad con la que me permitieron desarrollar esta tesis.

Al M.V. Marcelo Duarte y al M.V. Alejandro Blanco les agradezco por sus consejos y el incondicional apoyo.

A los histotecnólogos, Rubén Mario, Lorena Díaz y Carolina Aralda, les agradezco por su valiosa ayuda en el procesamiento de las muestras de tejidos; a Cecilio De Jesús Castro y Oscar Cáceres les agradezco por su ayuda en la búsqueda del material a partir de los archivos del Laboratorio de Patología Especial Veterinaria.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada (LYEDEC). En especial a la Dra. Mónica Diessler y a la Dra. Julieta Carril les agradezco por sus valiosos consejos y buena predisposición ante mis innumerables consultas.

A los organismos que me apoyaron económica y/o institucionalmente: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); LYEDEC, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (FCV, UNLP); Laboratorio de Patología Especial Veterinaria Dr. Bernardo Epstein, FCV, UNLP.

A mi gran compañero, Matías, le agradezco por estar en cada momento durante estos años.

A mi familia, en especial a mis padres Raúl y Celia por su incondicional apoyo a lo largo de mi vida. A mi hermana Shulinen y a mi hermano Kuanip, por sus consejos y el permanente apoyo. A mi abuela Carolina “Carola”.

PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis fueron publicados parcialmente como:

Artículo completo:

- (1) Immunohistochemical expression of selected phosphoproteins of the mTOR signalling pathway in canine cutaneous squamous cell carcinoma. *The Veterinary Journal*, 2019 245:41-48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.12.024>.
- (2) Sanz Ressel B.L., Massone A.R., Barbeito C.G. Uso de la técnica de micromatrices de tejido en histología veterinaria. *Analecta Veterinaria*. 2017;37(1):59-64. DOI: <https://doi.org/10.24215/15142590e008>. Trabajo ganador del premio “Tesis en curso 2015” otorgado por la Secretaria de Ciencia y Técnica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Resumen:

- (1) Sanz Ressel B.L., Massone A.R., Barbeito C.G. E-cadherin and β -catenin expression in cutaneous squamous cell carcinomas of dogs. XX Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología y XVII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, desarrolladas desde el 5 hasta el 7 de diciembre de 2018, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

- (2) Sanz Ressel B.L., Massone A.R., Barbeito C.G. Expresión de p63/CK5 en la epidermis canina normal y neoplásica. XIX Congreso de Ciencias Morfológicas de La Plata 17^{avas} de educación, desarrollado el 25 y 26 de octubre de 2018 en La Plata, Buenos Aires, Argentina.
- (3) Sanz Ressel B.L., Massone A.R., Barbeito C.G. Potencial implicancia terapéutica de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR independientemente de la activación del EGFR en carcinomas de células escamosas cutáneos en caninos. Trabajo ganador del segundo premio “Mejor trabajo de investigación científica”. XVIII Congreso Nacional de AVEACA, 4 y 5 de octubre 2018 en Buenos Aires, Argentina.
- (4) Sanz Ressel, B.L., Barbeito, C.G., Massone, A.R. Activación persistente de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTOR en papilomas cutáneos caninos. XI RAPAVE Reunión Argentina de Patología Veterinaria 2018, desarrollada el 8, 9 y 10 de agosto del 2018 en la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- (5) Sanz Ressel B.L., Barbeito C.G., Massone A.R. Estudio retrospectivo de las neoplasias de la epidermis interfolicular en caninos: aspectos epidemiológicos. X Reunión Argentina de Patología Veterinaria 2016 y 10^{mo} Seminario de la Fundación Charles Louis Davis en Argentina, desarrollada el 24, 25 y 26 de agosto de 2016 en Esperanza, Santa Fe, Argentina.
- (6) Sanz Ressel B.L., Barbeito C.G., Massone A.R. Uso de la técnica de micromatrices de tejido en histología veterinaria. Libro de resúmenes del XVII Congreso de la Sociedad de Ciencias Morfológicas de La Plata y las 14^o Jornadas de Educación, desarrollada el 10 y 11 de septiembre de 2015 en La Plata, Buenos Aires, Argentina.

- (7) Sanz Ressel B.L., Barbeito C.G., Massone A.R. 2014. Diferenciación celular en el queratinocito epidérmico de caninos durante la ontogenia y la carcinogénesis. Aspectos básicos y proyecciones aplicables en el diagnóstico y pronóstico de las neoplasias de la epidermis interfolicular. *Analecta Veterinaria*, 34 (1-2): 82.

“La ciencia, la técnica y la investigación son la base de la salud, bienestar, riqueza, poder e independencia de los pueblos modernos.”

Bernardo Houssay

ÍNDICE

Resumen	XI
Abstract	XIII
Capítulo I. Introducción	1
I.1. Moléculas de señalización celular en la epidermis normal y neoplásica	5
I.1.1 <i>EGFR</i>	5
I.1.2. Vía de señalización <i>PI3K/Akt/mTOR</i>	7
I.1.3. <i>YAP</i>	9
I.1.4. β -catenina	10
I.1.5. E-cadherina	11
I.1.6. p63/CK5	12
I.2. Objetivos	13
I.3. Hipótesis	13
Capítulo II. Materiales & Métodos	14
II.1. Muestras de tejido	14
II.2. Diseño y construcción de las micromatrices de tejidos	15
II.3. Inmunohistoquímica	16
II.3.1. Inmunohistoquímica	16
II.3.2. Inmunohistoquímica doble color	18
II.4. Análisis cualitativo y cuantitativo	20

Tesis Doctoral - Berenice Liyare Sanz Ressel	IX
II.5. Análisis estadístico	20
II.6. Análisis de agrupamiento jerárquico	21
Capítulo III. Resultados	22
III.1. Información clínica	22
III.2. Calidad de las micromatrices de tejido	23
III.3. <i>EGFR</i>	25
III.4. La vía de señalización <i>PI3K/Akt/mTOR</i>	29
III.5. <i>YAP</i>	37
III.6. β -catenina	40
III.7. E-cadherina	44
III.8. p63/CK5	47
III.9. Análisis de agrupamiento jerárquico	51
Capítulo IV. Discusión	53
IV.1. <i>EGFR</i>	53
IV.2. Vía de señalización <i>PI3K/Akt/mTOR</i>	56
IV.3. <i>YAP</i>	61
IV.4. β -catenina	64
IV.5. E-cadherina	67
IV.6. p63/CK5	70
Capítulo V. Conclusiones	74
Bibliografía	77
Anexo Tablas	94
Tabla 1	95
Tabla 2	96

Tabla 3	97
Tabla 4	98
Tabla 5	102
Tabla 6	103
Tabla 7	104
Tabla 8	105

ABREVIATURAS

CCEC: carcinoma de células escamosas cutáneo

CK5: citoqueratina 5

H-E: hematoxilina-eosina

EGFR: epidermal growth factor receptor

EN: epidermis normal

EPN: epidermis preneoplásica

GSK3 β : *glycogen synthase kinase*

NEIF: neoplasias de la epidermis interfolicular

MMT: micromatrices de tejidos

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

PC: papiloma cutáneo

pAkt^{Thr308}: *phosphorylated Akt in Thr308*

pAkt^{Ser473}: *phosphorylated Akt in Ser473*

PBS: *phosphate buffered saline*

pEGFR^{Tyr1068}: *phosphorylated EGFR in Tyr1068*

PI3K: *phosphatidylinositol-3-Kinase*

PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato

pS6^{Ser235/236}: *phosphorylated S6 in Ser235/236*

PTEN: *phosphatase and tensin homolog*

TBS: *tris-buffered saline*

TSC1/TSC2: *tuberous sclerosis complex1/2*

QA: queratosis actínica

YAP: *yes-associated protein*

RESUMEN

La epidermis está expuesta a agresiones ambientales sostenidas tales como la radiación ultravioleta, los carcinógenos químicos y las infecciones virales. Como resultado, el queratinocito epidérmico tiene un riesgo aumentado de adquirir alteraciones genéticas y epigenéticas que le permitan impulsar la progresión hacia un fenotipo celular tumoral. El tipo de tumor epidérmico que se desarrolle, así como también su comportamiento biológico, será el reflejo de la actividad desregulada de distintas vías de señalización celular. En este sentido, el estudio de los mecanismos moleculares desregulados durante el proceso de carcinogénesis epidérmica en los caninos puede proporcionar dianas terapéuticas adecuadas para el desarrollo de nuevas terapias para los pacientes con neoplasias de la epidermis interfolicular (NEIF). Por lo tanto, el propósito de este estudio fue evaluar el patrón de expresión inmunohistoquímico de diferentes moléculas implicadas en procesos celulares claves (pEGFR^{Tyr1068}, pAkt^{Ser473}, pS6^{Ser235/236}, Ki-67, PTEN, YAP, β-catenina, E-cadherina, CK5 y p63) en muestras de epidermis normal, epidermis preneoplásica, papilomas cutáneos y carcinomas de células escamosas cutáneos de caninos mediante el uso de micromatrices de tejidos. Los resultados demuestran que las moléculas de señalización implicadas en la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR se activan con frecuencia en las NEIF caninas, pero que esta activación puede ser independiente de la activación del EGFR. Además, se encontró la expresión desregulada de YAP, β-catenina y E-cadherina en la mayoría de las NEIF. Finalmente, se demuestra, mediante la evaluación conjunta de p63/CK5, que las células

madre epidérmicas desempeñan un papel importante durante el proceso de carcinogénesis epidérmica. Estos hallazgos demuestran que las NEIF caninas pueden albergar alteraciones complementarias en múltiples moléculas de señalización que convergen para impulsar la adquisición de un fenotipo maligno en los queratinocitos. Esta información emergente proporciona un marco molecular adecuado para el desarrollo de nuevas terapias basadas en objetivos moleculares para los pacientes caninos con NEIF.

Palabras claves: MMT; mTOR; Objetivos terapéuticos; Piel canina; Tumores epidérmicos en perros.

ABSTRACT

The epidermis is subject to sustained environmental assaults, including ultraviolet irradiation, chemical carcinogens, and the entry of viruses. As a result, the epidermal keratinocyte has a high risk of acquiring genetic and epigenetic alterations that allow it to drive the progression towards a specific tumor cell phenotype. The type of epidermal tumor that develops, as well as its biological behavior, will be the reflection of the dysregulated activity of different cell signaling pathways. In this regard, the study of the dysregulated molecular mechanisms during the epidermal carcinogenesis process in dogs can provide adequate therapeutic targets for the development of novel therapies for canine patients with interfollicular epidermal tumors (IFET). Therefore, the purpose of this study was to evaluate the immunohistochemical expression pattern of different molecules involved in key cellular processes (pEGFR^{Tyr1068}, pAkt^{Ser473}, pS6^{Ser235/236}, Ki-67, PTEN, YAP, β -catenin, E-cadherin, CK5 and p63) in samples of normal epidermis, preneoplastic epidermis, cutaneous papillomas and cutaneous squamous cell carcinomas of dogs by using tissue microarrays. The results show that the signaling molecules involved in the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway are frequently activated in canine IFET, but that this activation can be independent of the EGFR activation. Furthermore, the dysregulated expression of YAP, β -catenin and E-cadherin was identified in some IFET. Finally, it is demonstrated, through the evaluation of p63/CK5, that the epidermal stem cells play an important role during the process of epidermal carcinogenesis. These findings show that canine IFET can harbor complementary alterations in multiple signaling molecules

that converge to drive the acquisition of a malignant phenotype in epidermal keratinocytes. This emerging information of the nature of the dysregulated signaling networks in canine IFET can provide a molecular framework for the future development of novel mechanism-based therapies for IFET canine patients.

Keywords: Epidermal tumors in dogs; Canine epidermis; mTOR; TMA; Target therapies.

CAPÍTULO I

Introducción

La epidermis, al ser la capa más externa de la piel, constituye la barrera de protección primaria del organismo frente a factores ambientales tales como la radiación ultravioleta, los carcinógenos químicos y las infecciones virales (Owens y Watt, 2003). El tipo celular predominante de la epidermis, el queratinocito epidérmico, define la estructura de esta barrera a través de un programa de diferenciación terminal (Suter y col., 1997). Durante la diferenciación epidérmica normal, las células madre ubicadas en el estrato basal producen células amplificadoras de tránsito, que se dividen un número limitado de veces para luego retirarse del ciclo celular y comprometerse con la diferenciación terminal (Fuchs y Raghavan, 2002). De este modo, las células en las que ocurre el proceso de diferenciación se desprenden de la lámina basal y se desplazan hacia el exterior a través de los sucesivos estratos epidérmicos -estratos espinoso, granuloso y córneo- para, por último, desprenderse de la superficie de la piel (Fuchs y Raghavan, 2002). Debido a que el crecimiento y la diferenciación de los queratinocitos epidérmicos se excluyen mutuamente, la regulación de la proliferación en estas células está directamente vinculada a la regulación de su diferenciación (Suter y col., 1997).

Como resultado de las agresiones ambientales sostenidas, los queratinocitos epidérmicos tienen un riesgo elevado de adquirir mutaciones potencialmente oncogénicas

(Owens y Watt, 2003). Sin embargo, dado que la mayoría de las células que adquieren mutaciones se pierden a través del proceso normal de diferenciación terminal, solo los residentes a largo plazo de la epidermis, como las células madre basales o su descendencia inmediata, tienen la capacidad de acumular la cantidad de impactos genéticos y epigenéticos necesarios para producir la formación de un tumor epidérmico (Owens y Watt, 2003). El tipo de tumor epidérmico que se desarrolle, así como también su comportamiento biológico, será el reflejo de los cambios genéticos y epigenéticos presentes en el queratinocito epidérmico y, en consecuencia, de la actividad desregulada de distintas vías de señalización celular que le permitirán impulsar la progresión hacia un determinado tipo celular tumoral (Owens y Watt, 2003).

En los caninos, las neoplasias cuyo origen es la epidermis interfolicular (neoplasias de la epidermis interfolicular, NEIF) incluyen al papiloma cutáneo (PC), al carcinoma de células basales cutáneo, al carcinoma basoescamoso cutáneo y al carcinoma de células escamosas cutáneo (CCEC) (Goldschmidt y Hendrick, 2008). Entre estos tumores, cobran particular importancia clínica el PC y el CCEC (Goldschmidt y Goldschmidt, 2016; Miller y col., 2013).

El PC es una lesión proliferativa benigna de la epidermis común en los caninos generalmente asociada con la infección del virus del papiloma canino (*canine papilloma virus*, *CPV*) (Miller y col., 2013). La infección por *CPV* puede ser determinada mediante la observación de coilocitos en los estratos epidérmicos espinoso y granuloso; estas células son queratinocitos alterados por la infección viral, caracterizados por un citoplasma claro y un núcleo picnótico (Gross y col., 2005). Si bien la mayoría de los PCs tienen un comportamiento benigno y sufren una regresión espontánea dentro de los tres meses posteriores a su desarrollo, los PCs múltiples o la falta de regresión espontánea pueden causar problemas graves en algunos pacientes. Asimismo, la progresión del PC a carcinoma de

células escamosas fue informada en caninos en varios estudios (Bregman y col., 1987; Callan y col., 2005; Goldschmidt y col., 2006; Schwegler y col., 1997; Watrach y col., 1970; Zaugg y col., 2005). Aunque diferentes terapias han sido utilizadas para los PCs, la extirpación quirúrgica ha demostrado ser la más efectiva hasta ahora (Lange y Favrot, 2011).

El CCEC representa una de las neoplasias malignas más comunes de la piel de los caninos, en el que las células muestran diversos grados de diferenciación hacia queratinocitos (Goldschmidt y Goldschmidt, 2016; Gross y col., 2005). El desarrollo de los CCECs se ha asociado con varios factores, entre los que cobra particular importancia la exposición crónica al sol, la falta de pigmento en la epidermis y la presencia de una capa de pelo muy escasa en el sitio de desarrollo del tumor (Goldschmidt y Goldschmidt, 2016). Por lo general, los CCECs inducidos por la radiación ultravioleta son precedidos por una lesión pre-neoplásica denominada queratosis actínica (QA) (Gross y col., 2005). Sin embargo, no todos los CCECs son inducidos por la exposición crónica al sol y, en ese caso, pueden situarse en cualquier parte del cuerpo (Gross y col., 2005). Los CCECs son localmente invasivos por lo que producen una infiltración gradual y, en consecuencia, la pérdida de los tejidos subyacentes (Gross y col., 2005). Los informes sobre metástasis son escasos y, en general, refieren a que ocurren en forma tardía en el curso de la enfermedad. Sin embargo, en los CCECs de algunas localizaciones anatómicas, tales como los del lecho ungueal, las metástasis son más frecuentes debido a que estos tumores tienen un comportamiento mucho más agresivo (Goldschmidt y Goldschmidt, 2016; Gross y col., 2005; Miller y col., 2013; Wobeser y col., 2007). Aunque diferentes terapias han demostrado tener éxito contra la enfermedad local, los CCECs quirúrgicamente no resecables, así como los CCECs avanzados, tienen un mal pronóstico (Goldschmidt y Goldschmidt, 2016; Hauck, 2012; Miller y col., 2013).

En este sentido, la investigación dirigida a esclarecer cómo la actividad desregulada de las moléculas de señalización contribuye al desarrollo y progresión de las NEIF en los caninos podría ayudar a identificar objetivos moleculares adecuados para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos en estos pacientes. Sin embargo, una evaluación de la bibliografía evidencia que pocos investigadores se han dedicado al estudio de las vías de señalización involucradas en procesos celulares claves en la epidermis canina normal, así como tampoco al estudio de los procesos desregulados durante el proceso de carcinogénesis epidérmica en esta especie (Bongiovanni y col., 2011; João y col., 2011). De hecho, la información disponible sobre cómo las moléculas involucradas en las vías de señalización regulan los cambios progresivos en el destino celular del queratinocito epidérmico durante la carcinogénesis, desde la proliferación ligeramente desregulada hasta la malignidad completa, se limita principalmente a modelos murinos de carcinogénesis cutánea (Amornphimoltham y col., 2008, 2004; Segrelles y col., 2002; Woodworth y col., 2000; Zanconato y col., 2015; Zhang y col., 2011) y, en menor medida, al estudio de las moléculas de señalización en la epidermis humana normal y neoplásica (Chen y col., 2009; Debaugnies y col., 2018; Einspahr y col., 2012; Jia y col., 2016; Nazmi y col., 1990; Reis-Filho y col., 2002).

Por otra parte, para realizar un aporte de relevancia clínica en oncología es necesario que las moléculas más importantes se evalúen en un gran número de muestras de tejido de diferentes pacientes en condiciones idénticas y estandarizadas. Entre las diferentes tecnologías disponibles para el análisis de múltiples muestras de tejidos en forma simultánea, cobra particular importancia la técnica de micromatrices de tejido embebidos en parafina (MMT) (Hewitt, 2004; Molinolo y col., 2007). Las MMT son plataformas de alto rendimiento construidas mediante la obtención de biopsias cilíndricas a partir de decenas a cientos de bloques de parafina donantes, las cuales son incorporadas en un único bloque de parafina

receptor (Kononen y col., 1998). Por lo tanto, una sección obtenida a partir de esta matriz contiene múltiples muestras de tejido representativas de los diferentes casos, sobre la cual se pueden aplicar las mismas técnicas que se usarían sobre una sección de tejido convencional (Hewitt 2004; Kononen y col., 1998). De este modo, las MMT permiten ahorrar tiempo y materiales, así como también reducir la variabilidad de los experimentos (Hewitt, 2004). Estas ventajas hicieron que la técnica de MMT se convirtiera en una herramienta esencial en el campo de la oncología humana, en la que ha permitido la detección rápida y rentable de biomarcadores de utilidad diagnóstica, pronóstica y predictiva (Hewitt, 2012, 2009; Kononen y col., 1998). Sin embargo, existen relativamente pocos informes sobre el uso de las MMT en medicina veterinaria (Hammer y col., 2007; Higgins y col., 2010; Keller y col., 2007; Khanna y col., 2002; Muscatello y col., 2015; Sanz Ressel y col., 2017; Silva y col., 2016; Wohlsein y col., 2012), y ninguno de estos explora el uso de esta técnica en el estudio de la expresión de las moléculas de señalización relevantes en las NEIF caninas.

I. 1. Moléculas de señalización celular en la epidermis normal y neoplásica

I. 1. 1. *EGFR*

El receptor de factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor receptor*, *EGFR*), es un receptor de superficie celular perteneciente a la familia de receptores con actividad intrínseca de tirosina quinasa (Sibilia y col., 2007). La activación del *EGFR* conduce a su dimerización y, en consecuencia, a la transactivación de los dominios con actividad tirosina quinasa mediante la fosforilación en múltiples residuos de tirosina específicos, entre los que se destaca el residuo 1068 (Downward y col., 1984). Una vez activado, el *EGFR* estimula a distintas vías de señalización descendentes que intervienen en

procesos celulares claves tales como la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos epidérmicos (Sibilia y col., 2007).

La información disponible sobre el patrón de expresión del *EGFR* en la epidermis normal se limita principalmente a los humanos, donde este receptor está localizado fundamentalmente en el estrato basal de células madre proliferativas, para reducir su expresión gradualmente en los sucesivos estratos epidérmicos (Groves y col., 1992; Nanney y col., 1984). Sin embargo, la determinación de la forma fosforilada del *EGFR* en el residuo de tirosina 1068 (*phosphorylated EGFR in Tyr 1068, pEGFR^{Tyr1068}*), que representa la forma activa de este receptor, no fue explorada en la epidermis normal de ninguna especie. En la epidermis normal de los caninos, en particular, tampoco se estudió el patrón de expresión de la forma no fosforilada del *EGFR*.

Respecto a la expresión del *EGFR* durante el proceso de carcinogénesis epidérmica, la sobreexpresión de este receptor se relacionó con el desarrollo de los PCs mediante un modelo murino de carcinogénesis cutánea (Woodworth y col., 2000). De modo similar, la expresión desregulada del *EGFR* fue relacionada con el desarrollo y progresión de los CCECs humanos (Kikuchi y col., 1990; Nazmi y col., 1990). Sin embargo, la determinación de la forma activa del *EGFR* durante la carcinogénesis cutánea no ha sido previamente evaluada en ninguna especie. En este sentido, la información disponible sobre la sobreexpresión del *pEGFR^{Tyr1068}* en carcinomas de células escamosas está limitada a lo informado en carcinomas de cabeza y cuello en humanos (Molinolo y col., 2007). En caninos, en particular, no se hallaron estudios que investigaran el rol del *EGFR* en el proceso de carcinogénesis epidérmico.

I. 1. 2. Vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR*

La activación de la vía de señalización fosfatidilinositol-3-quinasa/Akt/objetivo de la rapamicina en mamíferos (*phosphatidylinositol-3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin, PI3K/Akt/mTOR*) es a menudo el resultado de la activación de los receptores de factores de crecimiento, como el *EGFR*. Este receptor tiene la capacidad de promover la activación de la *PI3K*, la cual se encarga de fosforilar al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (*PIP2*), generando fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato (*PIP3*). Posteriormente, el *PIP3* provoca el reclutamiento de *Akt* a la membrana plasmática y la fosforilación de esta proteína en el residuo treonina 308 (*phosphorylated Akt in Thr 308, pAkt^{Thr308}*) por *PDK1* (*3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1, PDK1*) (Stephens y col., 1998). La activación de *Akt* conduce a la estimulación de la vía de señalización de *mTOR* y, posteriormente, la fosforilación de *Akt* en el residuo serina 473 (*phosphorylated Akt in Ser 473, pAkt^{Ser473}*) por *mTOR* (Hresko y Mueckler, 2005; Sarbassov y col., 2005). *Akt* es una serina/treonina quinasa que controla procesos celulares claves tales como la progresión del ciclo, el crecimiento y las decisiones del destino como la diferenciación, la supervivencia o la muerte por apoptosis, mediante la activación de diferentes proteínas diana entre las que cobra particular importancia *mTOR*. Esta última, es una serina/treonina quinasa atípica que fosforila importantes reguladores de la traducción eucariota como la p70-S6-quinasa, que a su vez se encarga de fosforilar a la proteína ribosómica S6 en el residuo serina 235/236 (*phosphorylated S6 in Ser 235/236, pS6^{Ser235/236}*), el último objetivo de esta vía de señalización (Luo y col., 2003).

En condiciones normales, la actividad de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* está estrictamente controlada por distintas moléculas que actúan como reguladores negativos. Entre estas, tiene particular importancia la fosfatasa y homólogo de tensina (*phosphatase and tensin homolog, PTEN*), una fosfatidilinositol-3-fosfatasa que interrumpe la señalización de

PI3K al desfosforilar *PIP3* a *PIP2* (Luo y col., 2003); y el complejo de esclerosis tuberosa 1/2 (*tuberous sclerosis complex 1/2, TSC1/TSC2*), una proteína que regula negativamente la actividad del complejo *mTOR* al inactivar, mediante la activación de una guanosina trifosfatasa, al homólogo de Ras enriquecido en cerebro (*Ras homolog enriched in brain, Rheb*) (Laplante y Sabatini, 2012).

Además, la vía de señalización de *PI3K/Akt/mTOR* puede ser activada por moléculas que, si bien no están directamente implicadas con esta vía, interactúan con algunas de sus proteínas efectoras. Entre estas moléculas se destacan: la proteína asociada al sí (*yes-associated protein, YAP*), una molécula de señalización de la vía *Hippo*; la β -catenina, una molécula de adhesión intercelular y de señalización de la vía *Wnt*; y, finalmente, la E-cadherina, una molécula de adhesión intercelular (Brouxhon y col., 2014; Inoki y col., 2006; Moroishi y col., 2015).

La activación de la vía de señalización de *PI3K/Akt/mTOR* mediante la determinación de la expresión de dos de sus objetivos descendentes más relevantes, *Akt* y *S6*, ha sido analizada en la epidermis normal de ratones, donde se encontró una expresión limitada principalmente a los estratos suprabasales (O'Shaughnessy y col., 2007; Squarize y col., 2010). A su vez, en la epidermis humana normal, la expresión de *PTEN*, el principal regulador negativo de esta vía de señalización, estuvo confinada al estrato basal, con una reducción gradual de su expresión hacia los queratinocitos terminalmente diferenciados (Tsao y col., 2003). Sin embargo, en la epidermis canina normal, ninguna de las moléculas implicadas en la vía de señalización de *PI3K/Akt/mTOR* y, por lo tanto, tampoco el estado de activación de esta vía, han sido previamente estudiadas.

Por otra parte, la activación persistente de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* demostró tener un papel central en el desarrollo y la progresión de los PCs en distintos

modelos murinos de carcinogénesis cutánea (Amornphimoltham y col., 2008, 2004), así como también en los CCECs humanos (Chen y col., 2009; Einspahr y col., 2012; Karayannopoulou y col., 2013). Además, la disminución de la expresión de *PTEN* ha sido implicada en la progresión de neoplasias epidérmicas en ratones por ser responsable de que se produzca un incremento en la actividad de la vía de señalización de *PI3K/Akt/mTOR* (Segrelles y col., 2002). En este sentido, la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* recibió una atención considerable ya que el uso de inhibidores de *mTOR* han mostrado resultados preclínicos y clínicos prometedores en el tratamiento de algunos cánceres, incluido los PCs y los CCECs en diferentes modelos murinos de carcinogénesis cutánea (Amornphimoltham y col., 2008, 2004; Athar y Kopelovich, 2011; Checkley y col., 2014, 2011). Sin embargo, ninguna de las moléculas implicadas en la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* ha sido evaluada previamente en las NEIF caninas.

I. 1. 3. *YAP*

La activación de la vía de señalización *Hippo*, uno de los principales reguladores de la proliferación celular y la apoptosis, conduce a la fosforilación de *YAP*, su principal efector. En consecuencia, confina a esta proteína al citoplasma para su posterior degradación. Cuando la vía de señalización *Hippo* esta inactiva, *YAP* puede translocarse al núcleo donde actúa como co-activador de la transcripción de genes que promueven la proliferación celular (Moroishi y col., 2015). A su vez, entre las moléculas cuya transcripción es inducida por *YAP* se encuentra la de un microARN que inhibe la traducción de *PTEN*, lo que provoca la activación de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* y, en consecuencia, de los procesos celulares que esta vía regula (Tumaneng y col., 2012).

La información disponible sobre la expresión de *YAP* en la epidermis normal se limita principalmente a los ratones, donde esta proteína mostró una localización nuclear en las células del estrato basal y citoplasmática en los queratinocitos más diferenciados (Beverdam y col., 2013; Schlegelmilch y col., 2011). Recientemente, una expresión similar se encontró en la epidermis normal de humanos (Debaugnies y col., 2018). Sin embargo, la expresión de *YAP* no ha sido previamente determinada en caninos.

Por otra parte, la sobreexpresión de *YAP* se correlacionó tanto con el desarrollo de los PCs mediante un modelo murino de carcinogénesis cutánea (Zanconato y col., 2015), como así también con la progresión de los CCECs humanos (Jia y col., 2016; Zhang y col., 2011). Sin embargo, la expresión de esta molécula no ha sido estudiada en las NEIF caninas.

I. 1. 4. β -catenina

La β -catenina desempeña un papel central tanto en las uniones intercelulares adherentes, como también en la señalización canónica de la vía Wnt. En la piel normal, la β -catenina recién sintetizada primero satura el complejo del que forma parte en las uniones adherentes, donde mantiene una estrecha relación con las proteínas transmembrana denominadas E-cadherinas. El exceso de β -catenina libre en el citoplasma es fosforilado por la enzima glucógeno sintasa quinasa 3 β (*Glycogen synthase kinase, GSK3 β*). Esta fosforilación, marca a la molécula para su posterior degradación (Alonso y Fuchs, 2003). Por su parte, la activación de la vía de señalización canónica de Wnt conduce a la inhibición de la enzima *GSK3 β* y, en consecuencia, a la inhibición de la fosforilación de la β -catenina citoplasmática. La β -catenina no fosforilada se transloca al núcleo, donde promueve la expresión de genes implicados en la proliferación y supervivencia celular (Alonso y Fuchs, 2003). A su vez, la inhibición de *GSK3 β* producida por la activación de la vía de señalización Wnt no solo

provoca un incremento de la β -catenina citoplasmática, sino que también previene la inducción del *TSC*, un inhibidor de *mTOR*, lo que conduce a la activación de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* (Inoki y col., 2006).

La expresión de β -catenina fue evaluada previamente en la epidermis canina normal, donde mostró una localización limitada principalmente a la membrana de las células del estrato basal, espinoso y granuloso (Bongiovanni y col., 2011). A su vez, la reducción/pérdida de la marcación de membrana de β -catenina se relacionó con la adquisición del fenotipo maligno en los CCECs caninos (Bongiovanni y col., 2011). Sin embargo, la evaluación de la expresión de β -catenina en otras NEIF caninas de importancia clínica no ha sido realizada. A su vez, dado que esta molécula mantiene una estrecha relación con la E-cadherina, el estudio en forma conjunta de β -catenina/E-cadherina puede brindar mayor claridad respecto al rol que desempeñan estas moléculas en el proceso de carcinogénesis epidérmica en los caninos.

I. 1. 5. E-cadherina

La E-cadherina es una glicoproteína de transmembrana que desempeña un papel central en las uniones celulares adherentes. Ésta glicoproteína posee un dominio citoplasmático estrechamente relacionado con el citoesqueleto por medio de cateninas, entre ellas la β -catenina, así como también un dominio extracelular que interactúa con las E-cadherinas de la célula a la cual se une (Suter y col., 1997).

La expresión de E-cadherina ha sido evaluada previamente en la epidermis normal de caninos adultos mediante inmunofluorescencia (Bizikova y col., 2011). A su vez, la disminución/pérdida de la expresión de E-cadherina ha sido relacionada con la adquisición de un fenotipo maligno en los CCECs caninos (João y col., 2011). Sin embargo, la evaluación de la expresión de E-cadherina en otras NEIF caninas de importancia clínica no

ha sido realizada. A su vez, como se mencionó en la sección de β -catenina, el estudio en forma conjunta E-cadherina/ β -catenina puede brindar mayor claridad al rol que desempeñan estas moléculas en el proceso de carcinogénesis epidérmica en los caninos.

I. 1. 6. p63/CK5

La proteína p63, un factor de transcripción homólogo de la proteína p53, desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la población de células madre basales epidérmicas (Pellegrini y col., 2001; Yang y col., 1999), así como también en el compromiso con la diferenciación terminal de los queratinocitos (Mills y col., 1999; Yang y col., 1999). En este sentido, varias líneas de evidencia señalan que p63 interviene en la regulación de la expresión de marcadores asociados con la diferenciación de epitelios escamosos estratificados como la citoqueratina 5 (CK5) (Mills y col., 1999; Yang y col., 1999). Esta citoqueratina, uno de las principales constituyentes del citoesqueleto de los queratinocitos epidérmicos, tiene como función principal la de brindar estabilidad mecánica a las células de los estratos basal y espinoso (Moll y col., 2008). De este modo, la evaluación de p63 en forma conjunta con la CK5 ha cobrado un particular interés como marcadores de diferenciación escamosa en el diagnóstico de los CCECs pobremente diferenciados (Kaufmann y col., 2001; Reis-Filho y col., 2003).

La información disponible sobre la expresión de la proteína p63 en la epidermis normal, así como también en las NEIF más frecuentes, está principalmente limitada a la especie humana (Di Como y col., 2002; Parsa y col., 1999; Reis-Filho y col., 2002; Sakiz y col., 2009). En caninos, la expresión de p63 ha sido determinada en la epidermis normal (Saraiva y col., 2008), pero no en las NEIF. Respecto a la expresión de p63 en forma conjunta con CK5, la información disponible está limitada a las NEIF humanas (Kaufmann y col., 2001;

Reis-Filho y col., 2003). En caninos, en particular, la expresión de p63/CK5 ha sido evaluada únicamente en glándula mamaria (Ramalho y col., 2006).

I.2 Objetivos

I.2.1 Objetivos generales:

Contribuir a la comprensión de los procesos de proliferación celular, diferenciación celular e invasión en la patogenia de las NEIF en caninos.

I.2.2 Objetivos específicos:

- (1) Evaluar el patrón de expresión de marcadores de proliferación celular, diferenciación celular e invasión en las NEIF y establecer su relación con indicadores histopatológicos de malignidad en caninos.
- (2) Evaluar el estado de activación de diferentes moléculas implicadas en las vías de señalización celular para determinar algunos de los mecanismos moleculares desregulados implicados en el desarrollo y la progresión de las NEIF en caninos.
- (3) Identificar algunas de las moléculas de señalización cuya actividad desregulada podrían representar objetivos moleculares adecuados para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos en las NEIF en caninos.
- (4) Determinar marcadores inmunohistoquímicos aplicables al estudio de lesiones preneoplásicas y neoplásicas de la epidermis interfolicular en caninos.

I.3 Hipótesis

Las NEIF expresan moléculas que pueden relacionarse con su comportamiento biológico.

CAPÍTULO II

Materiales & Métodos

II. 1. Muestras de tejido

A partir de los archivos del Laboratorio de Patología Especial Veterinaria Dr. Bernardo Epstein, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, se recuperaron los bloques de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina correspondientes a epidermis preneoplásica (EPN), PC y CCEC de caninos. Asimismo, se recolectaron datos clínicos relevantes correspondientes a la raza, la edad y el sexo de los caninos, así como también al diagnóstico inicial y la localización anatómica de las lesiones. Las muestras de tejidos, fijadas con formol tamponado neutro al 10%, fueron ingresadas al Laboratorio de Patología Especial Veterinaria en el periodo 2006-2014, donde se procesaron rutinariamente, se incluyeron en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H-E) para su posterior diagnóstico histopatológico. Con el fin de determinar la idoneidad del tejido para la inclusión en este estudio y corroborar el diagnóstico histopatológico previo, las secciones teñidas con H-E pertenecientes a cada muestra fueron re-evaluadas. Luego de realizar la observación de las secciones coloreadas con H-E se seleccionaron 12 casos de EPN (QA y epidermis displásica contigua a CCEC), 41 casos de PC y 150 casos de CCEC.

Por otra parte, se tomaron muestras de piel de caninos ingresados al Servicio de Anatomía Patológica, Laboratorio de Patología Especial Veterinaria, que no presentaban

alteraciones en el manto piloso para ser utilizados como controles de epidermis normal (EN). Las muestras fueron procesadas rutinariamente para su inclusión en parafina y su posterior coloración con la técnica de H-E. Luego de realizar la observación de las secciones coloreadas con H-E se seleccionaron 17 muestras de EN.

Por último, se seleccionaron 10 bloques de parafina adicionales correspondientes a tejidos normales (piel de perro, hígado humano, ganglio linfático de perro, tiroides humana y cerebelo humano) y tejidos neoplásicos (piel de perro, piel humana, glándula mamaria de perro, pulmón humano y colon humano) para ser incluidas en cada micromatriz como controles de la técnica de inmunohistoquímica (Hewitt, 2004; Molinolo y col., 2007). Los bloques de parafina correspondientes a tejidos humanos se obtuvieron del *Tissue Array Research Program, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, Estados Unidos*.

II. 2. Diseño y construcción de las micromatrices de tejidos

Se diseñaron y construyeron cuatro MMT de acuerdo con la metodología descrita por Hewitt (2004), utilizando un *arrayer* de tejido semiautomático (TMArrayer TM, Pathology Devices, Inc.) y un diámetro de aguja de perforación de 1 mm.

Sobre cada una de las secciones coloreadas con H-E, correspondiente a cada bloque de tejido incluido en parafina donante, se procedió a la marcación de las áreas de tejido de interés utilizando un marcador indeleble verde bajo observación microscópica. Luego, se ordenó cada bloque donante con su sección correspondiente para la posterior construcción de la matriz. A continuación, se construyó un bloque de parafina receptor utilizando un molde específico y parafina bajo punto de fusión. El bloque de parafina receptor se colocó entonces en el *arrayer* de tejido y se procedió a la construcción de la MMT. Sobre un soporte

específico se ubicó el bloque donante y sobre éste la sección coloreada con H-E correspondiente. El conjunto formado por soporte-bloque donante-sección coloreada con H-E se alineó de forma tal que el área de interés marcada sobre el portaobjetos se ubicara debajo de la aguja de perforación. Se retiró el portaobjetos y se procedió a la obtención de una biopsia cilíndrica (núcleo) a partir del bloque de parafina donante. Se retiró el soporte que contenía el bloque donante y se procedió a reinsertar el núcleo contenido en la aguja de perforación en el bloque de parafina receptor. Este procedimiento se repitió con cada uno de los bloques donantes. Una vez finalizada la inserción de los núcleos de interés, se colocó la MMT en una estufa a 37 °C durante 10 min y se presionó su superficie. Este último procedimiento se repitió tres veces. Finalmente, se realizó el templado de la MMT en una estufa a 37 °C.

A partir de cada MMT, se obtuvieron secciones de 5 µm que se colorearon con H-E para realizar un análisis general de la matriz, evaluar la conservación del tejido y la calidad de cada núcleo. Posteriormente, se obtuvieron secciones de 5 µm que se colocaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente para estudios inmunohistoquímicos.

II. 3. Inmunohistoquímica

II. 3.1. Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica se realizó utilizando anticuerpos contra *pEGFR^{Tyr1068}* (*phosphorylated EGFR in Tyr1068, rabbit monoclonal antibody*, prediluido; Biocare Medical, Pacheco, CA, USA), *pAkt^{Ser473}* (*phosphorylated Akt in Ser473, rabbit monoclonal antibody*, diluido 1:50; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA), *PTEN* (*tumor suppressor, mouse monoclonal antibody*, prediluido; Biocare Medical, Pacheco, CA, USA), β -catenina (*β -catenin, rabbit monoclonal antibody*, diluido 1:100; Cell

Signaling Technologies, Danvers, MA, USA), E-cadherina (*E-cadherin, rabbit monoclonal antibody*, diluido 1:400; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA), YAP (*YAP, rabbit polyclonal antibody*, diluido 1:200; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA). Todos los anticuerpos seleccionados se probaron previamente en muestras relevantes de EN y CCEC caninos para establecer las condiciones óptimas para su uso. El control negativo del ensayo incluyó portaobjetos procesados para IHQ en los que se omitió el anticuerpo primario.

Los portaobjetos conteniendo las secciones de cada MMT se colocaron en una estufa a 65 °C durante 30 min para fundir la parafina. Luego se sumergieron en *Safeclear II* (Fisher Scientific, Hampton, NH, USA) para el desparafinado durante 5 min (tres veces) y se hidrataron a través de pasajes sucesivos en alcoholes de graduación decreciente. Para bloquear la peroxidasa endógena, los portaobjetos se incubaron en peróxido de hidrógeno al 3% en alcohol 70% durante 30 min y se lavaron con agua destilada durante 5 min, tres veces. Para la recuperación antigénica, los portaobjetos se colocaron en un recipiente con citrato sódico 10 mM y se calentaron en un microondas durante 20 min (2 min al 100% de potencia y 18 min al 20% de potencia). Los portaobjetos se dejaron enfriar durante 15 min a temperatura ambiente, se lavaron una vez con agua destilada y luego tres veces con solución salina tamponada con fosfato (*phosphate buffered saline, PBS*). Las secciones se incubaron en solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 2,5% en *PBS*) durante 30 min a temperatura ambiente. El exceso de solución se descartó y las secciones se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo a 4 °C durante la noche. Después de lavar con *PBS*, los portaobjetos se incubaron secuencialmente con el anticuerpo secundario biotinilado (de acuerdo con el anticuerpo primario utilizado: *Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG Antibody*, BA-1000, diluido 1:400; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; ó

Biotinylated Goat Anti-Mouse IgG Antibody, diluido 1:400; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 30 min. Las secciones se lavaron con *PBS* durante 5 min (tres veces) y se incubaron con el complejo de avidina-biotina (VECTASTAIN® Elite® ABC Kit, PK-6100; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 30 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron con *PBS* y se revelaron con 3,3'-diaminobenzidina (*3,3'-Diaminobenzidine SIGMAFAST™ tablets*, D4168-50SET; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) ó *Vina Green* (*Vina Green™ Chromogen Kit*; Biocare Medical, Pacheco, CA, USA) bajo control microscópico. La reacción se detuvo en agua destilada y los tejidos se contrastaron con hematoxilina de Mayer, se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y se montaron.

II.3.2. Inmunohistoquímica de doble color

La técnica de inmunohistoquímica de doble color se realizó utilizando anticuerpos contra Ki-67 (*Ki-67, mouse monoclonal anti-human antibody*, diluido 1:100; Dako, Carpinteria, CA, USA) y *pS6^{Ser235/236}* (*phosphorylated S6 in Ser235/236, rabbit antibody*, diluido 1:200; Cell Signaling Technologies, Danvers, MA, USA); p63 (*p63 rabbit monoclonal antibody*, prediluido; Biocare Medical, Pacheco, CA, USA) y CK5 (*Cytokeratin 5 Ab-1, mouse monoclonal antibody*, prediluido; Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA). Todos los anticuerpos seleccionados se probaron previamente en muestras relevantes de EN y CCEC para establecer las condiciones óptimas para su uso. El control negativo del ensayo incluyó portaobjetos procesados para IHQ en los que se omitieron los anticuerpos primarios.

El primer anticuerpo (Ki-67 o p63) se usó como se describió anteriormente (ver sección II.3.1 Inmunohistoquímica), pero los portaobjetos se revelaron con *Deep Space Black* (Deep

Space Black Chromogen en Deep Space Black buffer 1:50; Biocare Medical, Pacheco, CA, USA) bajo control microscópico. La reacción se detuvo en agua destilada y la técnica se continuó de la siguiente manera: los anticuerpos utilizados previamente se eluyeron con ácido cítrico 50 mM durante 15 minutos (dos cambios). Luego, los portaobjetos se lavaron minuciosamente con agua destilada y se incubaron en peróxido de hidrógeno al 3% en alcohol 70% durante 30 min para bloquear la peroxidasa endógena. Luego se lavaron con agua destilada durante 5 min (tres veces) y se incubaron en solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 2,5% en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. El exceso de solución se descartó y las secciones se incubaron con el siguiente anticuerpo primario (*pS6^{Ser235/236}* o CK5) diluido en solución de bloqueo a 4 °C durante la noche. Después del lavado con *PBS*, los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo secundario (de acuerdo con el anticuerpo primario utilizado: *Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG Antibody*, BA-1000, diluido 1:400; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA; ó *Biotinylated Goat Anti-Mouse IgG Antibody*, diluido 1:400; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 30 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron con solución salina tamponada con tris (*tris-buffered saline, TBS*) durante 5 min (tres veces) y se incubaron con el complejo fosfatasa alcalina (VECTASTAIN® ABC-AP Staining Kit, Alkaline Phosphatase Standard, AK-5000, 1:50 del reactivo A más 1:50 del reactivo B en albumina sérica bovina al 2,5% en *TBS*; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) durante 30 min a temperatura ambiente. Luego se lavaron con *TBS* durante 5 min (tres veces) y se revelaron con *Warp Red* (*Warp Red Chromogen* en *Warp Red buffer* 1:50; Biocare Medical, Pacheco, CA, USA) bajo control microscópico. La reacción se detuvo con agua destilada y los tejidos se contrastaron con hematoxilina de Mayer, se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente y se montaron.

II. 4. Análisis cualitativo y cuantitativo

Para realizar el análisis cualitativo y cuantitativo de las inmunomarcaciones, los portaobjetos se escanearon con un aumento de 40x en el Aperio CS ScanScope (Leica Biosystems Imaging Inc., USA). Posteriormente, se utilizaron los algoritmos de análisis de imágenes de Aperio disponibles en el software de visualización de ImageScope (Leica Biosystems Imaging Inc., USA). En el análisis cualitativo se evaluó la intensidad, la localización celular y la localización dentro de la epidermis de la inmunomarcación, mientras que en el análisis cuantitativo se contó el número de células positivas para cada núcleo de tejido en cada MMT. Los resultados del análisis cuantitativo se expresaron como el porcentaje de células epidérmicas positivas/células totales. De acuerdo con estos resultados, los núcleos se dividieron en cinco categorías: 0, menos del 10% de las células teñidas; 1, entre 10 y 25%; 2, entre 25 y 50%; 3, entre 50 y 75%; 4, entre 75 y 100% (Molinolo y col., 2007).

II. 5. Análisis estadísticos

Las diferencias en la reactividad inmunohistoquímica entre los grupos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para poblaciones no gaussianas (ANOVA no paramétrico) seguida de la prueba de Dunn (software Statgraphics, con un valor de $P < 0,05$ y una confianza del 95%).

II. 6. Análisis de agrupamiento jerárquico

El análisis de agrupamiento jerárquico se realizó sobre los casos correspondientes a CCEC caninos. Para ello, los valores asignados en el análisis cuantitativo para cada uno de los casos se convirtieron en valores centrados en cero: el valor 0 se convirtió a -2; el valor 1

a -1; el valor 2 a 1; el valor 3 a 2; el valor 4 a 3. Estos datos convertidos fueron trasladados a un archivo de texto simple para luego realizar el análisis de agrupamiento jerárquico mediante el programa Cluster 3.0. Los resultados se visualizaron utilizando el programa JavaTreeView. El análisis de conglomerados se organizó en base a los marcadores moleculares utilizados en el eje horizontal y las muestras de CCEC en el eje vertical (Molinolo y col., 2007).

CAPÍTULO III

Resultados

III. 1. Información clínica

La información clínica de las muestras incluidas en este estudio se resume en las Tablas 1-4 (Anexo). Debido al elevado número de muestras de CCEC y PC recuperadas de los archivos del Laboratorio de Patología Especial Veterinaria, así como también a la importancia clínica de estas lesiones, se analizaron los aspectos epidemiológicos de estas lesiones.

En lo que respecta a los casos de CCEC, las razas principalmente afectadas fueron Dogo Argentino (29/150, 19,33%), Mestizo (22/150, 14,66%), Schnauzer gigante (14/150, 9,33%), Ovejero Alemán (10/150, 6,66%) y Rottweiler (10/150, 6,66%). La edad media de los perros afectados fue de 8 años (rango 2-15 años). La relación macho-hembra en la incidencia de esta neoplasia fue 1:1,56. Las áreas más frecuentemente afectadas fueron el lecho ungueal (38/150, 25,33%) y el abdomen ventral (29/150, 19,33%).

Con respecto a los casos de PC, no se observó una predisposición racial marcada. En cuanto a la edad de presentación, los caninos afectados se encontraron entre los 2 meses y los 12 años. La relación macho-hembra en la incidencia de esta neoplasia fue 1:1,76. Respecto a las áreas anatómicas afectadas, si bien las localizaciones fueron diversas sin

observarse una predisposición marcada, la presentación más habitual fue la de lesiones múltiples tanto cutáneas como mucocutáneas (12/41; 29%).

III. 2. Calidad de las micromatrices de tejido

La evaluación histológica realizada mostró una buena calidad de las secciones obtenidas a partir de las MMT. La mayoría de los núcleos tenían muestras de tejido representativas. Solo 2/17 (11,76%) núcleos de EN, 2/12 (16,66%) núcleos de EPN, 5/41 (12,19%) núcleos de PC y 10/150 (6,66%) núcleos de CCEC fueron excluidos de análisis posteriores debido a su daño o pérdida durante el procesamiento. La buena calidad obtenida de las MMT se debió principalmente a la cuidadosa selección de áreas de tejido representativas de los bloques de donantes, así como también al diámetro seleccionado de la aguja de perforación (1 mm). De hecho, este diámetro permitió un área de tejido representativa lo suficientemente grande como para la adecuada evaluación histológica e inmunohistoquímica, pero también lo suficientemente pequeña como para permitir que las MMT tengan un alto rendimiento. La Figura 1 muestra una sección representativa de una de las MMT coloreada con H-E para mostrar la buena calidad de los núcleos.

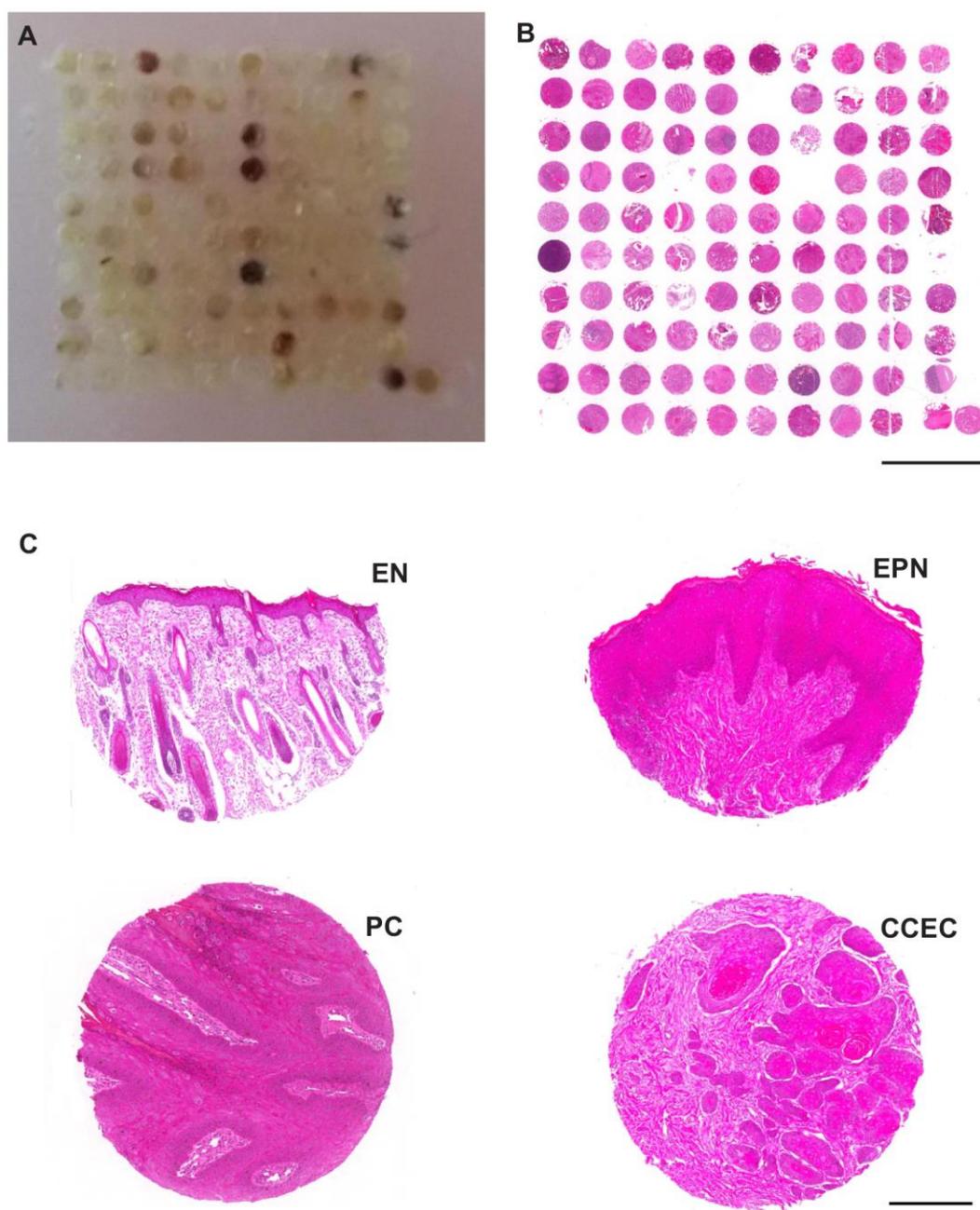


Figura 1. (A) Imagen de una de las MMT finalizada. (B) Sección de la MMT teñida con H-E para mostrar la representatividad de los núcleos de tejidos. (C) Ejemplos de núcleos de tejidos de EN, EPN, PC y CCEC teñidos con H-E. La barra de escala representa 4 mm (B) y 300 μm (C).

III. 3. EGFR

En las muestras de EN se observó un elevado número de células epidérmicas positivas para $pEGFR^{Tyr1068}$ (Figura 2; Tabla 5, Anexo). La expresión de $pEGFR^{Tyr1068}$ estuvo limitada principalmente a la membrana y ocasionalmente al citoplasma de las células epidérmicas de los estratos basal y espinoso (Figura 3).

En las muestras de EPN, así como también en la mayoría de las muestras de PC (26/36; 72,22%), se observó un elevado número de células epidérmicas positivas para $pEGFR^{Tyr1068}$ (Figura 2; Tablas 6-7, Anexo). La inmunodetección de $pEGFR^{Tyr1068}$ mostró un patrón de expresión limitado a la membrana y al citoplasma de las células epidérmicas de los estratos basal y espinoso (Figura 3). Un hallazgo interesante fue que todos los PCs que evidenciaron una expresión reducida o ausente de $pEGFR^{Tyr1068}$ (10/36; 27,77%) mostraron activación de la vía de señalización $PI3K/Akt/mTOR$, a juzgar por la inmunodetección positiva para $pAkt^{Ser473}$ y $pS6^{Ser235/236}$ en todos los casos (ver sección $PI3K/Akt/mTOR$).

En las muestras de CCEC se observó un elevado número de células epidérmicas positivas para $pEGFR^{Tyr1068}$ (90/140; 64%) (Figura 2; Tabla 8, Anexo). La inmunotinción de $pEGFR^{Tyr1068}$ mostró una tinción localizada en la membrana y en el citoplasma en las células epidérmicas de los estratos basal y espinoso. Esta expresión fue notable en las áreas más diferenciadas de los CCECs (Figura 3). Asimismo, se observó que todos los CCECs que evidenciaron una expresión reducida o ausente de $pEGFR^{Tyr1068}$ (50/140; 36%) mostraron activación de la vía de señalización $PI3K/Akt/mTOR$, a juzgar por la inmunodetección positiva para $pAkt^{Ser473}$ y $pS6^{Ser235/236}$ (ver sección $PI3K/Akt/mTOR$).

Finalmente, la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en el porcentaje de células epidérmicas positivas para $pEGFR^{Tyr1068}$ entre las muestras de EN y

EPN ($P < 0,0004$), mientras que no se encontraron diferencias significativas respecto a las muestras de PC y CCEC.

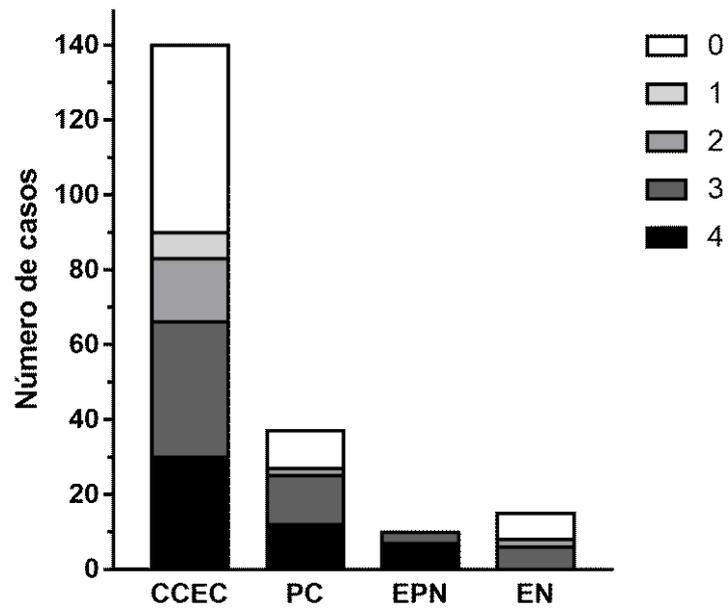


Figura 2. Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica para *pEGFR^{Tyr1068}* en muestras de EN, EPN, PC y CCEC. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células epidérmicas positivas/células totales. Puntuación: 0, menos del 10% de las células teñidas; 1, entre 10 y 25%; 2, entre 25 y 50%; 3, entre 50 y 75%; 4, entre 75 y 100%.

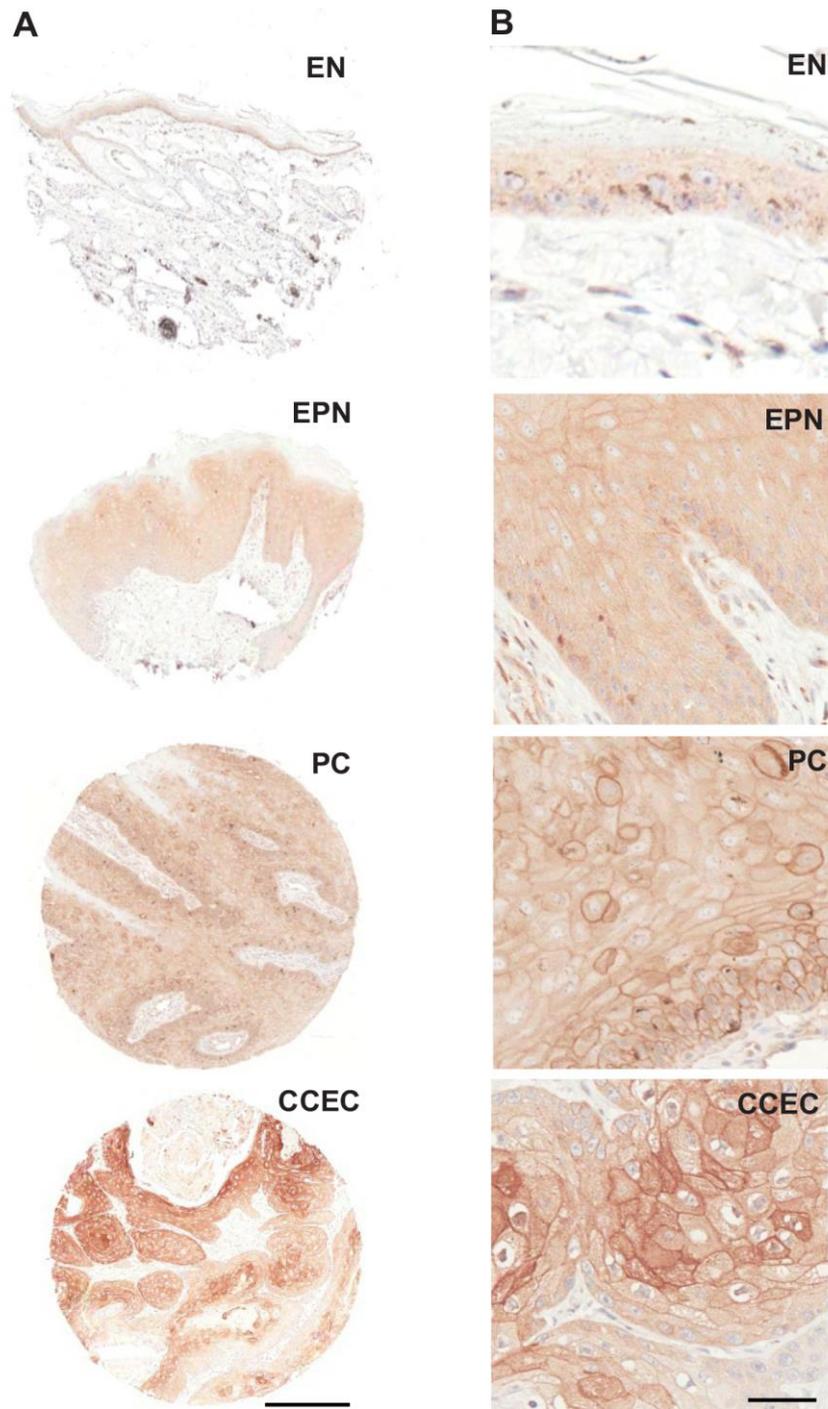


Figura 3. (A) Inmunodetección de $pEGFR^{Tyr1068}$ en diferentes núcleos de matriz de EN, EPN, PC y CCEC. (B) Las células positivas para $pEGFR^{Tyr1068}$ (marrones) mostraron una fuerte tinción de membrana y, ocasionalmente, un patrón citoplasmático limitado al estrato epidérmico basal y espinoso en las muestras de EN, EPN, PC y CCEC. En los CCECs, la inmunodetección de $pEGFR^{Tyr1068}$ estuvo limitada principalmente a las áreas más diferenciadas de los tumores. La barra de escala representa 300 μm (A) y 50 μm (B).

III. 4. Vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR*

En las muestras de EN se observó un bajo número de células epidérmicas positivas para *pAkt^{Ser473}* y *pS6^{Ser235/236}*, mientras que el número fue elevado para *PTEN* (Figura 4; Tabla 5, Anexo). *pAkt^{Ser473}* se expresó en el citoplasma de unas pocas células del estrato epidérmico granuloso, a excepción de unas escasas muestras en las que se observó un patrón citoplasmático y nuclear en algunas células del estrato basal (Figura 5). La inmunotinción doble color *Ki-67/pS6^{Ser235/236}* mostró que *pS6^{Ser235/236}* estaba restringido al citoplasma de algunas células epidérmicas de los estratos espinoso y granuloso, mientras que *Ki-67* estaba restringido al núcleo de algunas células del estrato basal (Figura 5). Finalmente, la inmunodetección de *PTEN* mostró una intensa expresión citoplasmática y nuclear en las células epidérmicas del estrato basal, para reducir su expresión gradualmente en el estrato espinoso (Figura 5).

Las muestras de EPN revelaron un elevado número de células epidérmicas positivas para todas las proteínas de la vía de señalización de *PI3K/Akt/mTOR* analizadas (Figura 4; Tabla 6, Anexo). *pAkt^{Ser473}* mostró una inmunorreactividad citoplasmática y nuclear localizada principalmente en el estrato de células basales, así como también en las primeras capas del estrato espinoso (Figura 6). La inmunodetección de *pS6^{Ser235/236}* reveló una marcada expresión citoplasmática en las células del estrato basal, además de la intensa expresión citoplasmática localizada en los estratos espinoso y granuloso observada en la EN (Figura 6). Coincidentemente, la inmunotinción doble color *Ki-67/pS6^{Ser235/236}* mostró la coexpresión de *pS6^{Ser235/236}* y *Ki-67* en algunas células del estrato basal, así como también en las primeras capas celulares del estrato espinoso (Figura 6). Finalmente, la inmunodetección de *PTEN* mostró una expresión citoplasmática en las células del estrato basal, así como también en las primeras capas celulares del estrato espinoso en todas las muestras de EPN (Figura 6).

En las muestras de PC se observó un elevado número de células epidérmicas positivas para todas las proteínas analizadas, excepto para *PTEN* (Figura 4; Tabla 7, Anexo). *pAkt^{Ser473}* se expresó en un elevado número de células epidérmicas en todas las muestras de PC (36/36, 100%). Si bien la mayoría de los PCs mostraron una expresión citoplasmática y nuclear para *pAkt^{Ser473}* limitada a las células epidérmicas de los estratos basal, espinoso y granuloso (32/36, 88,88%; Figura 7), unas escasas muestras revelaron una expresión citoplasmática únicamente en el estrato granuloso. Respecto a *pS6^{Ser235/236}*, se expresó en una gran cantidad de células epidérmicas en todas las muestras de PC (36/36; 100%), donde reveló una intensa tinción citoplasmática en las células epidérmicas de los estratos basal y espinoso. Coincidentemente, la inmunotinción doble color Ki-67/*pS6^{Ser235/236}* mostró la coexpresión de *pS6^{Ser235/236}* y Ki-67 en algunas células del estrato basal y de las primeras capas del estrato espinoso en la mayoría de las muestras de PC (Figura 7). Un hallazgo interesante fue que todos los PCs evidenciaron la activación de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR*, incluso aquellos que mostraron una expresión reducida o ausente de *pEGFR^{Tyr1068}* (10/36; 27,77%). Finalmente, a pesar de que la mayoría de las muestras de PC fueron positivas para *PTEN* (Figura 7), 12/36 (33,33%) de las muestras revelaron una baja expresión de esta proteína.

En las muestras de CCEC se observó un elevado número de células positivas para todas las proteínas analizadas, excepto para *PTEN* (Figura 4; Tabla 8, Anexo). *pAkt^{Ser473}* se expresó en un gran número de células epidérmicas en 108/140 (77,14%) de las muestras de CCEC, donde reveló una inmunorreactividad citoplasmática y nuclear en los estratos de células basales y espinosas (Figura 8). La mayoría de las muestras de CCEC (130/140, 92,85%) mostraron una alta expresión citoplasmática para *pS6^{Ser235/236}* localizada en el estrato basal, además de la intensa expresión citoplasmática localizada en los estratos espinoso y granuloso observada en la EN (Figura 8). Además, la inmunotinción doble color Ki-67/*pS6^{Ser235/236}*

mostró la coexpresión de $pS6^{Ser235/236}$ y Ki-67 en algunas células del estrato basal y de las primeras capas del estrato espinoso (Figura 8). Un hallazgo de interés fue que, la cantidad de muestras de CCEC con un elevado número de células positivas para Akt^{Ser473} (77,14%) fue un poco menor que el de positivas para $pS6^{Ser235/236}$ (92,85%). Además, se observó que el diámetro seleccionado de la aguja de perforación permitió obtener un área tumoral lo suficientemente grande en la mayoría de los núcleos de CCEC para ver que la inmunorreactividad de $pAkt^{Ser473}$ y $pS6^{Ser235/236}$ era más notable a lo largo de los bordes invasivos de los tumores. Asimismo, se observó que todos los CCECs mostraron activación de la vía de señalización $PI3K/Akt/mTOR$, incluso aquellos que evidenciaron una expresión reducida o ausente de $pEGFR^{Tyr1068}$ (50/140; 36%). Finalmente, la inmunodetección de $PTEN$ mostró una expresión citoplasmática en las células epidérmicas de los estratos basal y en las primeras capas del estrato espinoso en 110/140 (78,57%) de las muestras de CCEC (Figura 8). Asimismo, se observó que las muestras de CCEC que mostraron una expresión baja de $PTEN$ (27/30; 90%), presentaron un gran número de células positivas para $pS6^{Ser235/236}$.

Finalmente, respaldando el hecho de que la mayoría de las moléculas involucradas en la vía de señalización $PI3K/Akt/mTOR$ mostraron una reactividad mayor en las muestras de EPN, PC y CCEC, la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en el porcentaje de células positivas entre EN y EPN para $pAkt^{Ser473}$ ($P < 0,0001$), $pS6^{Ser235/236}$ ($P < 0,0001$) y $PTEN$ ($P < 0,0001$); entre EN y PC para $pAkt^{Ser473}$ ($P < 0,0001$) y $pS6^{Ser235/236}$ ($P < 0,0001$), mientras que no se encontraron diferencias significativas para $PTEN$; entre EN y CCEC para $pAkt^{Ser473}$ ($P < 0,0001$), $pS6^{Ser235/236}$ ($P < 0,0001$) y $PTEN$ ($P < 0,0113$).

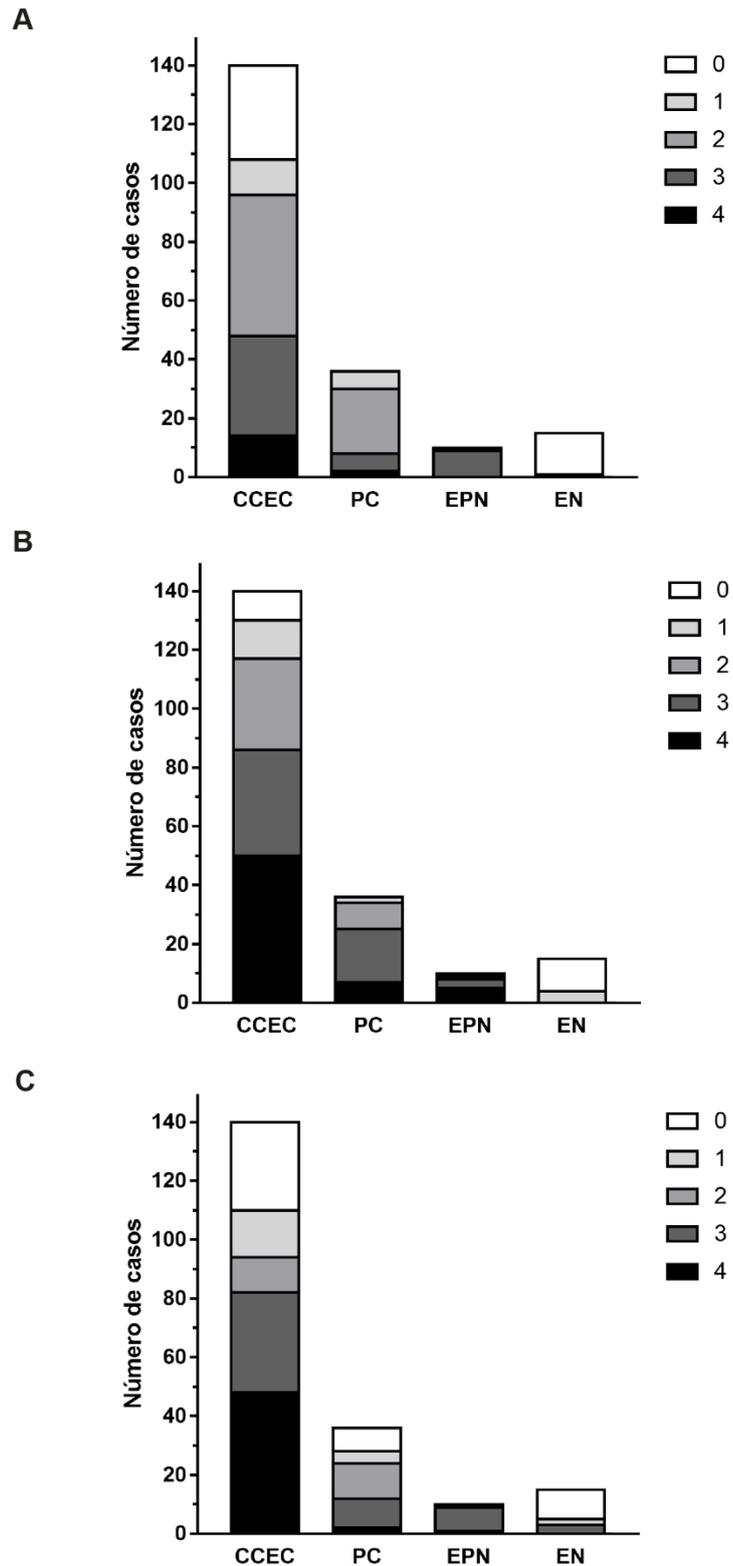


Figura 4. Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica para *pAkt^{Ser473}* (A), *pS6^{Ser235/236}* (B) y *PTEN* (C) en muestras de EN, EPN, PC y CCEC. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células epidérmicas positivas/células totales. Puntuación: 0, menos del 10% de las células teñidas; 1, entre 10 y 25%; 2, entre 25 y 50%; 3, entre 50 y 75%; 4, entre 75 y 100%.

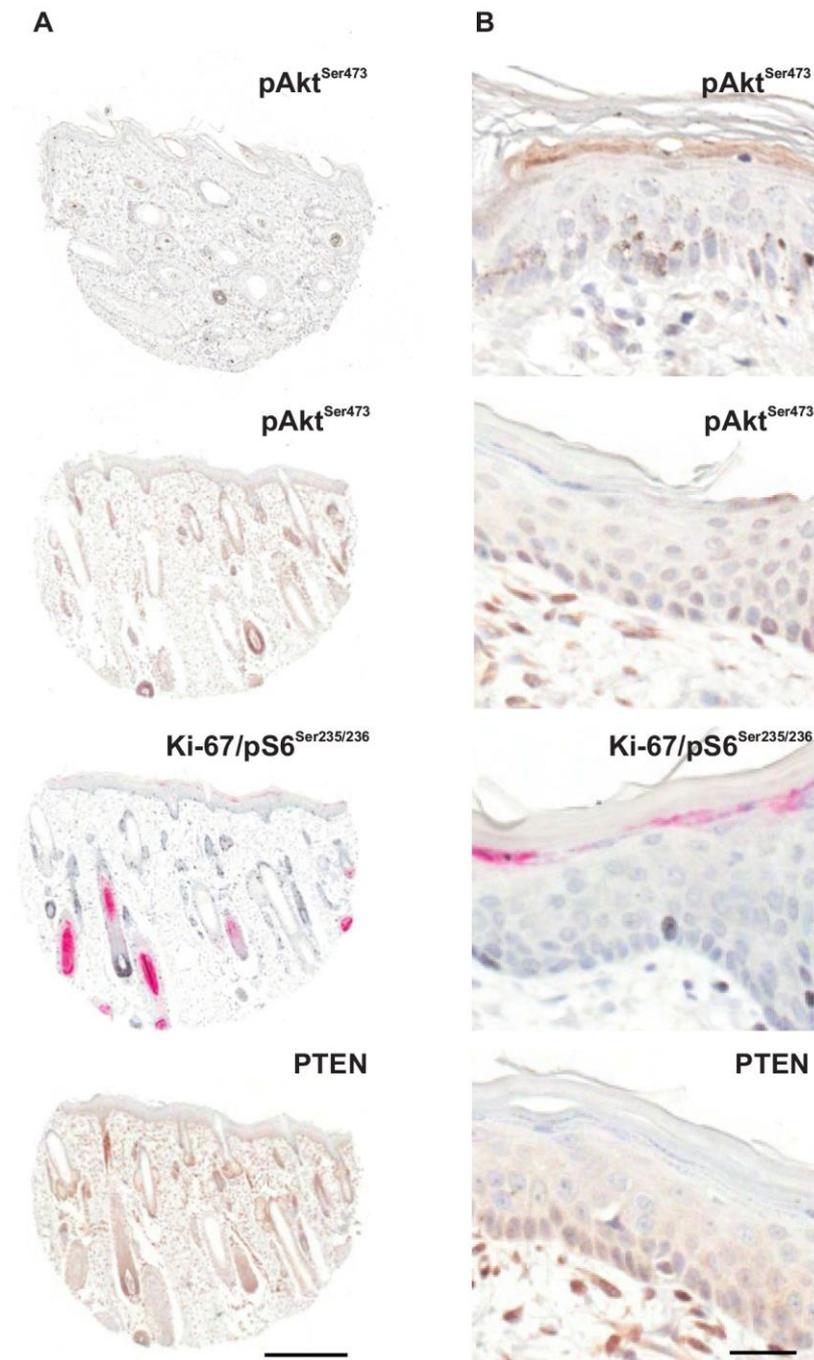


Figura 5. (A) Inmunodetección de $pAkt^{Ser473}$, $Ki-67/pS6^{Ser235/236}$ y $PTEN$ en diferentes núcleos de matriz de EN. (B) La tinción positiva de $pAkt^{Ser473}$ (marrón) se limitó a algunas células del estrato granuloso (imagen superior), con la excepción de algunas muestras en las que la tinción positiva $pAkt^{Ser473}$ (marrón) se limitó al citoplasma y ocasionalmente al núcleo de las células epidérmicas basales (imagen inferior). La doble inmunotinción $Ki-67/pS6^{Ser235/236}$ mostró que $pS6^{Ser235/236}$ (rojo) estaba restringido al citoplasma de algunas células de los estratos espinoso y granuloso, mientras que $Ki-67$ (negro) solo se detectó en el núcleo de unas pocas células del estrato basal. La inmunotinción para $PTEN$ mostró reacción positiva nuclear y citoplasmática (marrón) en las células de los estratos basal y espinoso. La barra de escala representa $300\ \mu m$ (A) y $50\ \mu m$ (B).

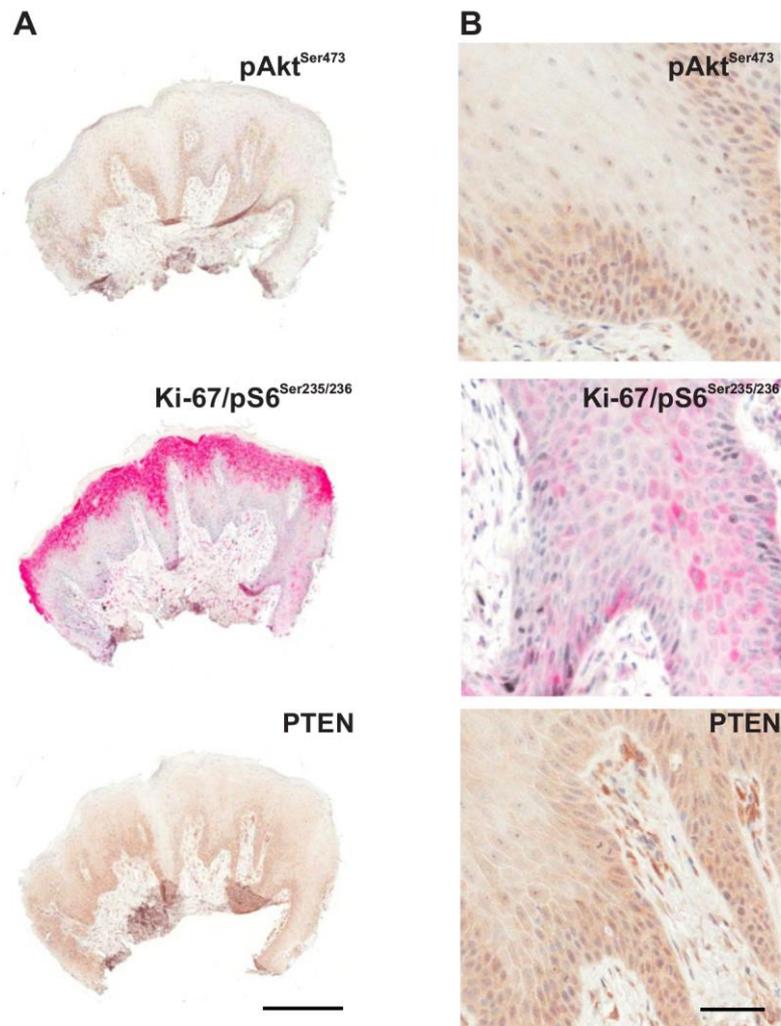


Figura 6. (A) Inmunodetección de $pAkt^{Ser473}$, $Ki-67/pS6^{Ser235/236}$ y $PTEN$ en diferentes núcleos de matriz de EPN. (B) La tinción positiva de $pAkt^{Ser473}$ (marrón) se limitó principalmente al citoplasma y ocasionalmente al núcleo de las células epidérmicas basales. La inmunotinción doble $Ki-67/pS6^{Ser235/236}$ mostró una gran cantidad de las células epidérmicas positivas para $pS6^{Ser235/236}$ (rojo) localizadas en el estrato basal y en las primeras capas del estrato espinoso. Además, muchas de las células basales positivas para $pS6^{Ser235/236}$ (rojo) coexpresaron $Ki-67$ (tinción nuclear negra). La inmunotinción $PTEN$ mostró reacción positiva citoplasmática (marrón) en el estrato basal y primeras capas celulares del estrato espinoso. La barra de escala representa 300 μm (A) y 50 μm (B).

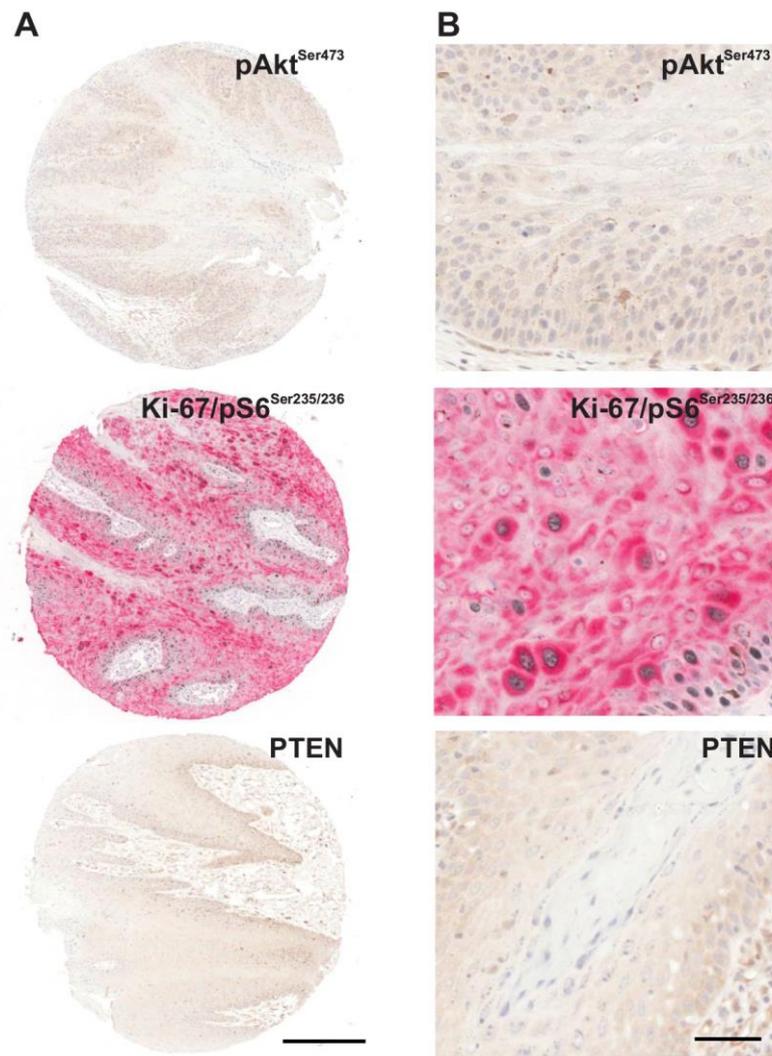


Figura 7. (A) Inmunodetección de $pAkt^{Ser473}$, $Ki-67/pS6^{Ser235/236}$ y $PTEN$ en diferentes núcleos de matriz de PC. (B) La tinción positiva de $pAkt^{Ser473}$ (marrón) se limitó principalmente al citoplasma y ocasionalmente al núcleo de las células epidérmicas basales. La inmunotinción doble $Ki-67/pS6^{Ser235/236}$ mostró muchas de las células epidérmicas positivas para $pS6^{Ser235/236}$ (rojo) localizadas en el estrato basal y en las primeras capas celulares del estrato espinoso. Además, muchas de las células basales positivas para $pS6^{Ser235/236}$ (rojo) coexpresaron $Ki-67$ (tinción nuclear negra). La inmunotinción $PTEN$ mostró reacción positiva citoplasmática (marrón) en el estrato basal y en las primeras capas celulares del estrato espinoso. La barra de escala representa 300 μm (A) y 50 μm (B).

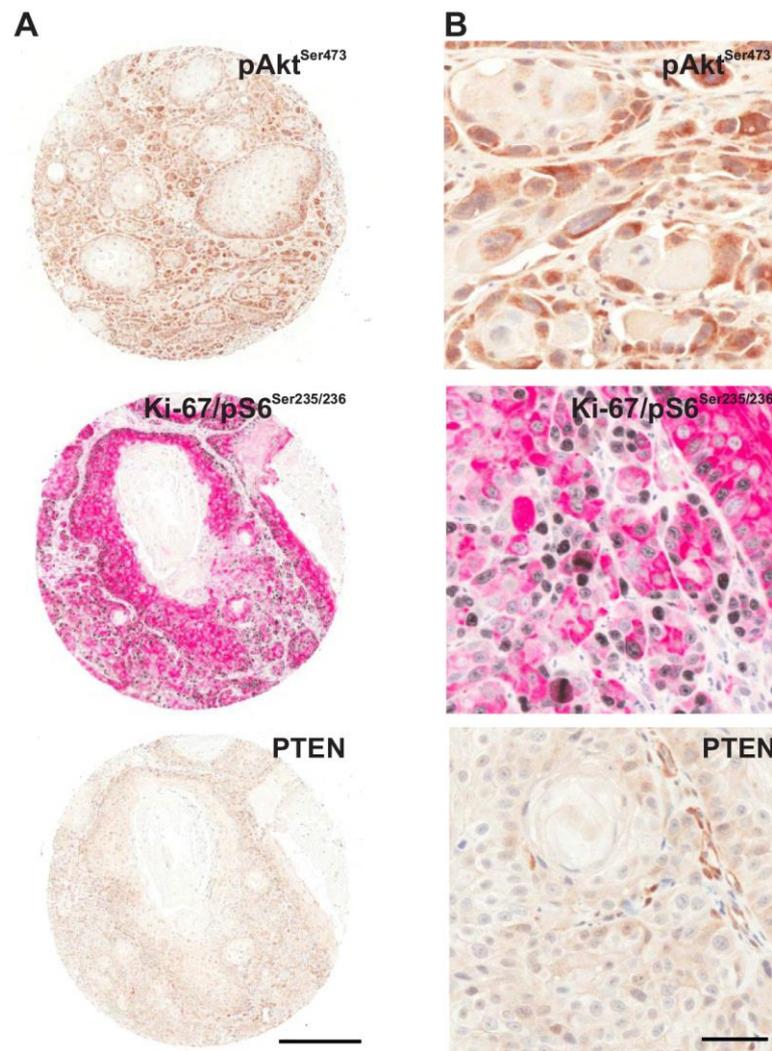


Figura 8. (A) Inmunodetección de $pAkt^{Ser473}$, $Ki-67/pS6^{Ser235/236}$ y $PTEN$ en diferentes núcleos de matriz de CCEC. (B) La tinción de $pAkt^{Ser473}$ reveló una alta inmunoreactividad citoplasmática y nuclear (marrón), que fue aún más intensa en las áreas invasivas de los tumores. La inmunodetección de $pS6^{Ser235/236}$ mostró una tinción citoplasmática de moderada a fuerte (roja), más notable a lo largo de los bordes invasivos de los CCECs. Además, la inmunotinción $pS6^{Ser235/236}$ mostró que muchas de las células con fuerte tinción citoplasmática (roja) también se localizaban en los estratos basal y en las primeras capas del estrato espinoso. Además, muchas de las células basales positivas para $pS6^{Ser235/236}$ (rojo) coexpresaron $Ki-67$ (tinción nuclear negra). La inmunotinción $PTEN$ mostró una reacción positiva citoplasmática (marrón) en el estrato basal y en las primeras capas celulares del estrato espinoso. La barra de escala representa 300 μm (A) y 50 μm (B).

III. 5. *YAP*

En las muestras de EN se observó un número bajo de células epidérmicas positivas para *YAP* (Figura 9; Tabla 5, Anexo). La inmunotinción de *YAP* reveló una expresión citoplasmática en unas pocas células epidérmicas del estrato granuloso (Figura 10), a excepción de algunas muestras en las que también se observó un patrón nuclear en algunas células del estrato basal.

En las muestras de EPN, así como también en la mayoría de las muestras de PC (31/36; 86%), se observó un gran número de células epidérmicas positivas para *YAP* (Figura 9; Tablas 6-7, Anexo). La inmunotinción de *YAP* mostró una inmunorreactividad citoplasmática y ocasionalmente nuclear localizada en las células de los estratos basal, espinoso y granuloso (Figura 10). Un hallazgo interesante en los PCs fue que las células con expresión intensa para *YAP* localizadas en los estratos espinoso y granuloso eran coilocitos.

En la mayoría de las muestras de CCEC (114/140; 81,42%) se observó una gran cantidad de células epidérmicas positivas para *YAP* (Figura 9; Tabla 8, Anexo). La expresión de *YAP* tuvo una localización citoplasmática y, ocasionalmente, nuclear principalmente limitada a las células epidérmicas basales y espinosas (Figura 10). Particularmente, esta expresión fue más elevada en los pequeños cúmulos y cordones infiltrativos de células neoplásicas (Figura 10).

Finalmente, la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en los porcentajes de células positivas para *YAP* entre las muestras de EN y EPN ($P < 0,0001$), PC ($< 0,0001$), y CCEC ($< 0,0001$).

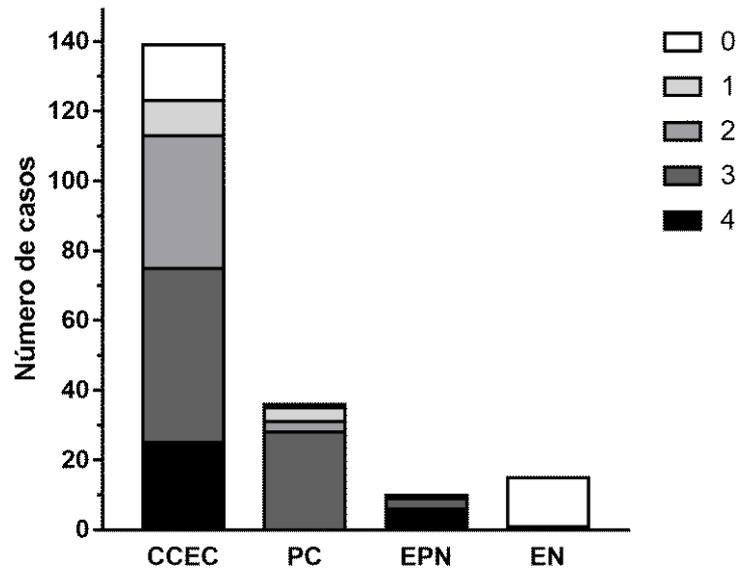


Figura 9. Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica para *YAP* en muestras de EN, EPN, PC y CCEC. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células epidérmicas positivas/células totales. Puntuación: 0, menos del 10% de las células teñidas; 1, entre 10 y 25%; 2, entre 25 y 50%; 3, entre 50 y 75%; 4, entre 75 y 100%.

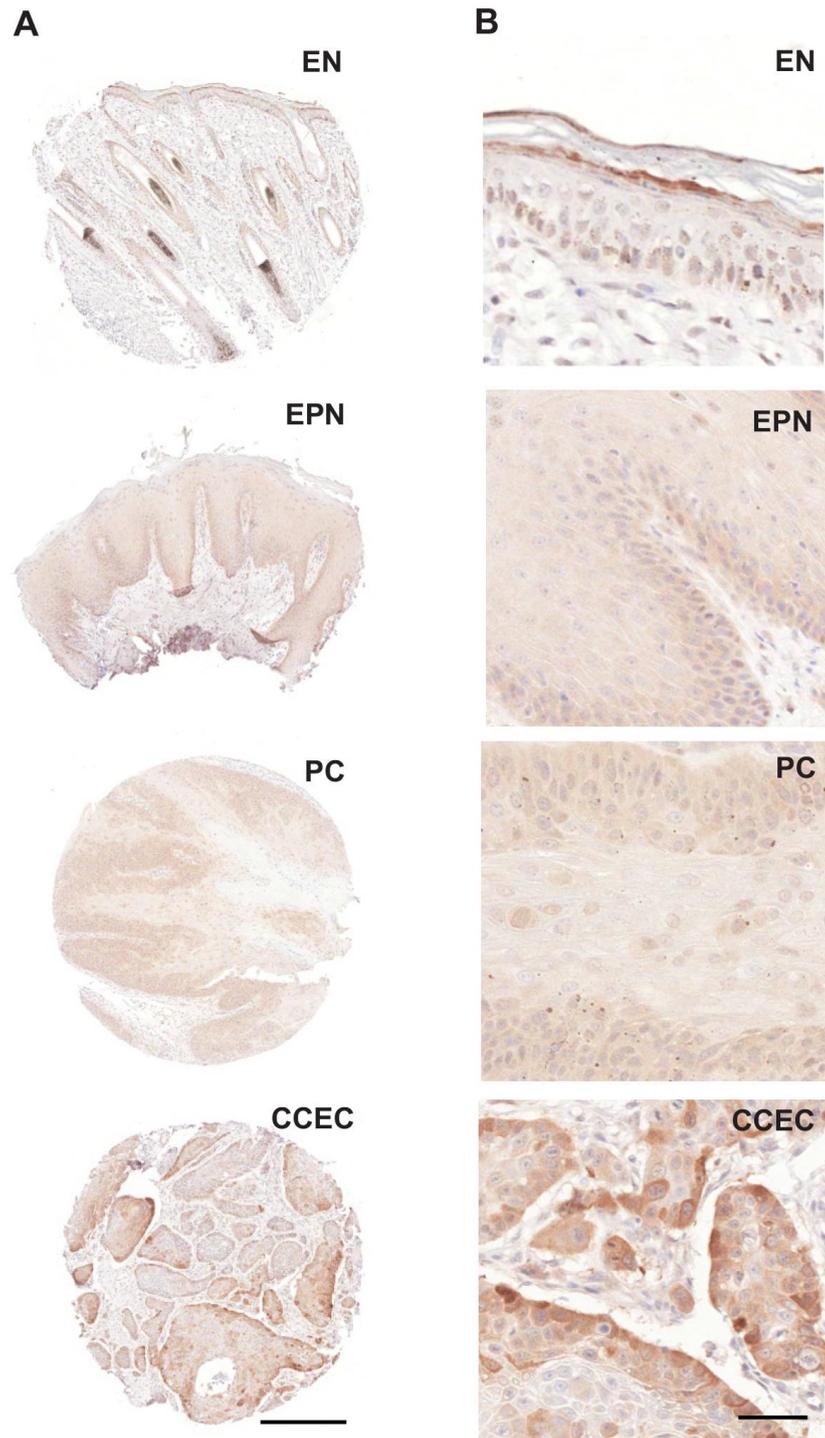


Figura 10. (A) Inmunodetección de *YAP* en núcleos representativos de matriz de EN, EPN, PC y CCEC. (B) En la mayoría de las muestras de EN se observó tinción positiva de *YAP* (marrón) en el citoplasma de algunas células del estrato granuloso. En las muestras de EPN, PC y CCEC la expresión de *YAP* (marrón) estuvo limitada principalmente al citoplasma y ocasionalmente al núcleo de las células del estrato basal, espinoso y granuloso. La barra de escala representa 300 μm (A) y 50 μm (B).

III. 6. β -catenina

En las muestras de EN se observó un gran número de células epidérmicas positivas para β -catenina (Figura 11; Tabla 5, Anexo). La expresión de β -catenina mostró una localización citoplasmática y de membrana limitada a las células de los estratos basal, espinoso y granuloso (Figura 12). En el estrato basal, la inmunomarcación de membrana para β -catenina estuvo ausente en la membrana celular adyacente a la dermis. Además, se observó una expresión nuclear de β -catenina en unas escasas células aisladas del estrato granuloso.

En las muestras de EPN, así como también en la mayoría de las muestras de PC (22/36; 61%), se observó un elevado número de células epidérmicas positivas para β -catenina (Figura 11; Tablas 6-7, Anexo). La inmunotinción para β -catenina estuvo localizada principalmente en la membrana y el citoplasma de las células de los estratos basal, espinoso y granuloso. Además, se observó una expresión nuclear en algunas células de los estratos espinoso y granuloso (Figura 12). Un hallazgo interesante en los PCs fue que muchas de las células con marcación nuclear positiva para β -catenina eran coilocitos (Figura 12).

En la mayoría de las muestras de CCEC (71/140; 50,71%) se observó una gran cantidad de células epidérmicas positivas para β -catenina (Figura 11; Tabla 8, Anexo). La expresión de β -catenina tuvo una localización principalmente citoplasmática, mientras que la inmunomarcación de membrana se observó únicamente en las células tumorales más diferenciadas (Figura 12). Coincidentemente, la expresión de membrana estuvo reducida o ausente en los pequeños cúmulos y cordones infiltrativos de células neoplásicas. Además, muchas células neoplásicas mostraron también un marcaje nuclear positivo para β -catenina.

Por último, la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en los porcentajes de células positivas para β -catenina entre las muestras de EN y CCEC ($P <$

0,0001), mientras que no se encontraron diferencias significativas respecto a las muestras de EPN y PC.

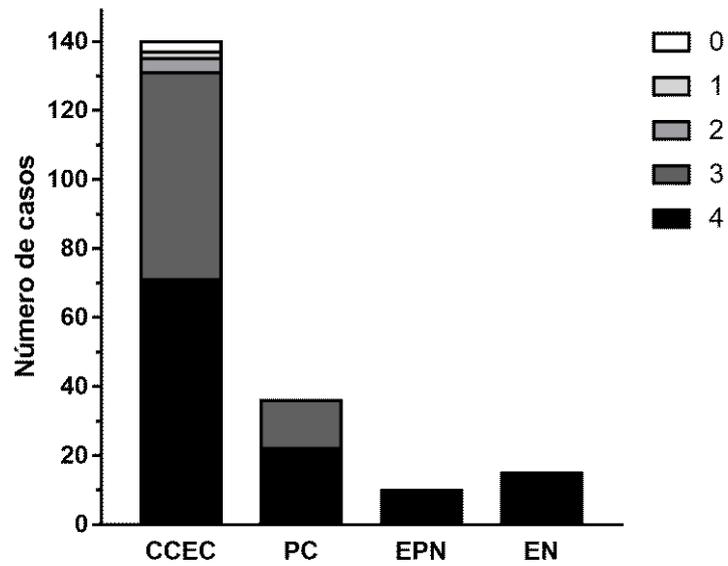


Figura 11. Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica para β -catenina en muestras de EN, EPN, PC y CCEC. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células epidérmicas positivas/células totales. Puntuación: 0, menos del 10% de las células teñidas; 1, entre 10 y 25%; 2, entre 25 y 50%; 3, entre 50 y 75%; 4, entre 75 y 100%.

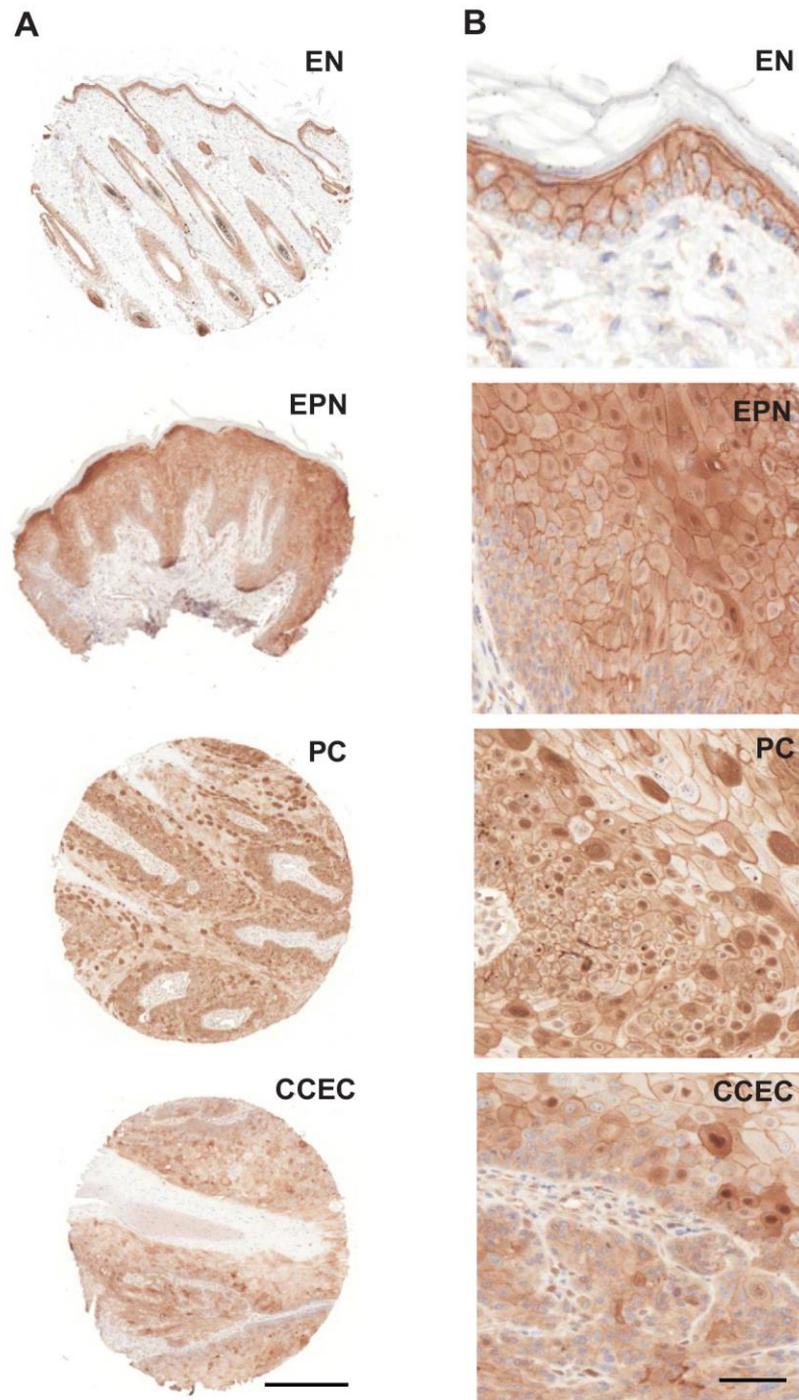


Figura 12. (A) Inmunodetección de β -catenina en núcleos representativos de matriz de EN, EPN, PC y CCEC. (B) Las células positivas para β -catenina (marrones) mostraron una fuerte tinción de membrana y un patrón citoplasmático limitado a los estratos epidérmicos basal, espinoso y granuloso en las muestras de EN, EPN y PC. Además, en las muestras de EPN y PC se observó una expresión nuclear en algunas células de los estratos espinoso y granuloso. Los CCECs mostraron una expresión de β -catenina principalmente citoplasmática, mientras que la inmunomarcación de membrana estuvo reducida o ausente. La barra de escala representa 300 μm (A) y 50 μm (B).

III. 7. E-cadherina

En las muestras de EN se observó una elevada cantidad de células epidérmicas positivas para E-cadherina (Figura 13; Tabla 5, Anexo). La expresión de E-cadherina se limitó a la membrana y al citoplasma de las células de los estratos basal, espinoso y granuloso (Figura 14). En el estrato basal, la inmunomarcación de membrana para E-cadherina estuvo ausente en la membrana celular adyacente a la dermis.

En las muestras de EPN, así como también en la mayoría de las muestras de PC (30/36; 83%), se observó una elevada cantidad de células epidérmicas positivas para E-cadherina (Figura 13; Tablas 6-7, Anexo). La expresión de esta molécula estuvo principalmente limitada a la membrana de las células de los estratos basal, espinoso y granuloso (Figura 14). Un hallazgo interesante en los PCs fue que los coilocitos mostraron una elevada expresión citoplasmática para E-cadherina (Figura 14).

En la mayoría de las muestras de CCEC (113/140; 80,71%) se observó una reducida cantidad de células epidérmicas positivas para E-cadherina (Figura 13; Tabla 8, Anexo). La expresión de E-cadherina estuvo principalmente limitada a las áreas más diferenciadas de los tumores, donde mostró una localización de membrana en las células de los estratos basal, espinoso y granuloso (Figura 14). La reducción de la expresión de E-cadherina se observó en los pequeños cúmulos o cordones infiltrativos de células neoplásicas.

Finalmente, la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en los porcentajes de células positivas para E-cadherina entre la EN y los CCEC ($P = 0$), mientras que no se observaron diferencias significativas respecto a EPN y PC.

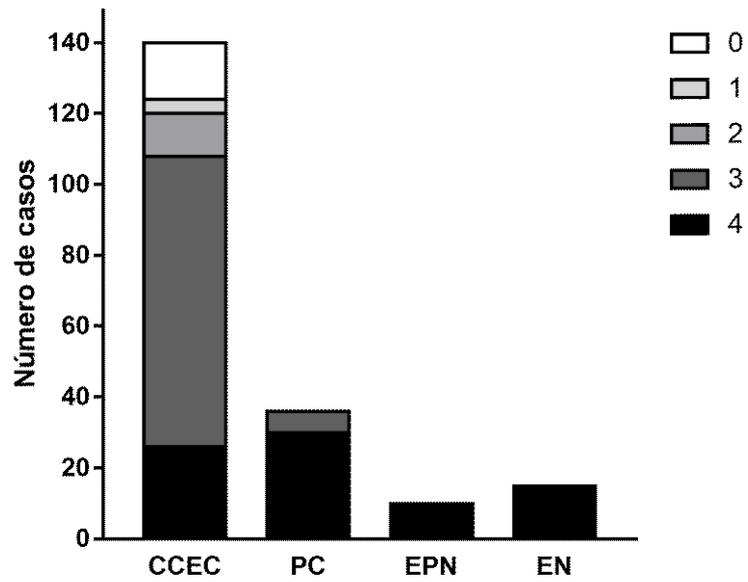


Figura 13. Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica para E-cadherina en muestras de EN, EPN, PC y CCEC. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células epidérmicas positivas/células totales. Puntuación: 0, menos del 10% de las células teñidas; 1, entre 10 y 25%; 2, entre 25 y 50%; 3, entre 50 y 75%; 4, entre 75 y 100%.

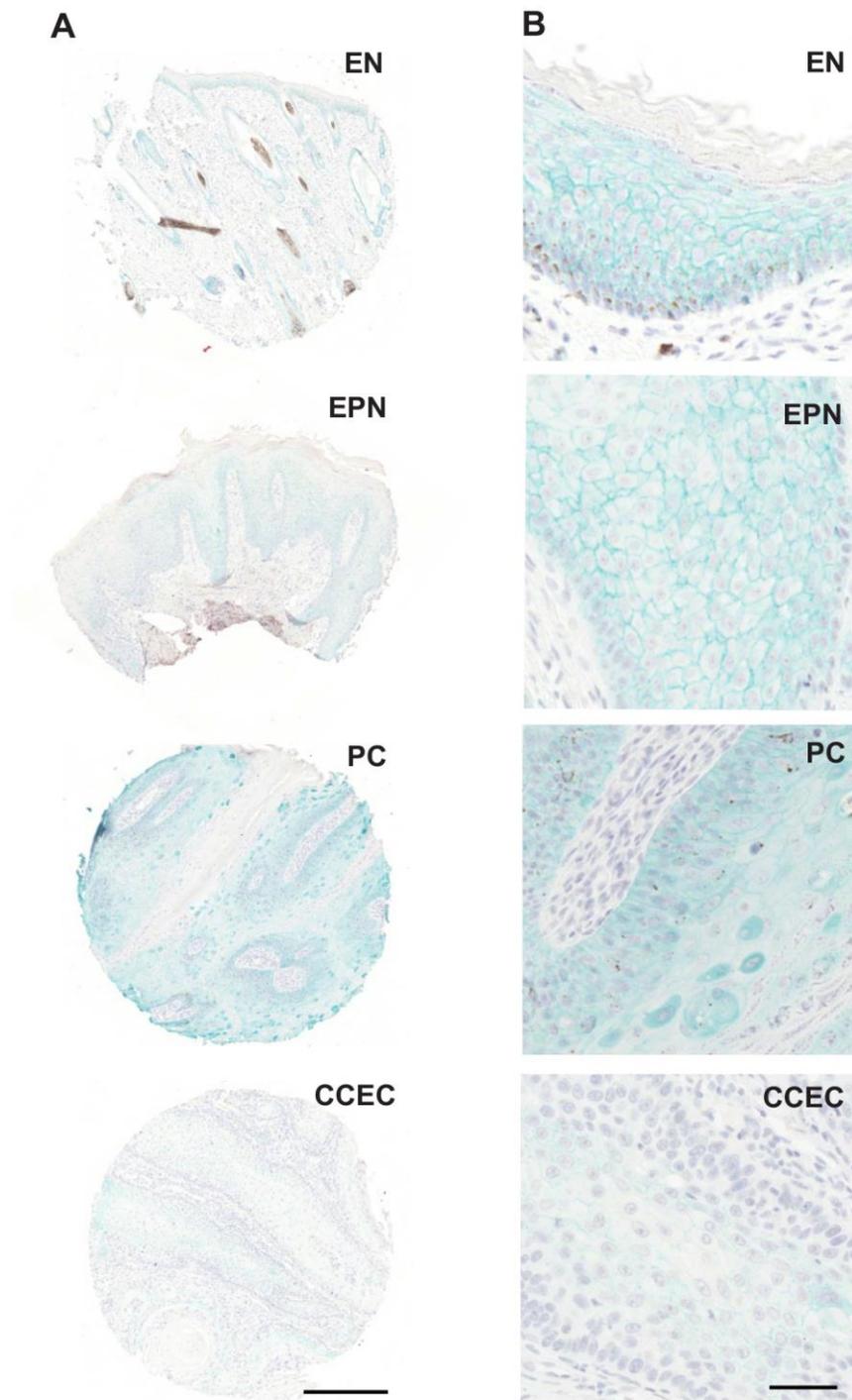


Figura 14. (A) Inmunodetección de E-cadherina en núcleos representativos de matriz de EN, EPN, PC y CCEC. (B) La expresión de E-cadherina (verde) estuvo localizada en la membrana y el citoplasma de las células de los estratos basal, espinoso y granuloso en las muestras de EN, EPN, PC y CCEC. La barra de escala representa 300 μm (A) y 50 μm (B).

III.8. p63/CK5

En las muestras de EN se observó una elevada cantidad de células epidérmicas positivas tanto para p63 como para CK5 (Figura 15; Tabla 5, Anexo). p63 se expresó en forma constante en los núcleos de las células epidérmicas del estrato basal, mientras que su expresión se redujo en forma gradual desde el estrato espinoso hacia la superficie epidérmica (Figura 16). Respecto a la CK5, se expresó en el citoplasma de las células de los estratos basal, espinoso y granuloso (Figura 16).

En las muestras de EPN, así como también en las de PC, la expresión de p63/CK5 estuvo conservada (Figura 15; Tablas 6-7, Anexo). p63 se expresó en forma constante en los núcleos de las células epidérmicas del estrato basal, mientras que su expresión se redujo en forma gradual desde el estrato espinoso hacia la superficie epidérmica (Figura 16). Un hallazgo interesante en los PCs fue que los coilocitos mostraron una fuerte expresión nuclear de p63. Respecto a la CK5, mostró una expresión citoplasmática en los estratos basal, espinoso y granuloso (Figura 16).

En las muestras de CCEC se observaron dos patrones de expresión para p63, uno típico y otro atípico (Figura 15; Tabla 8, Anexo). La marcación típica se observó en 101/140 (72%) de las muestras de CCEC, donde p63 se expresó principalmente en los núcleos de las células del estrato basal, para reducir su expresión en forma gradual desde el estrato espinoso hacia la superficie epidérmica. En contraste, la marcación atípica se observó en el resto de los casos de CCEC (39/140; 28%), donde p63 reveló una tinción positiva fuerte en todos o casi todos los estratos epidérmicos (figura 16). De hecho, en estos CCECs la inmunorreactividad frente a p63 fue más intensa a lo largo de los bordes invasivos de los tumores. Con respecto a la expresión CK5, todos los CCECs presentaron una inmunorreactividad citoplasmática en las células de los estratos basal, espinoso y granuloso.

La prueba de Kruskal-Wallis no mostró diferencias significativas en los porcentajes de células positivas para p63 entre los diferentes grupos de muestras, así como tampoco para CK5.

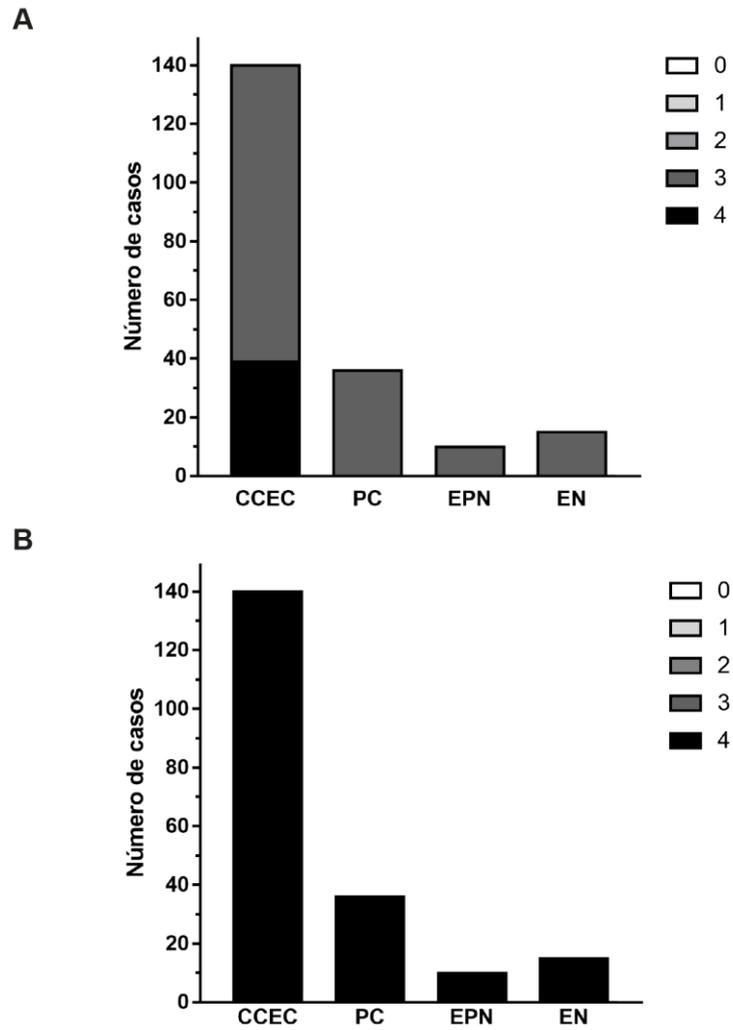


Figura 15. Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica para p63 (A) y CK5 (B) en muestras de EN, EPN, PC y CCEC. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células epidérmicas positivas/células totales. Puntuación: 0, menos del 10% de las células teñidas; 1, entre 10 y 25%; 2, entre 25 y 50%; 3, entre 50 y 75%; 4, entre 75 y 100%.

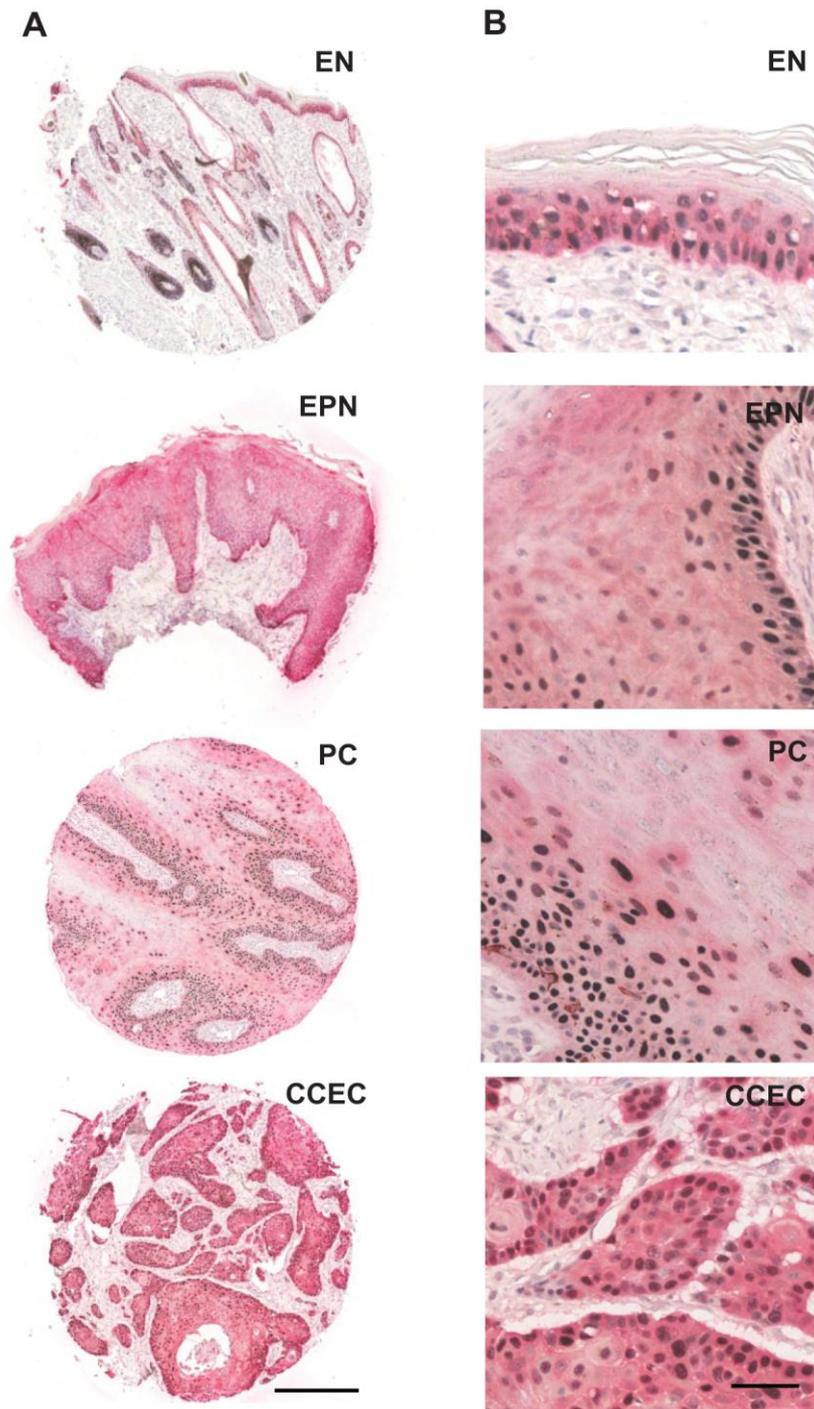


Figura 16. (A) Inmunodetección de p63 y CK5 en núcleos representativos de matriz de EN, EPN, PC y CCEC. (B) En las muestras de EN, EPN y PC las células epidérmicas positivas para p63 mostraron una tinción nuclear (negro) localizada en el estrato basal, con una reducción de la expresión en los sucesivos estratos epidérmicos. En los CCECs se observaron dos patrones de tinción, uno típico y otro atípico. La imagen muestra el patrón atípico con una tinción positiva para p63 (negro) en todos o casi todos los estratos epidérmicos. La expresión de CK5 (rojo) estuvo limitada al estrato basal, espinoso y granuloso en las muestras de EN, EPN, PC y CCEC. La barra de escala representa 300 μm (A) y 50 μm (B).

III. 9. Análisis de agrupamiento jerárquico

La disponibilidad de una gran cantidad de muestras de CCEC en los que los marcadores moleculares seleccionados se analizaron simultáneamente, permitió utilizar herramientas como el análisis de agrupamiento jerárquico o conglomerados para encontrar grupos de casos relativamente homogéneos en función de sus similitudes en la expresión de los marcadores analizados (Figura 17).

El análisis de agrupamiento jerárquico mostró una alta correlación entre las moléculas de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR*, *pS6^{Ser235/236}*, *pAkt^{Ser473}* y *pEGFR^{Tyr106}*; mientras que no se observó una correlación significativa respecto a *PTEN*. Curiosamente, *PTEN* mostró una fuerte correlación con *YAP*, así como también con p63. Por otra parte, se observó una estrecha correlación entre E-cadherina y β -catenina. Respecto a CK5, segregó en forma independiente del resto de los marcadores.

Por otra parte, este análisis también reveló una clara separación en grupos de pacientes caninos con CCEC en base a la expresión de los marcadores analizados. En general, la activación de *pS6^{Ser235/236}* fue un evento frecuente en los CCECs caninos. Sin embargo, en algunos pacientes la activación de *pS6^{Ser235/236}* fue independiente de la activación de *pEGFR^{Tyr1068}*. A su vez, muchos pacientes mostraron niveles altos de activación de *YAP*. Respecto a estos pacientes, algunos mostraron una disminución en la expresión de *PTEN*, mientras que en otros se observó una elevada expresión. Asimismo, la mayoría de los casos también mostraron una elevada expresión de β -catenina y E-cadherina, así como también de p63. Todos los CCECs mostraron una expresión conservada de CK5.

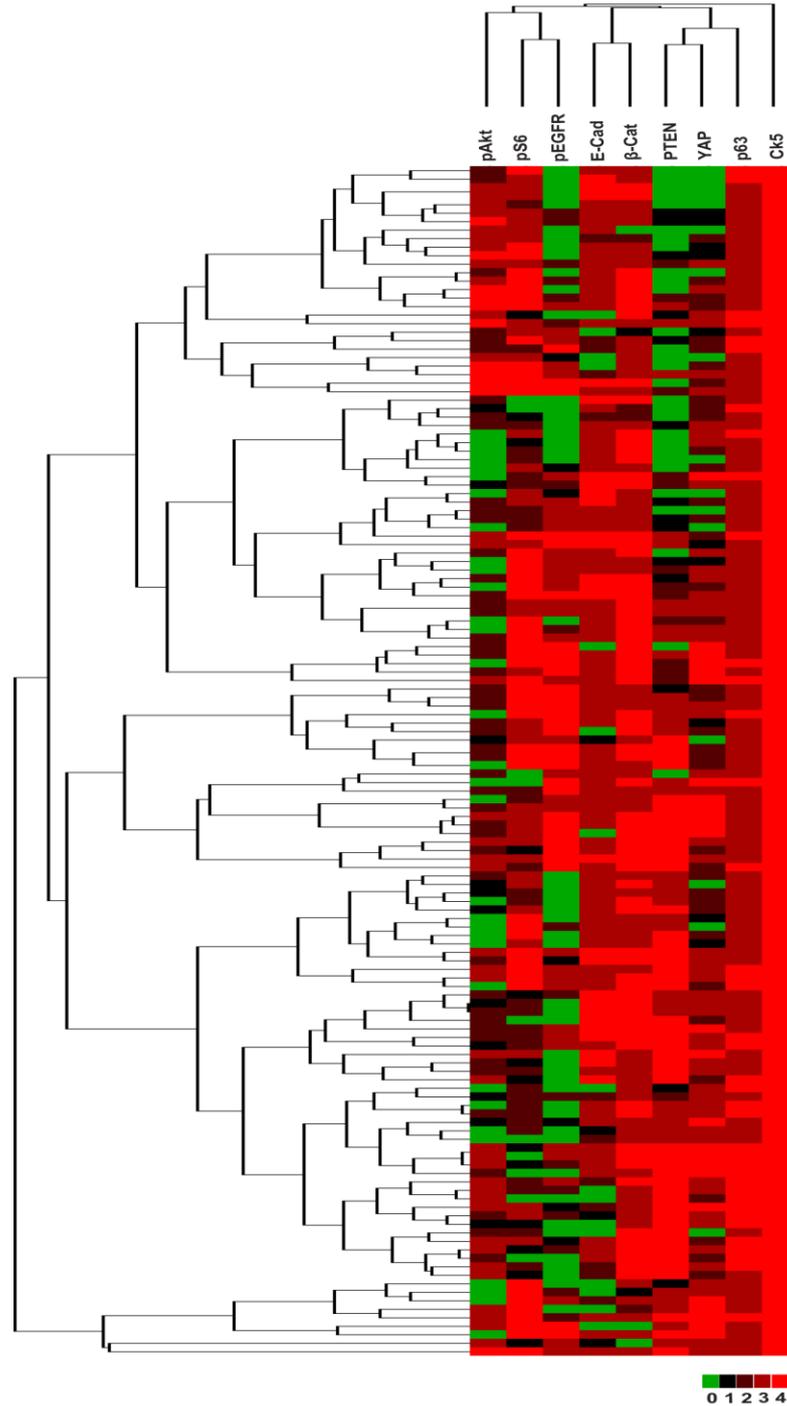


Figura 17. Análisis de conglomerados en muestras de CCEC. La cercanía de las columnas indica una correlación directa. Existe una fuerte correlación entre *pS6*, *pAkt* y *pEGFR*. *PTEN* segregó en forma lejana de las proteínas de la vía mTOR, mientras que mostró una correlación directa con *YAP*, así como también con *p63*. E-cadherina y β -catenina poseen una fuerte correlación. *CK5* segregó independientemente del resto de las moléculas. A su vez, la longitud y la subdivisión de las ramas muestra la relación entre los CCECs (izquierda) y las expresiones de las distintas proteínas (arriba). Los tejidos puntuados como 0 se representaron como verdes; 1, como negro; 2, como rojo oscuro; 3 como rojo más claro y 4 como rojo intenso.

CAPÍTULO IV

Discusión

La investigación dirigida a esclarecer cómo la actividad desregulada de las moléculas de señalización contribuye al desarrollo y progresión de las NEIF en caninos podría ayudar a identificar objetivos moleculares adecuados para el desarrollo de nuevas terapias en estos pacientes. Sin embargo, para establecer los eventos moleculares claves implicados en el desarrollo y progresión de estos tumores es necesario que las moléculas relevantes se evalúen en un gran número de muestras de diferentes pacientes en condiciones idénticas y estandarizadas. Por lo tanto, en la presente tesis se evaluó el patrón de expresión inmunohistoquímico de diferentes moléculas de señalización en secciones de MMT construidas a partir de muestras de EN, EPN, PC y CCEC de caninos para dilucidar la naturaleza de algunos de los mecanismos moleculares desregulados en las NEIF caninas.

IV. 1. *EGFR*

En la EN canina, la activación del *EGFR* se detectó principalmente en las células del estrato basal, mientras que su expresión se redujo en forma gradual hacia los queratinocitos terminalmente diferenciados. Si bien no se encontraron estudios que evaluaran la expresión del *pEGFR^{Tyr1068}* en la piel normal, los hallazgos de esta tesis coinciden con la expresión reportada para la forma no fosforilada del *EGFR* en la epidermis humana normal (Groves y

col., 1992; Nanney y col., 1984). Esta similitud puede estar relacionado con los múltiples procesos en los que está involucrado la activación del *EGFR* en condiciones normales en la epidermis, incluidos la proliferación, la diferenciación temprana, la migración, la supervivencia y la resistencia a la apoptosis de los queratinocitos (Joseph y col., 2015; Uribe y Gonzalez, 2011). En este contexto, la expresión de la forma fosforilada o activa del *EGFR* podría ser similar a la de su versión no fosforilada. Sin embargo, futuros estudios que evalúen la expresión del *pEGFR^{Tyr1068}* en relación a la expresión de su forma no fosforilada pueden resultar de interés para brindar mayor claridad sobre el papel que desempeña este receptor en la epidermis canina normal.

Por otra parte, la mayoría de los PCs caninos mostraron una elevada expresión del *pEGFR^{Tyr1068}*. En este sentido, estudios previos han demostrado que el *EGFR* cumple una función importante en la carcinogénesis epidérmica mediada por el virus de papiloma humano (*HPV*). En efecto, los queratinocitos inmortalizados por *HPV* exhiben la activación constitutiva del *EGFR* in vitro (Zyzak y col., 1994), mientras que la inhibición farmacológica de este receptor bloquea eficazmente el crecimiento y la supervivencia de los queratinocitos inmortales en el cultivo (Ben-Bassat y col., 1999, 1997). De modo similar, Woodworth y col. (2000) mostraron que la activación del *EGFR* es importante para la inmortalización de los queratinocitos de ratón por *HPV*, así como también para la progresión de estas células inmortales a papilomas y carcinomas. En este contexto, los hallazgos de la presente tesis demuestran que el *EGFR* desempeña un papel importante en el desarrollo de PCs también en los caninos.

El hecho que algunos papilomas mostraron una expresión reducida o ausente para *pEGFR^{Tyr1068}* indica que, si bien la activación del *EGFR* es importante para el desarrollo de los PCs caninos, puede no ser estrictamente necesaria. Estos hallazgos están alineados con

los observados en queratinocitos de ratón inmortalizados por *HPV*, donde el tratamiento con el promotor tumoral 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato indujo la formación de papilomas incluso en los injertos que contenían queratinocitos nulos para *EGFR* (Woodworth y col., 2000). Estos resultados sugieren que la progresión tumoral de los queratinocitos inmortalizados por virus de papiloma puede ocurrir también a través de vías independientes de la activación del *EGFR* (Woodworth y col., 2000). De modo similar, los resultados de un modelo murino de carcinogénesis epidérmica sugiere que una vez que se ha alcanzado una etapa determinada de crecimiento del tumor, la supervivencia de las células tumorales puede alcanzarse mediante la actividad de vías paralelas promotoras del crecimiento independientes de *EGFR* (Dahlhoff y col., 2011). Coincidentemente, en la presente tesis se observó que en los pacientes con expresión reducida o ausente para *pEGFR^{Tyr1068}*, la activación de *PI3K/Akt/mTOR* estaba conservada (ver sección *PI3K/Akt/mTOR*). En conjunto, estos resultados demuestran que el *EGFR* es importante, aunque no esencial, para la progresión de los PCs en caninos. De este modo, *EGFR* solo podría representar un potencial objetivo terapéutico en los pacientes caninos con PCs en los cuales se demuestre la activación de este receptor.

Finalmente, la inmunodetección de *pEGFR^{Tyr1068}* en todas las muestras de EPN, así como también en la mayoría de los CCECs caninos, demuestra que la activación en forma persistente de este receptor es un evento frecuente también en estas lesiones. En relación con estos resultados, estudios previos en humanos han demostrado una elevada expresión del *EGFR* tanto en lesiones epidérmicas preneoplásicas como así también en CCECs (Kikuchi y col., 1990; Nazmi y col., 1990). Sin embargo, Uribe y Gonzalez (2011) demostraron que solo 73% de los CCECs humanos analizados sobreexpresaron el *EGFR*. De modo similar, Fogarty y col. (2007) demostraron que solo el 43% de los CCECs humanos analizados mostraban

expresión del *EGFR*, de los cuales solo el 53% mostraba activación del receptor. Estos hallazgos son similares a los observados en la presente tesis, donde solo el 64% de los CCECs mostraron la expresión del *pEGFR^{Tyr1068}*. Estos resultados demuestran que la activación del *EGFR* es un evento importante, aunque no esencial, durante la progresión maligna de los queratinocitos epidérmicos en caninos.

Un hallazgo interesante fue que los CCECs en los que la expresión de *pEGFR^{Tyr1068}* estaba reducida o ausente, la activación de *pAkt^{Ser473}* y *pS6^{Ser235/236}* estaba conservada (ver sección *PI3K/Akt/mTOR*). Estos hallazgos coinciden con los encontrados previamente en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello en humanos (Molinolo y col., 2007), los cuales plantean la posible existencia de rutas independientemente de la activación de *EGFR* que pueden promover el crecimiento y la supervivencia de células tumorales. De modo similar, Fogarty y col. (2007) demostraron que solo algunos de los CCECs humanos que expresaban *EGFR* mostraron la activación de este receptor. Estos hallazgos, en conjunto con los obtenidos en la presente tesis, indican que el *EGFR* podría representar un potencial objetivo terapéutico solo en los pacientes caninos con CCEC en los que se haya verificado la activación de este receptor.

IV. 2. Vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR*

En la EN de caninos, *Akt^{Ser473}* se expresó en el citoplasma de unas pocas células del estrato granuloso, a excepción de algunas muestras en las que se observó un patrón de expresión nuclear limitado a algunas células del estrato basal. Estos resultados son similares a los informados por O'Shaughnessy y col. (2007), quienes describen la expresión constante de *pAkt^{Ser473}* en las capas más superficiales del estrato granuloso de la piel normal de ratones adultos, a excepción de la epidermis de la almohadilla plantar donde la expresión se limita al

estrato basal. La actividad de *Akt* en la capa basal de la epidermis normal puede estar asociada con la proliferación, supervivencia y diferenciación temprana de los queratinocitos, mientras que la actividad de *Akt* en el estrato granuloso puede relacionarse con la diferenciación terminal de los queratinocitos (O'Shaughnessy y col., 2007). Debido a que en la mayoría de las muestras de EN de caninos adultos la señalización de *Akt* se asoció con las células del estrato granuloso terminalmente diferenciadas, la activación de esta molécula parecería estar principalmente involucrada en la diferenciación terminal de los queratinocitos más que en su proliferación, de modo similar a lo sugerido previamente en la piel de ratones (Squarize y col., 2010). Sin embargo, se deben realizar más estudios para comprender mejor el papel que puede tener el patrón de marcación de *pAkt^{Ser473}* observado en las células del estrato basal de la epidermis canina normal.

pS6^{Ser235/236} se expresó en unas pocas células de los estratos espinoso y granuloso en la epidermis canina normal. Estos hallazgos son consistentes con estudios previos en ratones adultos que demuestran la fosforilación de S6 en los estratos suprabasales en la piel normal, donde las células se han retirado del ciclo celular y están comprometidas con la diferenciación terminal (Ding y col., 2016; Squarize y col., 2010). Estos estudios sugieren que, durante el mantenimiento epidérmico normal, S6 desempeña un papel principal en la diferenciación de los queratinocitos, pero no en la proliferación (Ding y col., 2016; Squarize y col., 2010). En este sentido, en el presente estudio se observó que en los queratinocitos caninos normales la expresión de *pS6^{Ser235/236}* no estuvo relacionada con la proliferación, a juzgar por la activación de S6 en forma independiente de Ki-67. Por lo tanto, los resultados de la presente tesis sugieren que en condiciones normales la actividad de S6 está relacionada con la diferenciación de los queratinocitos epidérmicos también en caninos.

Finalmente, la expresión de *PTEN* estuvo principalmente limitada al estrato basal, con una reducción gradual hacia los estratos más diferenciados. Estas observaciones están alineadas con las informadas previamente en la epidermis humana normal (Tsao y col., 2003). La expresión de *PTEN* observada principalmente en el estrato de células basales, sugiere la importancia de esta molécula en la regulación de la proliferación de los queratinocitos. En este sentido, un modelo de ratón genéticamente modificado demostró que la deficiencia de *PTEN* conduce a una epidermis hiperproliferativa y al incremento de la actividad de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* (Suzuki y col., 2003). En este contexto, *PTEN* podría desempeñar un importante papel en la regulación de la proliferación celular durante la homeostasis epidérmica al inhibir la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* en el compartimiento proliferativo del tejido también en los caninos.

Por otra parte, se observó que la activación en forma persistente de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* es un evento frecuente durante el proceso de carcinogénesis epidérmica en caninos, a juzgar por la elevada expresión de *pAkt^{Ser473}* y *pS6^{Ser235/236}* detectada en las muestras de EPN, PC y CCEC. En concordancia con estos resultados, en modelos murinos de carcinogénesis cutánea se demostró que la activación de *Akt* es un paso clave en las alteraciones progresivas que se producen durante el proceso de carcinogénesis epidérmica (Amornphimoltham y col., 2004; Segrelles y col., 2002). De modo similar, Amornphimoltham y col. (2005) demostraron la actividad aumentada de *S6* durante la progresión tumoral en carcinomas de cabeza y cuello de humanos. Estos hallazgos coinciden con los informados en CCECs humanos, donde se demostró que la activación persistente de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* desempeña un papel central en la carcinogénesis epidérmica (Bermudez y col., 2015; Chen y col., 2009; Hafner y col., 2010; Rittié y col., 2007). A su vez, la activación de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* también se demostró

en los queratinocitos humanos expuestos al *HPV* (Surviladze y col., 2013). De este modo, los resultados de la presente tesis indican que la activación persistente de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* tiene un papel importante durante el proceso de carcinogénesis epidérmica en caninos, tanto en el desarrollo de los CCECs como también durante la tumorigénesis mediada por virus de papiloma en los PCs, hallazgo que coincide con lo descrito en otras especies.

Un hallazgo interesante fue que la inmunotinción de *pAkt^{Ser473}* y *pS6^{Ser235/236}* reveló que muchas de las células con tinción citoplasmática positiva para estas moléculas se encontraban en el estrato de células basales proliferativas en las muestras de EPN, PC y CCEC de caninos. El hecho de que esta característica no se observara en las muestras de EN, respalda la idea de que la activación persistente de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* es un evento temprano durante el proceso de carcinogénesis epidérmica en caninos, de modo similar a lo sugerido previamente en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello humanos (Amornphimoltham y col., 2005, 2004). Además, la inmunodetección de doble color de Ki-67/*pS6^{Ser235/236}* mostró que muchas de las células basales que mostraban tinción de *pS6^{Ser235/236}* coexpresaban Ki-67. Estos hallazgos sugieren que en condiciones normales los queratinocitos basales pueden no depender estrictamente de la actividad de *mTOR* para proliferar, mientras que durante el proceso de carcinogénesis epidérmica la capacidad proliferativa de estas células tendría una mayor dependencia de la activación de la vía *mTOR*. Esta hipótesis fue sugerida previamente por Squarize y col. (2010), a partir de los resultados de un modelo de ratón genéticamente definido, en el cual la activación de *mTOR* aumentó drásticamente la proliferación y la migración de las células epidérmicas y, en consecuencia, la curación de heridas. De modo similar, Ding y col., (2016) sugieren que durante la

carcinogénesis epidérmica la capacidad proliferativa de los queratinocitos basales puede ser controlada por *mTOR*.

Además, se observó que la inmunodetección de *pS6^{Ser235/236}* fue más notable a lo largo de los bordes invasivos de los CCECs, un hallazgo que también se observó para *pAkt^{Ser473}*. Estos resultados son consistentes con los informados en humanos y ratones, en los que el patrón de expresión y el estado de activación de estas moléculas se correlaciona con la progresión tumoral (Amornphimoltham y col., 2005, 2004; Bermudez y col., 2015; Chen y col., 2009). Curiosamente, la proporción de muestras de CCECs caninos que fueron positivas para *Akt^{Ser473}* (77.14%) fue un poco menor que para *pS6^{Ser235/236}* (92,85%), lo que sugiere que una activación completa de *Akt* puede no ser necesaria para la activación de la vía de *mTOR* y la progresión tumoral, como se informó en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello humanos (Molinolo y col., 2007). A su vez, un hallazgo interesante fue que la activación de *pAkt^{Ser473}* y *pS6^{Ser235/236}* estuvo conservada en los pacientes en los que la expresión de *pEGFR^{Tyr1068}* estaba reducida o ausente. Estos hallazgos coinciden con lo informado previamente en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello en humanos, donde se demostró que la activación de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* puede ser independiente de la activación del *EGFR* (Molinolo y col., 2007). En este contexto, los resultados de la presente tesis demuestran que la activación de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* independientemente de la activación del *EGFR* es un evento frecuente también en CCECs caninos.

Finalmente, se observó una elevada expresión de *PTEN* en las muestras de EPN, mientras que su expresión estuvo reducida o ausente algunas muestras de PC y CCEC. Estos hallazgos pueden estar relacionados con el intento realizado por el tejido para restablecer el funcionamiento normal de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* durante las primeras

etapas de transformación maligna de los queratinocitos epidérmicos en caninos. Estos resultados contrastan con los de Segrelles y col., (2002) quienes, a partir de un modelo murino de carcinogenesis cutánea, sugieren que *PTEN* no es importante durante las etapas iniciales de la carcinogenesis epidérmica. Por otra parte, la disminución en la actividad de *PTEN* observada en algunos PCs, así como también en algunos CCECs, indica que las funciones supresoras de tumor de esta molécula pueden estar comprometidas durante la transformación de los queratinocitos epidérmicos, de modo similar a lo informado previamente en ratones (Segrelles y col., 2002). En este sentido, Suzuki y col., (2003) mediante un modelo murino demostraron que la ausencia de *PTEN* está relacionada con queratinocitos hiperproliferativos y, en consecuencia, con el desarrollo de tumores espontáneos como papilomas y carcinomas de células escamosas (Suzuki y col., 2003). En este modelo, el incremento de la proliferación y la resistencia a la apoptosis de los queratinocitos estuvo asociada con el incremento de actividad de las moléculas de señalización descendentes, entre los que cobra particular importancia *Akt* (Suzuki y col., 2003). En este sentido, el hecho de que en la presente tesis todas las muestras donde se observó una expresión reducida o ausente para *PTEN* expresaran *pS6^{Ser235/236}* apoya la hipótesis de que la disminución de la expresión de *PTEN* en el estadio tumoral provoca un aumento de la actividad de la vía de señalización de *PI3K/Akt/mTOR* y, en consecuencia, la desregulación de los procesos celulares en los cuales ésta vía de señalización está involucrada.

IV. 3. *YAP*

En la EN canina, la expresión de *YAP* estuvo principalmente localizada en el citoplasma de unas pocas células del estrato granuloso, a excepción de algunas muestras en las que se

observó un patrón nuclear en escasas células del estrato basal. Estos hallazgos son consistentes con la localización descrita en la epidermis normal de ratones (Beverdam y col., 2013; Schlegelmilch y col., 2011; Zhang y col., 2011). La expresión nuclear de *YAP* se relacionó con la promoción del crecimiento celular, así como también con la inhibición de la diferenciación de los queratinocitos epidérmicos basales (Zhang y col., 2011). En este sentido, distintos modelos murinos han demostrado la importancia que tiene la expresión regulada de *YAP* en la epidermis normal, principalmente por regular la proliferación de las células madre basales (Elbediwy y col., 2016; Schlegelmilch y col., 2011). Respecto a la localización citoplasmática de *YAP* en las células más diferenciadas, se relacionó con la fosforilación de esta proteína, lo cual inhibe su actividad, y modula su localización y su degradación (Zhao y col., 2007). Estos resultados, tomados en conjunto con lo observado en la presente tesis, sugieren que la regulación de la expresión de *YAP* y, en consecuencia, su localización celular, podría ser importante para el normal funcionamiento de los compartimentos proliferativos y terminalmente diferenciados en la epidermis canina.

Por otra parte, las muestras de EPN revelaron un gran número de células epidérmicas positivas para *YAP*, con una inmunorreactividad citoplasmática y ocasionalmente nuclear localizada en los estratos de células basales, espinoso y granuloso. Estos hallazgos son similares a los descritos en lesiones preneoplásicas epidérmicas en humanos (Debaugnies y col., 2018). En este sentido, el incremento de la expresión de *YAP* ha sido relacionada con el papel oncogénico de esta proteína y, en consecuencia, con su función promotora del crecimiento en la epidermis (Zhang y col., 2011). Por lo tanto, el incremento en la expresión de *YAP* en lesiones preneoplásicas caninas, así como también su relocalización del citoplasma al núcleo, sugieren que esta proteína desempeña un papel importante en estadios tempranos del proceso de carcinogénesis epidérmica también en los caninos.

En las muestras de PC se observó un gran número de células epidérmicas positivas para *YAP* con una inmunorreactividad citoplasmática y, ocasionalmente, nuclear localizada en los estratos de células basales, espinoso y granuloso. Estos hallazgos son similares a los descritos por Zanconato y col. (2015), quienes demuestran la importancia de la expresión de *YAP* en el desarrollo de los PCs mediante un modelo murino de carcinogénesis cutánea. En este modelo, la eliminación de *YAP* en las células epidérmicas basales suprimió, casi por completo, la formación de papilomas cutáneos (Zanconato y col., 2015). Los hallazgos de la presente tesis sugieren que la activación de *YAP* es un evento importante para el desarrollo de los PCs también en caninos. Además, se observó que, entre las células epidérmicas positivas para *YAP*, los coilocitos mostraban una expresión intensa para esta proteína. En este sentido, un estudio previo en cáncer de cuello de útero en humanos demostró que algunas de las proteínas del *HPV* pueden aumentar el nivel de expresión de *YAP* (He y col., 2015a). En este contexto, podemos inferir que la expresión desregulada de *YAP* en los queratinocitos caninos durante el desarrollo de los PCs podría estar relacionada con la infección por *CPV*.

En la mayoría de los CCECs se observó una gran cantidad de células epidérmicas positivas para *YAP*, cuya expresión tuvo una localización citoplasmática y nuclear en el estrato de células basales. La sobreexpresión de *YAP* se encontró principalmente en los pequeños cúmulos y cordones infiltrativos de células neoplásicas. Estos hallazgos son similares a los descritos en humanos donde la expresión nuclear de *YAP* se ha informado en los CCECs (Debaugnies y col., 2018; Jia y col., 2016). En este sentido, distintos modelos murinos han demostrado la importancia que tiene la expresión regulada de *YAP* tanto para el desarrollo epidérmico normal como para su adecuado mantenimiento, principalmente al regular la proliferación de las células madre basales (Elbediwy y col., 2016; Schlegelmilch

y col., 2011). En conjunto, los hallazgos de la presente tesis permiten inferir que la sobreexpresión de la proteína *YAP* podría estar involucrada en el desarrollo de los CCECs también en los caninos, al inducir la proliferación desregulada de los queratinocitos basales.

Un hallazgo interesante fue que algunos de los CCECs que mostraron una expresión moderada para *YAP*, presentaron una expresión reducida o ausente para *PTEN*. En este sentido, Tumaneng y col. (2012) demostraron que entre las moléculas cuya transcripción es inducida por *YAP* se encuentra la de un microARN que inhibe la traducción de *PTEN*, lo que provoca la activación de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* y, en consecuencia, de los procesos celulares que esta vía regula. En este contexto, los resultados de la presente tesis sugieren que podría existir un vínculo funcional entre estas moléculas de señalización también en los caninos. Sin embargo, el hecho de que en la presente tesis también se encontraran casos de CCEC con una elevada expresión de *YAP* junto con la de *PTEN*, sugiere que los mecanismos de control propuestos por Tumaneng y col. (2012), podrían no expresarse en todos los pacientes caninos. Sin embargo, futuros estudios que analicen en profundidad las bases moleculares que intervienen en la coordinación de estas dos vías de señalización claves podrían brindar mayor claridad en este aspecto.

IV. 4. β -catenina

En la epidermis canina normal, β -catenina mostró una intensa expresión citoplasmática y de membrana en las células epidérmicas de los estratos basal, espinoso y granuloso. Estos hallazgos coinciden con los hallados por Bongiovanni y col. (2011) quienes describen la expresión de β -catenina en la epidermis normal de caninos adultos. En este sentido, la expresión de β -catenina localizada en la membrana celular de los queratinocitos demuestra el papel importante que desempeña esta molécula en la adhesión celular en condiciones

normales en los caninos (Bongiovanni y col., 2011). Además, se observó, de manera inconstante, una expresión nuclear de β -catenina en unas pocas células del estrato granuloso. De acuerdo con interpretaciones previas, dicha expresión podría indicar que esos queratinocitos están sometidos a desprendimiento y, frente a la pérdida de las uniones adherentes, se libera la β -catenina que podría acumularse en el citoplasma y translocarse al núcleo (Bongiovanni y col., 2011; Tsuji y col., 2001). En este sentido, según Hampton y col. (2007) se observa una marcación nuclear β -catenina solo en unas pocas células del estrato granuloso debido a que, tras su incremento en el citoplasma, la β -catenina se ubiquitina para prevenir eventos de señalización anormales.

Por otra parte, en las muestras de EPN la expresión de membrana de β -catenina estuvo conservada, mientras que se encontró una elevada expresión citoplasmática, así como también un incremento de la expresión nuclear en células de los estratos espinoso y granuloso. Estos hallazgos coinciden en parte con los informados previamente en lesiones epidérmicas preneoplásicas en humanos (Brasanac y col., 2005; He y col., 2015b; Lyakhovitsky y col., 2004), donde también se observa un incremento de la expresión nuclear de β -catenina pero que, a diferencia de lo observado en el presente estudio, está acompañado de la reducción de la expresión de membrana de dicha proteína. En este sentido, el incremento de la expresión de β -catenina nuclear independientemente de la expresión de membrana podría estar relacionada con la actividad desregulada de la vía de señalización de Wnt o de las moléculas encargadas de su degradación en etapas tempranas del proceso de carcinogénesis epidérmico. A su vez, el hecho de que no se observara una reducción de la expresión de membrana de β -catenina en las lesiones epidérmicas preneoplásicas caninas puede estar relacionado con el grado de displasia de dichas lesiones. De modo similar,

Papadavid y col., (2002) observaron alteraciones en la expresión de β -catenina solo en una escasa proporción de lesiones displásicas intraepidérmicas humanas analizadas.

En los PCs la expresión de membrana de β -catenina estuvo conservada, mientras que se observó una elevada expresión citoplasmática, así como también un incremento de la expresión nuclear en células de los estratos espinoso y granuloso. Estos hallazgos son similares a los reportados previamente en ratones a partir de un modelo de carcinogénesis cutánea (Bhatia y Spiegelman, 2005). A su vez, un hallazgo interesante en los PCs caninos fue que muchas de las células con marcación nuclear positiva para β -catenina eran coilocitos. En este sentido, Uren y col. (2005) investigaron el papel de la señalización Wnt en la transformación de los queratinocitos humanos positivos para el virus de papiloma humano (HPV). En este modelo *in vitro*, la activación de la vía canónica Wnt promueve específicamente la transformación de queratinocitos humanos primarios infectados por el HPV (Uren y col., 2005). Por lo tanto, es posible que la activación de la vía canónica de Wnt sea uno de los mecanismos moleculares desregulados que facilitan el desarrollo y la progresión de los PCs en caninos.

En la mayoría de los CCECs se observó una gran cantidad de células epidérmicas positivas para β -catenina con localización principalmente citoplasmática, mientras que la inmunomarcación de membrana se observó únicamente en las células tumorales más diferenciadas. De hecho, la expresión de membrana estuvo reducida o ausente en los pequeños cúmulos y cordones infiltrativos de células neoplásicas. Estos hallazgos coinciden con un estudio previo en CCECs caninos, donde la reducción o pérdida de la expresión de la membrana de β -catenina fue implicada en la adquisición del fenotipo celular móvil, lo cual resulta un paso clave en la progresión tumoral (Bongiovanni y col., 2011). De este modo, la expresión de membrana de β -catenina reducida o ausente en los CCECs caninos, sumado al

incremento de su expresión citoplasmática, sugiere que esta molécula desempeña un importante papel como marcador de la integridad de las uniones de tipo adherentes. En este sentido, la evaluación de la expresión de β -catenina junto con otras moléculas involucradas en el medio de unión adherente, como la E-cadherina, demostró que existe una estrecha correlación en la expresión de estas moléculas (véase sección E-cadherina). Estos hallazgos sugieren que uno de los posibles orígenes del incremento en la inmunomarcación de β -catenina citoplasmática es su liberación desde las uniones adherentes.

Finalmente, el hecho que muchas células neoplásicas mostraron también un marcación nuclear positiva para β -catenina sugiere que la vía de señalización de Wnt y, en consecuencia, las moléculas encargadas de la degradación de la β -catenina, se encuentran desreguladas en los CCECs caninos, de modo similar a lo previamente sugerido (Bongiovanni y col., 2011). En este sentido, Inoki y col., (2006) mediante el uso de cultivos celulares demostraron que la inhibición de *GSK3 β* producida por la activación de la vía de señalización Wnt no solo provoca un incremento de la β -catenina citoplasmática, sino que también previene la inducción del complejo *TSC*, un inhibidor de *mTOR*, lo que conduce a la activación de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR*. En este sentido, el hecho de que la mayoría de los pacientes caninos que mostraron una sobreexpresión de β -catenina mostraron la activación persistente de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* sugiere que podría existir un vínculo funcional entre estas vías de señalización en los CCECs caninos.

IV. 5. E-cadherina

En la EN se observó una elevada cantidad de células positivas para E-cadherina, cuya expresión estuvo principalmente limitada a la membrana de las células de los estratos basal, espinoso y granuloso. Estos hallazgos coinciden con los previamente descritos por

Bizikova y col., (2011) quienes demuestran la expresión de E-cadherina mediante inmunofluorescencia en la epidermis normal de caninos adultos. La expresión de E-cadherina localizada en la membrana celular de los queratinocitos enfatiza el papel importante que desempeña esta molécula en la adhesión celular de la epidermis normal, mientras que la reducción de su expresión en los estratos espinoso y granuloso ha sido relacionada con el proceso de diferenciación terminal de los queratinocitos, lo que permite que estos puedan desprenderse de la superficie epidérmica (Kooy y col., 1999).

Por otra parte, en las muestras de EPN la expresión de membrana de E-cadherina estuvo conservada. Estos hallazgos son similares a los informados por Fuller y col. (1996), quienes demostraron una expresión de E-cadherina generalmente conservada en las lesiones preneoplásicas cutáneas en humanos. Sin embargo, otros autores muestran que la reducción de E-cadherina puede ser un hallazgo temprano durante el proceso de carcinogénesis epidérmica en humanos (Lyakhovitsky y col., 2004; Papadavid y col., 2002). Estos diferentes resultados pueden estar relacionados a que las lesiones preneoplásicas presenten distintos grados de displasia y, en consecuencia, a que involucren o no la pérdida de los medios de unión. En este sentido, Brouxhon y col. (2007) demostraron, mediante un modelo murino de carcinogénesis cutánea, la pérdida secuencial de contactos célula-célula mediados por E-cadherina a medida que las lesiones progresan de displasia a CCEC. En este contexto, los resultados de la presente tesis sugieren que la ausencia de expresión de E-cadherina no es un evento temprano en el proceso de carcinogénesis epidérmica en caninos. Sin embargo, futuros estudios que evalúen la expresión del E-cadherina en lesiones preneoplásicas con diferentes grados de displasia pueden resultar de interés para brindar mayor claridad sobre el papel que desempeña esta molécula en el proceso de carcinogénesis epidérmica canina.

En las muestras de PC, si bien la expresión de membrana de E-cadherina estuvo conservada, un hallazgo interesante fue que algunos coilocitos mostraron una elevada expresión citoplasmática para E-cadherina. Estos hallazgos son similares a los informados en humanos, donde los tejidos infectados con *HPV* de alto riesgo exhibieron patrones de tinción heterogéneos para E-cadherina, con una expresión de membrana débil y la aparición de un patrón citoplasmático (Leong y col., 2010). Esta pérdida de expresión de membrana y la relocalización citoplasmática fue relacionada con modificaciones postranscripcionales en la molécula de E-cadherina y la posterior interrupción de su translocación a través de la membrana celular mediada por *HPV* (Leong y col., 2010). El hecho de que la expresión citoplasmática no fuera un hallazgo frecuente en todos los PCs caninos sugiere que los efectos sobre la molécula de E-cadherina pueden diferir según el tipo de *CPV* involucrado en el desarrollo de la lesión, de modo similar a lo informado en humanos (Leong y col., 2010).

En los CCECs, si bien se observó una gran cantidad de células epidérmicas positivas para E-cadherina en las áreas más diferenciadas de los tumores, su expresión estuvo reducida o ausente en los cordones infiltrativos de células neoplásicas. Estos hallazgos son similares a los descritos previamente en los CCECs caninos, donde la reducción o pérdida de la expresión en la membrana de E-cadherina fue implicada en la adquisición del fenotipo maligno y la progresión tumoral (João y col., 2011). En este sentido, la adquisición del fenotipo maligno puede estar relacionada no solo con la pérdida de medios de unión, sino también a que los fragmentos de E-cadherina escindida disueltos en el citoplasma de las células neoplásicas o en la matriz extracelular de los CCECs caninos podrían estar involucrados en procesos de señalización celular, como ha sido previamente en los CCECs humanos (Brouxhon y col., 2014).

Finalmente, dado que la β -catenina desempeña un papel crítico en el control de la adhesión celular mediada por E-cadherina, la expresión de estas moléculas fue analizada en conjunto. En efecto, en los CCECs caninos, el patrón de expresión de β -catenina fue paralelo al de E-cadherina, de modo similar a lo previamente descrito en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello humanos (Andrews y col., 1997), así como también en CCECs humanos (Lyakhovitsky y col., 2004).

IV. 6. p63/CK5

En la EN canina, p63 se expresó en forma constante en los núcleos de las células del estrato basal, para reducir su expresión en forma gradual hacia los queratinocitos terminalmente diferenciados. Estos hallazgos coinciden con lo descrito previamente en la epidermis canina normal (Saraiva y col., 2008), así como también en la epidermis humana normal (Ivan y col., 2007; Pellegrini y col., 2001; Reis-Filho y col., 2002). p63 ha recibido una atención considerable en la investigación básica desde que Pellegrini y col. (2001) lo describieran como un marcador selectivo de células madre epidérmicas en humanos. De hecho, la localización de la expresión de p63 en las células del estrato basal fue relacionada con el rol fundamental que tiene esta proteína en el mantenimiento de las células madre epidérmicas, mientras que la reducción gradual de su expresión se relacionó con el papel que desempeña en la diferenciación inicial de los queratinocitos epidérmicos (Reis-Filho y col., 2002). En este contexto, p63 podría desempeñar un rol importante en el mantenimiento del potencial proliferativo y la prevención de la diferenciación de los queratinocitos basales también en caninos, convirtiéndolo como un marcador selectivo de células madre en la epidermis canina normal.

Por otra parte, se observó la coexpresión de p63 con CK5 en todas las muestras de EN canina. Este hallazgo podría estar relacionado con el papel que desempeña p63 en la diferenciación inicial de los queratinocitos epidérmicos (Reis-Filho y col., 2002). En este sentido, Yang y col. (1999) mediante un modelo de ratón p63^{-/-} demostraron que la expresión de moléculas relacionadas con la diferenciación escamosa tales como la CK5, está controlada por p63. Por lo tanto, se puede inferir que en la epidermis canina normal p63 podría desempeñar un papel no solo en el mantenimiento de la población de células madre progenitoras epidérmicas, sino también en el compromiso de los queratinocitos con el linaje epitelial escamoso. En este contexto, p63 podría inducir la expresión de marcadores de diferenciación como la CK5 y, poco después, reducir sus niveles de expresión.

En la EPN la expresión de p63/CK5 fue similar a la observada en la epidermis canina normal. Estos hallazgos coinciden con la expresión de p63 previamente informada en lesiones preneoplásicas epidérmicas en humanos (Sakiz y col., 2009). De modo similar, Bortoluzzi y col. (2004) describen una expresión de p63 conservada en lesiones displásicas orales en humanos. En conjunto con lo observado en la presente tesis, estos hallazgos sugieren que la expresión de p63 en los queratinocitos no se modifica durante el proceso de carcinogénesis. Sin embargo, en contraste con estos resultados, Reis-Filho y col., (2002) informaron una expresión difusa para p63 en todos los estratos epidérmicos en los CCECs *in situ*. Este patrón de expresión es comparable con el observado en neoplasias intraepiteliales de cuello de útero en humanos, donde se informó que la expresión de p63 aumenta en lesiones de alto grado (Martens y col., 2004; Selvi y col., 2014). En este contexto, los hallazgos observados en la presente tesis sugieren que, si bien la expresión de p63 podría estar relacionada con el grado de anaplasia presente en la lesión preneoplásica, el patrón de

expresión de p63 no se modifica durante los estadios iniciales del proceso de carcinogénesis epidérmica.

En los PCs, la expresión de p63/CK5 estuvo conservada respecto a la observada en la epidermis canina normal. Sin embargo, un hallazgo interesante fue que se observó que los coilocitos mostraron una fuerte expresión de p63. De modo similar, Mighty y Laimins (2011) demostraron que mientras los niveles de p63 normalmente disminuían con la diferenciación epitelial, se retiene una mayor cantidad de p63 en los queratinocitos humanos positivos para *HPV* que en los normales. En este sentido, la retención de p63 fue relacionada con un papel central en la activación de las funciones virales tardías del *HPV*, como la amplificación del genoma viral dependiente de la diferenciación y la expresión génica tardía (Mighty y Laimins, 2011). Estos resultados, analizados en forma conjunta con los obtenidos en la presente tesis, sugieren que la expresión persistente de p63 puede desempeñar un papel importante en el proceso de carcinogénesis de los queratinocitos infectados por *CPV*. A su vez, estos hallazgos apoyan la idea de que las células madre están involucradas en el desarrollo de los PCs en caninos.

En los CCECs se observaron dos patrones de expresión para p63, uno típico y otro atípico. El marcaje típico se observó en la mayoría de los CCECs, en el cual p63 se expresó en los núcleos de las células epidérmicas del estrato basal, para reducir su expresión en forma gradual hacia los queratinocitos terminalmente diferenciados. En contraste, los CCECs con marcaje atípico mostraron una tinción positiva fuerte en todos o casi todos los estratos epidérmicos. De hecho, en estos CCECs la inmunorreactividad frente a p63 fue más notable a lo largo de los bordes invasivos de los tumores. Un patrón de expresión similar para p63 fue informado previamente en los CCECs humanos (Di Como y col., 2002; Parsa y col., 1999; Reis-Filho y col., 2002), así como también en carcinomas de células escamosas orales

en perros (Mestrinho y col., 2015). En este contexto, la fuerte expresión de p63 observada en células anaplásicas de los CCECs sugiere que, además de su papel en el desarrollo epidérmico normal, el mantenimiento de la expresión de p63 es importante en el proceso de carcinogénesis epidérmica y que las células madre están involucradas en el desarrollo de los tumores epidérmicos.

Por otra parte, el hecho de que la expresión de p63/CK5 persistiera incluso en los CCECs pobremente diferenciados, sugiere que los patrones de tinción de estas moléculas no están relacionados con el nivel de diferenciación de los CCECs en caninos. De hecho, el análisis de conglomerados reveló que, si bien no hay una correlación directa en la expresión de p63/CK5 en los CCEC caninos, la expresión de estas moléculas se mantiene en los distintos pacientes. En este sentido, Kaufmann y col. (2001) evaluaron la inmunorreactividad de p63/CK5 en varios tipos de carcinomas, donde observaron que la expresión de dichas moléculas está conservada en carcinomas de células escamosas. Asimismo, estudios previos han sugerido el uso de p63 en forma conjunta con CK5 para diferenciar los carcinomas de células escamosas de carcinomas de otro origen, pobremente diferenciados o indiferenciados (Kaufmann y col., 2001; Reis-Filho y col., 2003). Por lo tanto, los hallazgos de la presente tesis indican que p63 podría ser útil en combinación con otros marcadores como CK5 para su uso como un marcador diagnóstico de diferenciación escamosa en los CCECs pobremente diferenciados.

CAPÍTULO V

Conclusiones

Es imperativo comprender los mecanismos moleculares desregulados que subyacen en el desarrollo de las NEIF caninas, ya que proporcionará una base racional para explorar nuevos enfoques terapéuticos dirigidos a moléculas para los pacientes caninos. En este sentido, la oportunidad de analizar simultáneamente el nivel de expresión y el estado de activación de distintas moléculas de señalización en una gran cantidad de muestras de lesiones epidérmicas preneoplásicas y neoplásicas reveló que las NEIF caninas pueden albergar alteraciones complementarias en múltiples rutas bioquímicas que convergen para impulsar la adquisición de un fenotipo maligno en los queratinocitos epidérmicos.

De este modo, en el presente estudio se demuestra que las moléculas implicadas en la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* están desreguladas durante el proceso de carcinogénesis epidérmica en caninos. En este contexto, la sobreexpresión de *pAkt^{Ser473}* y *pS6^{Ser235/236}* junto con la disminución de la expresión de *PTEN*, puede facilitar la progresión de las NEIF caninas mediante la desregulación de las funciones celulares claves en las que está implicada la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR*. A su vez, los resultados demuestran que, si bien la activación de *EGFR* está estrechamente relacionada con la activación de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* durante el proceso de carcinogénesis epidérmica en caninos, en algunos pacientes puede existir la activación de los objetivos descendentes de la vía

mTOR en forma independiente de la activación del *EGFR*. Además, se demuestra que muchos pacientes poseen una expresión desregulada de *YAP*, β -catenina y E-cadherina a lo largo del proceso de carcinogénesis epidérmica. Respecto a la expresión de β -catenina, en particular, el incremento en la expresión citoplasmática y nuclear observado en las NEIF caninas soportan la hipótesis de que la vía de señalización Wnt desempeña un papel importante en la carcinogénesis epidérmica en caninos.

Por otra parte, los hallazgos de la presente tesis permitieron identificar algunas de las moléculas de señalización que podrían representar objetivos moleculares adecuados para el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos en las NEIF en caninos. En este sentido, los hallazgos obtenidos proporcionan un marco molecular que señalan a la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* como un posible objetivo terapéutico, por lo que la investigación destinada a modular esta vía de señalización para el beneficio terapéutico de los pacientes caninos con NEIF puede progresar de forma razonada. De hecho, este estudio puede ser la base para el diseño y desarrollo de un ensayo clínico terapéutico con inhibidores de *mTOR* en pacientes caninos con NEIF que presenten una activación persistente de la vía de señalización de *mTOR* para determinar qué tan útiles serán estas moléculas en el entorno clínico. A su vez, el hecho de que se detectara la activación de la vía de señalización *PI3K/Akt/mTOR* en forma independiente de la activación de *EGFR* sugieren que los enfoques terapéuticos dirigidos a suprimir el crecimiento y la supervivencia de las células tumorales mediante el uso de inhibidores de *EGFR* serían ineficaces como únicos agentes terapéuticos en algunos pacientes con NEIF. Por lo tanto, la evaluación del estado de activación del *EGFR* sería de gran utilidad para identificar a los pacientes en los que podría ser exitoso el uso de inhibidores de *EGFR* como agente terapéutico.

Finalmente, el presente estudio permitió determinar marcadores inmunohistoquímicos aplicables al estudio tanto de lesiones preneoplásicas como neoplásicas de la epidermis interfolicular en caninos. En particular, en la presente tesis se demuestra, mediante la evaluación de p63 en forma conjunta con CK5, que las células madre epidérmicas desempeñan un papel importante en el desarrollo epidérmico normal, así como también durante el proceso de carcinogénesis epidérmica. Además, los hallazgos del presente trabajo indican que p63 podría ser útil en combinación con la CK5 como un marcador diagnóstico de diferenciación escamosa en CCECs pobremente diferenciados.

De este modo, los hallazgos obtenidos en la presente tesis permiten sustentar la hipótesis planteada en un comienzo: “Las NEIF expresan moléculas que pueden relacionarse con su comportamiento biológico”.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Alonso, L., Fuchs, E., 2003. Stem cells in the skin: Waste not, Wnt not. *Genes Dev.* 17, 1189–1200. <https://doi.org/10.1101/gad.1086903>
- (2) Amornphimoltham, P., Leelahavanichkul, K., Molinolo, A., Patel, V., Gutkind, J.S., 2008. Inhibition of mammalian target of rapamycin by rapamycin causes the regression of carcinogen-induced skin tumor lesions. *Clin Cancer Res.* 14, 8094–8101. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0703>
- (3) Amornphimoltham, P., Patel, V., Sodhi, A., Nikitakis, N.G., Sauk, J.J., Sausville, E.A., Molinolo, A.A., Gutkind, J.S., 2005. Mammalian target of rapamycin, a molecular target in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 65, 9953–9961. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0921>
- (4) Amornphimoltham, P., Sriuranpong, V., Patel, V., Benavides, F., Conti, C.J., Sauk, J., Sausville, E.A., Molinolo, A.A., Gutkind, J.S., 2004. Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01. *Clin Cancer Res.* 10, 4029–4037. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0249> [pii]
- (5) Andrews, N.A., Jones, A.S., Helliwell, T.R., Kinsella, A.R., 1997. Expression of the E-cadherin-catenin cell adhesion complex in primary squamous cell carcinomas of the head and neck and their nodal metastases. *Br J Cancer.* 75, 1474–80.
- (6) Athar, M., Kopelovich, L., 2011. Rapamycin and mTORC1 inhibition in the mouse:

skin cancer prevention. *Cancer Prev Res (Phila)*. 4, 957–61. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0266>

(7) Ben-Bassat, H., Rosenbaum-Mitrani, S., Hartzstark, Z., Levitzki, R., Chaouat, M., Shlomai, Z., Klein, B.Y., Kleinberger-Doron, N., Gazit, A., Tsvieli, R., Levitzki, A., 1999. Tyrphostins that suppress the growth of human papilloma virus 16-immortalized human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 290, 1442–57.

(8) Ben-Bassat, H., Rosenbaum-Mitrani, S., Hartzstark, Z., Shlomai, Z., Kleinberger-Doron, N., Gazit, A., Plowman, G., Levitzki, R., Tsvieli, R., Levitzki, A., 1997. Inhibitors of epidermal growth factor receptor kinase and of cyclin-dependent kinase 2 activation induce growth arrest, differentiation, and apoptosis of human papilloma virus 16-immortalized human keratinocytes. *Cancer Res*. 57, 3741–50.

(9) Bermudez, Y., Stratton, S.P., Curiel-Lewandrowski, C., Warneke, J., Hu, C., Bowden, G.T., Dickinson, S.E., Dong, Z., Bode, A.M., Saboda, K., Brooks, C.A., Petricoin, E.F., Hurst, C.A., Alberts, D.S., Einspahr, J.G., 2015. Activation of the PI3K/Akt/mTOR and MAPK signaling pathways in response to acute solar-simulated light exposure of human skin. *Cancer Prev Res*. 8, 720–728. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-14-0407>

(10) Beverdam, A., Claxton, C., Zhang, X., James, G., Harvey, K.F., Key, B., 2013. Yap Controls Stem/Progenitor Cell Proliferation in the Mouse Postnatal Epidermis. *J Invest Dermatol*. 133, 1497–1505. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.430>

(11) Bhatia, N., Spiegelman, V.S., 2005. Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling in mouse skin carcinogenesis. *Mol Carcinog*. 42, 213–21. <https://doi.org/10.1002/mc.20077>

(12) Bizikova, P., Linder, K.E., Olivry, T., 2011. Immunomapping of desmosomal and nondesmosomal adhesion molecules in healthy canine footpad, haired skin and buccal mucosal epithelia: comparison with canine pemphigus foliaceus serum immunoglobulin G

staining patterns. *Vet Dermatol.* 22, 132–142. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2010.00924.x>

(13) Bongiovanni, L., Malatesta, D., Brachelente, C., D'Egidio, S., Della Salda, L., 2011. β -Catenin in Canine Skin: Immunohistochemical Pattern of Expression in Normal Skin and Cutaneous Epithelial Tumours. *J Comp Pathol.* 145, 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.01.008>

(14) Bortoluzzi, M.C., Yurgel, L.S., Dekker, N.P., Jordan, R.C.K., Regezi, J.A., 2004. Assessment of p63 expression in oral squamous cell carcinomas and dysplasias. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endodontology.* 98, 698–704. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.04.001>

(15) Brasanac, D., Boricic, I., Todorovic, V., Tomanovic, N., Radojevic, S., 2005. Cyclin A and β -catenin expression in actinic keratosis, Bowen's disease and invasive squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol.* 153, 1166–1175. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06898.x>

(16) Bregman, C.L., Hirth, R.S., Sundberg, J.P., Christensen, E.F., 1987. Cutaneous Neoplasms in Dogs Associated with Canine Oral Papillomavirus Vaccine. *Vet Pathol.* 24, 477–487. <https://doi.org/10.1177/030098588702400602>

(17) Brouxhon, S., Kyrkanides, S., O'Banion, M.K., Johnson, R., Pearce, D.A., Centola, G.M., Miller, J.N., McGrath, K.H., Erdle, B., Scott, G., Schneider, S., VanBuskirk, J., Pentland, A.P., 2007. Sequential down-regulation of E-cadherin with squamous cell carcinoma progression: loss of E-cadherin via a prostaglandin E2-EP2 dependent posttranslational mechanism. *Cancer Res.* 67, 7654–64.

(18) Brouxhon, S.M., Kyrkanides, S., Teng, X., Athar, M., Ghazizadeh, S., Simon, M., O'Banion, M.K., Ma, L., 2014. Soluble E-cadherin: a critical oncogene modulating receptor

tyrosine kinases, MAPK and PI3K/Akt/mTOR signaling. *Oncogene*. 33, 225–235.
<https://doi.org/10.1038/onc.2012.563>

(19) Callan, M.B., Preziosi, D., Mauldin, E., 2005. Multiple papillomavirus-associated epidermal hamartomas and squamous cell carcinomas in situ in a dog following chronic treatment with prednisone and cyclosporine. *Vet Dermatol*. 16, 338–45.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2005.00466.x>

(20) Checkley, L.A., Rho, O., Angel, J.M., Cho, J., Blando, J., Beltran, L., Hursting, S.D., DiGiovanni, J., 2014. Metformin inhibits skin tumor promotion in overweight and obese mice. *Cancer Prev Res (Phila)*. 7, 54–64. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-13-0110>

(21) Checkley, L.A., Rho, O., Moore, T., Hursting, S., DiGiovanni, J., 2011. Rapamycin is a potent inhibitor of skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Prev Res*. 4, 1011–1020. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0375>

(22) Chen, S.J., Nakahara, T., Takahara, M., Kido, M., Dugu, L., Uchi, H., Takeuchi, S., Tu, Y.T., Moroi, Y., Furue, M., 2009. Activation of the mammalian target of rapamycin signalling pathway in epidermal tumours and its correlation with cyclin-dependent kinase 2. *Br J Dermatol*. 160, 442–445. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08903.x>

(23) Dahlhoff, M., Rose, C., Wolf, E., Schneider, M.R., 2011. Decreased incidence of papillomas in mice with impaired EGFR function during multi-stage skin carcinogenesis. *Exp Dermatol*. 20, 290–293. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01192.x>

(24) Debaugnies, M., Sánchez-Danés, A., Rorive, S., Raphaël, M., Liagre, M., Parent, M.-A., Brisebarre, A., Salmon, I., Blanpain, C., 2018. YAP and TAZ are essential for basal and squamous cell carcinoma initiation. *EMBO Rep*. 19, 139.
<https://doi.org/10.15252/embr.201845809>

(25) Di Como, C.J., Urist, M.J., Babayan, I., Drobnjak, M., Hedvat, C. V, Teruya-

- Feldstein, J., Pohar, K., Hoos, A., Cordon-Cardo, C., 2002. P63 Expression Profiles in Human Normal and Tumor Tissues. *Clin Cancer Res.* 8, 494–501.
- (26)** Ding, X., Bloch, W., Iden, S., Rüegg, M.A., Hall, M.N., Leptin, M., Partridge, L., Eming, S.A., 2016. mTORC1 and mTORC2 regulate skin morphogenesis and epidermal barrier formation. *Nat Commun.* 7, 13226. <https://doi.org/10.1038/ncomms13226>
- (27)** Downward, J., Parker, P., Waterfield, M.D., 1984. Autophosphorylation sites on the epidermal growth factor receptor. *Nature.* 311, 483–485. <https://doi.org/10.1038/311483a0>
- (28)** Einspahr, J.G., Calvert, V., Alberts, D.S., Curiel-Lewandrowski, C., Warneke, J., Krouse, R., Stratton, S.P., Liotta, L., Longo, C., Pellicani, G., Prasad, A., Sagerman, P., Bermudez, Y., Deng, J., Bowden, G.T., Petricoin, E.F., 2012. Functional Protein Pathway Activation Mapping of the Progression of Normal Skin to Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Prev Res.* 5, 403–413. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0427>
- (29)** Elbediwy, A., Vincent-Mistiaen, Z.I., Spencer-Dene, B., Stone, R.K., Boeing, S., Wculek, S.K., Cordero, J., Tan, E.H., Ridgway, R., Brunton, V.G., Sahai, E., Gerhardt, H., Behrens, A., Malanchi, I., Sansom, O.J., Thompson, B.J., 2016. Integrin signalling regulates YAP and TAZ to control skin homeostasis. *Development.* 143, 1674–87. <https://doi.org/10.1242/dev.133728>
- (30)** Fogarty, G.B., Conus, N.M., Chu, J., McArthur, G., 2007. Characterization of the expression and activation of the epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol.* 156, 92–98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2006.07603.x>
- (31)** Fuchs, E., Raghavan, S., 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev.* 3, 199-209 *Genet.* <https://doi.org/10.1038/nrg758>
- (32)** Fuller, L.C., Allen, M.H., Montesu, M., Barker, J.N., Macdonald, D.M., 1996.

Expression of E-cadherin in human epidermal non-melanoma cutaneous tumours. *Br J Dermatol.* 134, 28–32. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1996.d01-739.x>

(33) Goldschmidt, M.H., Goldschmidt, K.H., 2016. Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin, en: Meuten, D.J. (Ed.), *Tumors in Domestic Animals*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 88–141. <https://doi.org/10.1002/9781119181200.ch4>

(34) Goldschmidt, M.H., Hendrick, M.J., 2008. Tumors of the Skin and Soft Tissues, en: *Tumors in Domestic Animals*. Iowa State Press, Ames, Iowa, USA, pp. 45–117. <https://doi.org/10.1002/9780470376928.ch2>

(35) Goldschmidt, M.H., Kennedy, J.S., Kennedy, D.R., Yuan, H., Holt, D.E., Casal, M.L., Traas, A.M., Mauldin, E.A., Moore, P.F., Henthorn, P.S., Hartnett, B.J., Weinberg, K.I., Schlegel, R., Felsburg, P.J., 2006. Severe Papillomavirus Infection Progressing to Metastatic Squamous Cell Carcinoma in Bone Marrow-Transplanted X-Linked SCID Dogs. *J Virol.* 80, 6621–6628. <https://doi.org/10.1128/JVI.02571-05>

(36) Gross, T.L., Ihrke, P.J., Walder, E.J., Affolter, V.K., 2005. Epidermal tumors, en: *Skin Diseases of the Dog and Cat Clinical and Histopathologic Diagnosis*, 2nd Edition. Blackwell Science Ltd., pp.562-603. <https://doi.org/10.1002/9780470752487>

(37) Groves, R.W., Allen, M.H., MacDonald, D.M., 1992. Abnormal expression of epidermal growth factor receptor in cutaneous epithelial tumours. *J Cutan Pathol.* 19, 66–72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.1992.tb01561.x>

(38) Hafner, C., Landthaler, M., Vogt, T., 2010. Activation of the PI3K/AKT signalling pathway in non-melanoma skin cancer is not mediated by oncogenic PIK3CA and AKT1 hotspot mutations. *Exp Dermatol.* 19, e222–e227. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.01056.x>

(39) Hammer, A.S., Williams, B., Dietz, H.H., Hamilton-Dutoit, S.J., 2007. High-

throughput Immunophenotyping of 43 Ferret Lymphomas Using Tissue Microarray Technology. *Vet Pathol.* 44, 196–203. <https://doi.org/10.1354/vp.44-2-196>

(40) Hampton, P.J., Ross, O.K., Reynolds, N.J., 2007. Increased nuclear β -catenin in suprabasal involved psoriatic epidermis. *Br J Dermatol.* 157, 1168–1177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2007.08195.x>

(41) Hauck, M.L., 2012. Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues, in: Withrow, S.J., Vail, D.M., Page, R.L. (Eds.), *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology: Fifth Edition*. Elsevier, pp. 305–320. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-2362-5.00018-9>

(42) He, C., Mao, D., Hua, G., Lv, X., Chen, X., Angeletti, P.C., Dong, J., Remmenga, S.W., Rodabaugh, K.J., Zhou, J., Lambert, P.F., Yang, P., Davis, J.S., Wang, C., 2015a. The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. *EMBO Mol Med.* 7, 1426–49. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404976>

(43) He, X., Li, S., Luo, X., Hu, D., Cai, T., Huang, K., Zhou, W., Chen, J., 2015b. Expression of DKK1 and β -catenin in epidermal neoplasms and their correlation. *Int J Clin Exp Med.* 8, 18843–8.

(44) Hewitt, S.M., 2012. Tissue Microarrays as a Tool in the Discovery and Validation of Predictive Biomarkers, in: Espina, V., Liotta, L.A. (Eds.), *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 201–214. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-216-2_13

(45) Hewitt, S.M., 2009. Tissue microarrays as a tool in the discovery and validation of tumor markers. *Methods Mol Biol.* 520, 151–61. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-811-9_11

(46) Hewitt, S.M., 2004. Design, construction, and use of tissue microarrays., en: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New Jersey, pp. 61–72. <https://doi.org/10.1385/1->

59259-759-9:061

(47) Higgins, R.J., Dickinson, P.J., LeCouteur, R.A., Bollen, A.W., Wang, H., Wang, H., Corely, L.J., Moore, L.M., Zang, W., Fuller, G.N., 2010. Spontaneous canine gliomas: overexpression of EGFR, PDGFR α and IGFBP2 demonstrated by tissue microarray immunophenotyping. *J Neurooncol.* 98, 49–55. <https://doi.org/10.1007/s11060-009-0072-5>

(48) Hresko, R.C., Mueckler, M., 2005. mTOR·RICTOR Is the Ser 473 Kinase for Akt/Protein Kinase B in 3T3-L1 Adipocytes. *J Biol Chem.* 280, 40406–40416. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508361200>

(49) Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., Wang, C.-Y., He, X., MacDougald, O.A., You, M., Williams, B.O., Guan, K.-L., 2006. TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell.* 126, 955–968. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.055>

(50) Ivan, D., Nash, J.W., Prieto, V.G., Calonje, E., Lyle, S., Diwan, A.H., Lazar, A.J.F., 2007. Use of p63 expression in distinguishing primary and metastatic cutaneous adnexal neoplasms from metastatic adenocarcinoma to skin. *J Cutan Pathol.* 34, 474–480. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2006.00644.x>

(51) Jia, J., Li, C., Luo, S., Liu-Smith, F., Yang, J., Wang, X., Wang, N., Lai, B., Lei, T., Wang, Q., Xiao, S., Shao, Y., Zheng, Y., 2016. Yes-Associated Protein Contributes to the Development of Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma via Activation of RAS. *J Invest Dermatol.* 136, 1267–77. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.02.005>

(52) João, C.F., Tinucci-Costa, M., Cardilli, D.J., Faria, J.L.M., Magalhães, G.M., Alessi, A.C., 2011. Expressão da E-caderina em carcinoma de células escamosas e no tumor de células basais de cães. *Ciência Rural.* 41, 1611–1616. <https://doi.org/10.1590/S0103->

84782011000900020

- (53) Joseph, S.R., Endo-Munoz, L., Gaffney, D.C., Saunders, N.A., Simpson, F., 2015. Dysregulation of epidermal growth factor receptor in actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *Curr Probl Dermatol.* 46, 20–7. <https://doi.org/10.1159/000367959>
- (54) Karayannopoulou, G., Euvrard, S., Kanitakis, J., 2013. Differential expression of p-mTOR in cutaneous basal and squamous cell carcinomas likely explains their different response to mTOR inhibitors in organ-transplant recipients. *Anticancer Res.* 33, 3711–3714.
- (55) Kaufmann, O., Fietze, E., Mengs, J., Dietel, M., 2001. Value of p63 and cytokeratin 5/6 as immunohistochemical markers for the differential diagnosis of poorly differentiated and undifferentiated carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 116, 823–830. <https://doi.org/10.1309/21TW-2NDG-JRK4-PFJX>
- (56) Keller, S.M., Keller, B.C., Grest, P., Börger, C.T., Guscetti, F., 2007. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical analyses of canine lymphomas. *J Vet Diagn Invest.* 19, 652–9. <https://doi.org/10.1177/104063870701900606>
- (57) Khanna, C., Prehn, J., Hayden, D., Cassaday, R.D., Caylor, J., Jacob, S., Bose, S.M., Hong, S.H., Hewitt, S.M., Helman, L.J., 2002. A randomized controlled trial of octreotide pamoate long-acting release and carboplatin versus carboplatin alone in dogs with naturally occurring osteosarcoma: Evaluation of insulin-like growth factor suppression and chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 8, 2406–2412.
- (58) Kikuchi, A., Amagai, M., Hayakawa, K., Ueda, M., Hirohashi, S., Shimizu, N., Nishikawa, T., 1990. Association of EGF receptor expression with proliferating cells and of ras p21 expression with differentiating cells in various skin tumours. *Br J Dermatol.* 123, 49–58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1990.tb01823.x>
- (59) Kononen, J., Bubendorf, L., Kallioniemi, a, Bärklund, M., Schraml, P., Leighton, S.,

- Torhorst, J., Mihatsch, M.J., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 4, 844–847. <https://doi.org/10.1038/nm0798-844>
- (60)** Kooy, A.J., Tank, B., de Jong, A.A., Vuzevski, V.D., van der Kwast, T.H., van Joost, T., 1999. Expression of E-cadherin, alpha- & beta-catenin, and CD44V6 and the subcellular localization of E-cadherin and CD44V6 in normal epidermis and basal cell carcinoma. *Hum Pathol.* 30, 1328–35.
- (61)** Lange, C.E., Favrot, C., 2011. Canine Papillomaviruses. *Vet Clin North Am - Small Anim.* 41, 1183-1195. *Pract.* <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.08.003>
- (62)** Laplante, M., Sabatini, D.M., 2012. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 149, 274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- (63)** Leong, T.Y.-M., Cooper, K., Leong, A.S.-Y., 2010. Immunohistology--past, present, and future. *Adv Anat Pathol.* 17, 404–418. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3181f8957c>
- (64)** Luo, J., Manning, B.D., Cantley, L.C., 2003. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer. *Cancer Cell.* 4, 257–262. [https://doi.org/10.1016/S1535-6108\(03\)00248-4](https://doi.org/10.1016/S1535-6108(03)00248-4)
- (65)** Lyakhovitsky, A., Barzilai, A., Fogel, M., Trau, H., Huszar, M., 2004. Expression of E-cadherin and beta-catenin in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursors. *Am J Dermatopathol.* 26, 372–378. <https://doi.org/10.1097/00000372-200410000-00005>
- (66)** Martens, J.E., Arends, J., Van Der Linden, P.J.Q., De Boer, B.A.G., Helmerhorst, T.J.M., 2004. Cytokeratin 17 and p63 are Markers of the HPV Target Cell, the Cervical Stem Cell. *Anticancer Res.* 24, 771–775.
- (67)** Mestrinho, L.A., Pissarra, H., Faisca, P.B., Bragança, M., Peleteiro, M.C., Niza, M.M.R.E., 2015. p63 and E-cadherin Expression in Canine Oral Squamous Cell Carcinoma. *Vet Pathol.* 52, 614–620. <https://doi.org/10.1177/0300985814547391>

- (68) Mighty, K.K., Laimins, L.A., 2011. p63 Is Necessary for the Activation of Human Papillomavirus Late Viral Functions upon Epithelial Differentiation. *J Virol.* 85, 8863–8869. <https://doi.org/10.1128/JVI.00750-11>
- (69) Miller, W.J., Craig, G., Karen, C., 2013. Epithelial neoplasms, en: Muller & Kirk's Small Animal Dermatology, 7th Edition. Saunders-Elsevier, St Louis., pp. 774-785.
- (70) Mills, A.A., Zheng, B., Wang, X.-J., Vogel, H., Roop, D.R., Bradley, A., 1999. p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature.* 398, 708–713. <https://doi.org/10.1038/19531>
- (71) Molinolo, A.A., Hewitt, S.M., Amornphimoltham, P., Keelawat, S., Rangdaeng, S., Meneses Garcia, A., Raimondi, A.R., Jufe, R., Itoiz, M., Gao, Y., Saranath, D., Kaleebi, G.S., Yoo, G.H., Leak, L., Myers, E.M., Shintani, S., Wong, D., Massey, H.D., Yeudall, W.A., Lonardo, F., Ensley, J., Gutkind, J.S., 2007. Dissecting the Akt/Mammalian Target of Rapamycin Signaling Network: Emerging Results from the Head and Neck Cancer Tissue Array Initiative. *Clin Cancer Res.* 13, 4964–4973. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1041>
- (72) Moll, R., Divo, M., Langbein, L., 2008. The human keratins: biology and pathology. *Histochem. Cell Biol.* 129, 705–733. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0435-6>
- (73) Moroishi, T., Hansen, C.G., Guan, K.-L., 2015. The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nat Rev Cancer* 15, 73–79. <https://doi.org/10.1038/nrc3876>
- (74) Muscatello, L. V., Sarli, G., Beha, G., Asproni, P., Millanta, F., Poli, A., De Tolla, L.J., Benazzi, C., Brunetti, B., 2015. Validation of tissue microarray for molecular profiling of canine and feline mammary tumours. *J Comp Pathol.* 152, 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2014.12.014>
- (75) Nanney, L.B., Magid, M., Stoscheck, C.M., King, L.E., 1984. Comparison of

Epidermal Growth Factor Binding and Receptor Distribution in Normal Human Epidermis and Epidermal Appendages. *J Invest Dermatol.* 83, 385–393. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12264708>

(76) Nazmi, M.N., Dykes, P.J., Marks, R., 1990. Epidermal growth factor receptors in human epidermal tumours. *Br J Dermatol.* 123, 153–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1990.tb01842.x>

(77) O’Shaughnessy, R.F.L., Welti, J.C., Cooke, J.C., Avilion, A.A., Monks, B., Birnbaum, M.J., Byrne, C., 2007. AKT-dependent HspB1 (Hsp27) activity in epidermal differentiation. *J Biol Chem.* 282, 17297–305. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610386200>

(78) Owens, D.M., Watt, F.M., 2003. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat Rev Cancer.* 3, 444–451. <https://doi.org/10.1038/nrc1096>

(79) Papadavid, E., Pignatelli, M., Zakyntinos, S., Krausz, T., Chu, A.C., 2002. Abnormal immunoreactivity of the E-cadherin/catenin (α -, β -, and γ -) complex in premalignant and malignant non-melanocytic skin tumours. *J Pathol.* 196, 154–162. <https://doi.org/10.1002/path.1019>

(80) Parsa, R., Yang, A., McKeon, F., Green, H., 1999. Association of p63 with Proliferative Potential in Normal and Neoplastic Human Keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 113, 1099–1105. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00780.x>

(81) Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F., De Luca, M., 2001. p63 Identifies Keratinocyte Stem Cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98, 3156–3161. <https://doi.org/10.1073/pnas.06103209898/6/3156> [pii]

(82) Ramalho, L.N.Z., Ribeiro-Silva, A., Cassali, G.D., Zucoloto, S., 2006. The expression of p63 and cytokeratin 5 in mixed tumors of the canine mammary gland provides new insights into the histogenesis of these neoplasms. *Vet Pathol.* 43, 424–9.

<https://doi.org/10.1354/vp.43-4-424>

(83) Reis-Filho, J.S., Simpson, P.T., Martins, A., Preto, A., Gärtner, F., Schmitt, F.C., 2003. Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. *Virchows Arch.* 443, 122–32. <https://doi.org/10.1007/s00428-003-0859-2>

(84) Reis-Filho, J.S., Torio, B., Albergaria, A., Schmitt, F.C., 2002. p63 expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas. *J Cutan Pathol.* 29, 517–523. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0560.2002.290902.x>

(85) Rittié, L., Kansra, S., Stoll, S.W., Li, Y., Gudjonsson, J.E., Shao, Y., Michael, L.E., Fisher, G.J., Johnson, T.M., Elder, J.T., 2007. Differential ErbB1 Signaling in Squamous Cell versus Basal Cell Carcinoma of the Skin. *Am J Pathol.* 170, 2089–2099. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060537>

(86) Sakiz, D., Turkmenoglu, T.T., Kabukcuoglu, F., 2009. The expression of p63 and p53 in keratoacanthoma and intraepidermal and invasive neoplasms of the skin. *Pathol Res Pract.* 205, 589–594. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2009.01.010>

(87) Sanz Ressel, B.L., Massone, A.R., Barbeito, C.G., 2017. Uso de la técnica de micromatrices de tejido en histología veterinaria. *Analecta Vet.* 37, 59-64. <https://doi.org/10.24215/15142590e008>

(88) Saraiva, A.L., Gärtner, F., Pires, M.A., 2008. Expression of p63 normal canine skin and primary cutaneous glandular carcinomas. *Vet J.* 177, 136–40. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.03.027>

(89) Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., Sabatini, D.M., 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 307, 1098–101. <https://doi.org/10.1126/science.1106148>

- (90) Schlegelmilch, K., Mohseni, M., Kirak, O., Pruszek, J., Rodriguez, J.R., Zhou, D., Kreger, B.T., Vasioukhin, V., Avruch, J., Brummelkamp, T.R., Camargo, F.D., 2011. Yap1 Acts Downstream of α -Catenin to Control Epidermal Proliferation. *Cell*. 144, 782–795. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.031>
- (91) Schwegler, K., Walter, J.H., Rudolph, R., 1997. Epithelial neoplasms of the skin, the cutaneous mucosa and the transitional epithelium in dogs: an immunolocalization study for papillomavirus antigen. *Zentralbl Veterinarmed A*. 44, 115–23.
- (92) Segrelles, C., Ruiz, S., Perez, P., Murga, C., Santos, M., Budunova, I. V, Martínez, J., Larcher, F., Slaga, T.J., Gutkind, J.S., Jorcano, J.L., Paramio, J.M., 2002. Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis. *Oncogene*. 21, 53–64. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205032>
- (93) Selvi, K., Badhe, B.A., Papa, D., Ganesh, R.N., 2014. Role of p16, CK17, p63, and human papillomavirus in diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia and distinction from its mimics. *Int J Surg Pathol*. 22, 221–30. <https://doi.org/10.1177/1066896913496147>
- (94) Sibilía, M., Kroismayr, R., Lichtenberger, B.M., Natarajan, A., Hecking, M., Holcman, M., 2007. The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation*. 75, 770–787. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2007.00238.x>
- (95) Silva, F.B.F., Leite, J. da S., de Mello, M.F.V., Ferreira, A.M.R., 2016. Validation of a low-cost modified technique for constructing tissue microarrays for canine mammary tumor analysis. *Pathol Res Pract*. 212, 783–790. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2016.06.008>
- (96) Squarize, C.H., Castilho, R.M., Bugge, T.H., Gutkind, J.S., 2010. Accelerated wound healing by mTOR activation in genetically defined mouse models. *PLoS One*. 5, e10643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010643>

- (97) Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R.J., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., Coadwell, J., Hawkins, P.T., 1998. Protein Kinase B Kinases That Mediate Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphate-Dependent Activation of Protein Kinase B. *Science*. 279, 710–714. <https://doi.org/10.1126/science.279.5351.710>
- (98) Surviladze, Z., Sterk, R.T., DeHaro, S.A., Ozbun, M.A., 2013. Cellular entry of human papillomavirus type 16 involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway and inhibition of autophagy. *J Virol*. 87, 2508–17. <https://doi.org/10.1128/JVI.02319-12>
- (99) Suter, M.M., Cramer, F.M., Olivry, T., Mueller, E., Tschärner, C. von, Jensen, P.J., 1997. Keratinocyte biology and pathology. *Vet Dermatol*. 8, 67–100. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.1997.d01-5.x>
- (100) Suzuki, A., Itami, S., Ohishi, M., Hamada, K., Inoue, T., Komazawa, N., Senoo, H., Sasaki, T., Takeda, J., Manabe, M., Mak, T.W., Nakano, T., 2003. Keratinocyte-specific Pten deficiency results in epidermal hyperplasia, accelerated hair follicle morphogenesis and tumor formation. *Cancer Res*. 63, 674–81.
- (101) Tsao, H., Mihm, M.C., Sheehan, C., 2003. PTEN expression in normal skin, acquired melanocytic nevi, and cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 49, 865–72. <https://doi.org/10.1067/S0190>
- (102) Tsuji, H., Ishida-Yamamoto, A., Takahashi, H., Iizuka, H., 2001. Nuclear localization of β -catenin in the hair matrix cells and differentiated keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 27, 170–177. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(01\)00131-1](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(01)00131-1)
- (103) Tumaneng, K., Schlegelmilch, K., Russell, R.C., Yimlamai, D., Basnet, H., Mahadevan, N., Fitamant, J., Bardeesy, N., Camargo, F.D., Guan, K.-L., 2012. YAP

mediates crosstalk between the Hippo and PI(3)K–TOR pathways by suppressing PTEN via miR-29. *Nat Cell Biol.* 14, 1322–9. <https://doi.org/10.1038/ncb2615>

(104) Uren, A., Fallen, S., Yuan, H., Usubütün, A., Küçükali, T., Schlegel, R., Toretsky, J.A., 2005. Activation of the canonical Wnt pathway during genital keratinocyte transformation: a model for cervical cancer progression. *Cancer Res.* 65, 6199–206. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0455>

(105) Uribe, P., Gonzalez, S., 2011. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: Molecular bases for EGFR-targeted therapy. *Pathol Res Pract.* 207, 337–342. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2011.03.002>

(106) Watrach, A.M., Small, E., Case, M.T., 1970. Canine papilloma: progression of oral papilloma to carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 45, 915–20. <https://doi.org/10.1093/jnci/45.5.915>

(107) Wobeser, B.K., Kidney, B. a, Powers, B.E., Withrow, S.J., Mayer, M.N., Spinato, M.T., Allen, a L., 2007. Diagnoses and Clinical Outcomes Associated with Surgically Amputated Canine Digits Submitted to Multiple Veterinary Diagnostic Laboratories. *Vet Pathol.* 44, 355–361. <https://doi.org/10.1354/vp.44-3-355>

(108) Wohlsein, P., Recker, T., Rohn, K., Baumgärtner, W., 2012. Validation of Usefulness of Tissue Microarray Technology in Primary Tumours of the Canine and Feline Central Nervous System. *J Comp Pathol.* 146, 320–326. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.08.006>

(109) Woodworth, C.D., Gaiotti, D., Michael, E., Hansen, L., Nees, M., 2000. Targeted disruption of the epidermal growth factor receptor inhibits development of papillomas and carcinomas from human papillomavirus-immortalized keratinocytes. *Cancer Res.* 60, 4397–402.

(110) Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R.T., Tabin, C.,

Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., McKeon, F., 1999. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature*. 398, 714–718. <https://doi.org/10.1038/19539>

(111) Zanconato, F., Forcato, M., Battilana, G., Azzolin, L., Quaranta, E., Bodega, B., Rosato, A., Bicciato, S., Cordenonsi, M., Piccolo, S., 2015. Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nat Cell Biol*. 17, 1218–1227. <https://doi.org/10.1038/ncb3216>

(112) Zaugg, N., Nespeca, G., Hauser, B., Ackermann, M., Favrot, C., 2005. Detection of novel papillomaviruses in canine mucosal, cutaneous and in situ squamous cell carcinomas. *Vet Dermatol*. 16, 290–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2005.00467.x>

(113) Zhang, H., Pasolli, H.A., Fuchs, E., 2011. Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin. *Proc Natl Acad Sci*. 108, 2270–2275. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019603108>

(114) Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z.-C., Guan, K.-L., 2007. Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev*. 21, 2747–61. <https://doi.org/10.1101/gad.1602907>

(115) Zyzak, L.L., MacDonald, L.M., Batova, A., Forand, R., Creek, K.E., Pirisi, L., 1994. Increased levels and constitutive tyrosine phosphorylation of the epidermal growth factor receptor contribute to autonomous growth of human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes. *Cell Growth Differ*. 5, 537–47.

ANEXO

Tablas

Tabla 1. Información clínica de las diferentes muestras de epidermis normal de caninos.

<i>Caso</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>Raza</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Sitio</i>
1	EN	Bulldog	H	1	Toracolumbar
2	EN	Bulldog	H	1	Toracolumbar
3	EN	Mestizo	M	2	Toracolumbar
4	EN	Doberman	M	8	Plano nasal
5	EN	Labrador retriever	M	6	Codo
6	EN	NE	M	14	Toracolumbar
7	EN	Mestizo	H	10	Tarso
8	EN	Bulldog	H	1	Dedo
9	EN	Mestizo	M	2	Dedo
10	EN	Mestizo	M	2	Escroto
11	EN	Mestizo	M	2	Dedo
12	EN	NE	H	6	Cuello
13	EN	Bulldog	H	1	Pabellón auricular
14	EN	Schnauzer gigante	M	8	Dedo
15	EN	Mestizo	M	2	Pabellón auricular
16	EN	Bulldog	H	1	Plano nasal
17	EN	Mestizo	M	2	Plano nasal

EN, epidermis normal; M, macho; H, hembra; Edad expresada en años; NE, no especificado.

Tabla 2. Información clínica de las diferentes muestras de epidermis preneoplásica de caninos.

<i>Caso</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>Raza</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Sitio</i>
1	EPN	Dogo Argentino	H	5	Abdomen
2	EPN	Dogo Argentino	M	4	Abdomen
3	EPN	Dogo Argentino	H	10	Abdomen
4	EPN	Dogo Argentino	M	10	Flanco
5	EPN	Mestizo	M	8	Inguinal
6	EPN	Mestizo	H	12	Plano nasal
7	EPN	Dogo Argentino	H	4	Flanco
8	EPN	Mestizo	H	3	Abdomen
9	EPN	Doberman	H	10	Inguinal
10	EPN	Ovejero Alemán	M	2	Toracolumbar
11	EPN	Labrador retriever	M	7	Codo
12	EPN	Labrador retriever	H	NE	Toracolumbar

EPN, epidermis normal; M, macho; H, hembra; Edad expresada en años; NE, no especificado.

Tabla 3. Información clínica de las diferentes muestras de papilomas cutáneos caninos.

<i>Caso</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>Raza</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Sitio</i>
1	PC	Bóxer	M	6	Lecho ungueal
2	PC	Ovejero Alemán	H	8	Pezón
3	PC	Pitbull	H	6 m	Múltiples
4	PC	Bóxer	H	6 m	Múltiples
5	PC	Chihuahua	H	2	Perineal
6	PC	Mestizo	H	1	Perineal
7	PC	Mestizo	H	8 m	Inguinal
8	PC	Mestizo	M	6 m	Múltiples
9	PC	Weimaraner	H	2	NE
10	PC	Bóxer	H	7 m	Múltiples
11	PC	NE	H	7	Inguinal
12	PC	Pointer	M	NE	Labio
13	PC	NE	M	2 m	Múltiples
14	PC	Weimaraner	H	5	Pezón
15	PC	Bóxer	H	1	Pabellón auricular
16	PC	Mestizo	M	8 m	Axilar
17	PC	NE	H	7	NE
18	PC	Mestizo	H	1	Parpado
19	PC	Mestizo	H	1	Mamaria
20	PC	Pitbull	M	1	Labio
21	PC	NE	M	7 m	Prepucio
22	PC	Labrador retriever	M	1	NE
23	PC	Mestizo	H	11	Metacarpo
24	PC	Pointer	M	8	Labio
25	PC	NE	M	10	Dedo
26	PC	Pitbull	H	4 m	Flanco
27	PC	Bóxer	H	3	NE
28	PC	Rottweiler	H	1	Labio
29	PC	Labrador retriever	M	11	Dedo
30	PC	Amstaff	H	9	Múltiples
31	PC	NE	M	8	Múltiples
32	PC	Mestizo	M	12	Mamaria
33	PC	Gran Danés	H	1	Dedo
34	PC	Bóxer	NE	2	Cuello
35	PC	Dogo Argentino	H	6	Múltiples
36	PC	Cocker	M	8	Múltiples
37	PC	Doberman	M	8	Múltiples
38	PC	NE	H	5 m	Múltiples
39	PC	Mestizo	H	3	Múltiples
40	PC	Mestizo	H	2	Inguinal
41	PC	Mestizo	M	8	Pabellón auricular

PC, papiloma cutáneo; M, macho; H, hembra; Edad expresada en años, excepto los casos donde se especifica que es en meses con m; NE, no especificado.

Tabla 4. Información clínica de las diferentes muestras de carcinomas de células escamosas cutáneos caninos.

<i>Caso</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>Raza</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Sitio</i>
1	CCEC	Dálmata	M	9	Inguinal
2	CCEC	Bulterrier	M	6	Prepucio
3	CCEC	Dálmata	H	9	Inguinal
4	CCEC	Dogo Argentino	H	4	Inguinal
5	CCEC	Mestizo	M	NE	Prepucio
6	CCEC	Dogo Argentino	H	4	Abdomen
7	CCEC	Dogo Argentino	M	NE	Escroto
8	CCEC	Ovejero Alemán	H	12	Abdomen
9	CCEC	Weimaraner	M	10	Vientre
10	CCEC	Pointer	M	10	Inguinal
11	CCEC	Mestizo	H	15	Labio
12	CCEC	Pointer	M	10	Escroto
13	CCEC	Basset Hound	M	8	Escapular
14	CCEC	Pitbull	H	8	Flanco
15	CCEC	Mestizo	H	6	Flanco
16	CCEC	Dogo Argentino	H	7	Abdomen
17	CCEC	Dogo Argentino	H	8	Flanco
18	CCEC	Mestizo	M	12	Escrotal
19	CCEC	Mestizo	M	6	Escapular
20	CCEC	Cocker	M	8	Lecho ungueal
21	CCEC	NE	H	11	Lecho ungueal
22	CCEC	Mestizo	M	9	Lecho ungueal
23	CCEC	Cocker	H	13	Lecho ungueal
24	CCEC	Brichon frise	M	6	Escroto
25	CCEC	NE	M	14	Lecho ungueal
26	CCEC	Ovejero Alemán	M	10	Lecho ungueal
27	CCEC	Dogo Argentino	M	6	Escroto
28	CCEC	Rottweiler	H	10	Lecho ungueal
29	CCEC	Ovejero Alemán	H	11	Base de la cola
30	CCEC	Kuvasz	H	10	Frontal
31	CCEC	Dogo Argentino	M	5	Prepucio
32	CCEC	Mestizo	H	4	Lumbar
33	CCEC	Dogo Argentino	H	10	Tricipital
34	CCEC	Caniche	H	10	Abdomen
35	CCEC	Bóxer	M	6	Escroto
36	CCEC	Dogo Argentino	H	5	NE
37	CCEC	Dogo Argentino	H	10	NE
38	CCEC	NE	H	6	Cuello

Tabla 4. Continuación.

<i>Caso</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>Raza</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Sitio</i>
39	CCEC	Bull terrier	H	7	Abdomen
40	CCEC	Labrador retriever	H	11	Hombro
41	CCEC	Bóxer	M	5	Escroto
42	CCEC	Mestizo	M	1	Lecho ungueal
43	CCEC	Schnauzer gigante	M	11	Lecho ungueal
44	CCEC	Dogo Argentino	H	8	Inguinal
45	CCEC	Cocker	M	9	Tarso
46	CCEC	Mestizo	H	9	Nariz
47	CCEC	Mestizo	M	8	Escroto
48	CCEC	Galgo	H	8	Inguinal
49	CCEC	Bóxer	M	6	Prepucio
50	CCEC	Mestizo	H	8	NE
51	CCEC	Caniche	H	5	Parrilla costal
52	CCEC	NE	M	5	Frontal
53	CCEC	Dogo Argentino	H	10	Abdomen
54	CCEC	Dogo Argentino	M	8	Escroto
55	CCEC	Mestizo	H	13	Temporal
56	CCEC	Dogo Argentino	M	9	Abdomen
57	CCEC	Bull terrier	M	12	Abdomen
58	CCEC	Dogo Argentino	H	8	Abdomen
59	CCEC	NE	H	8	Inguinal
60	CCEC	Pointer	H	10	Abdomen
61	CCEC	Pitbull	H	4	Inguinal
62	CCEC	Ovejero Alemán	H	12	Mandibular
63	CCEC	Dogo Argentino	H	6	Abdomen
64	CCEC	Ovejero Alemán	H	11	Dorsal
65	CCEC	Dogo Argentino	H	6	NE
66	CCEC	Ovejero Alemán	H	2	Labio
67	CCEC	Dogo Argentino	M	9	Inguinal
68	CCEC	Dogo Argentino	H	4	Abdomen
69	CCEC	NE	M	10	Escroto
70	CCEC	Rottweiler	M	10	Frontal
71	CCEC	Mestizo	H	10	Abdomen
72	CCEC	Mestizo	H	5	Cuello
73	CCEC	Dogo Argentino	M	11	Escroto
74	CCEC	Weimaraner	M	8	Tarso
75	CCEC	Labrador retriever	H	12	Codo
76	CCEC	NE	M	11	Frontal
77	CCEC	Rottweiler	H	7	Lecho ungueal
78	CCEC	Rottweiler	H	8	Lecho ungueal

Tabla 4. Continuación.

<i>Caso</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>Raza</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Sitio</i>
79	CCEC	Schnauzer gigante	M	8	Lecho ungueal
80	CCEC	Schnauzer gigante	H	12	Lecho ungueal
81	CCEC	Schnauzer gigante	H	12	Lecho ungueal
82	CCEC	Labrador retriever	M	12	Lecho ungueal
83	CCEC	Schnauzer gigante	H	13	Lecho ungueal
84	CCEC	Ovejero Alemán	M	6	Metacarpo
85	CCEC	Bóxer	M	3	Lecho ungueal
86	CCEC	Rottweiler	H	11	Lecho ungueal
87	CCEC	Schnauzer gigante	M	6	Lecho ungueal
88	CCEC	Schnauzer gigante	M	8	Lecho ungueal
89	CCEC	Rottweiler	H	9	Lecho ungueal
90	CCEC	Dogo Argentino	M	4	Prepucio
91	CCEC	Schnauzer gigante	H	5	Lecho ungueal
92	CCEC	Beagle	H	11	Abdomen
93	CCEC	Galgo	H	8	Abdomen
94	CCEC	Gran Danés	M	5	Escroto
95	CCEC	Bóxer	H	11	NE
96	CCEC	Mestizo	H	10	Abdomen
97	CCEC	Dogo Argentino	H	9	Inguinal
98	CCEC	Dogo Argentino	H	5	Abdomen
99	CCEC	Mestizo	H	3	Abdomen
100	CCEC	Fox terrier	M	10	Lumbar
101	CCEC	Schnauzer gigante	H	9	Parrilla costal
102	CCEC	Mestizo	H	11	Inguinal
103	CCEC	Pointer	H	8	Flanco
104	CCEC	Dogo Argentino	H	8	Abdomen
105	CCEC	Gran Danés	H	9	Flanco
106	CCEC	Dálmata	H	12	Inguinal
107	CCEC	Cocker	H	8	Lecho ungueal
108	CCEC	Rottweiler	H	7	Lecho ungueal
109	CCEC	Dogo Argentino	H	7	NE
110	CCEC	Schnauzer gigante	H	12	Lecho ungueal
111	CCEC	Ovejero Alemán	H	9	Lecho ungueal
112	CCEC	Mestizo	H	7	Inguinal
113	CCEC	Ovejero Alemán	H	8	Frontal
114	CCEC	Rottweiler	H	9	Lecho ungueal
115	CCEC	Dogo Argentino	H	NE	Abdomen
116	CCEC	Schnauzer gigante	H	7	Lecho ungueal

Tabla 4. Continuación.

<i>Caso</i>	<i>Diagnóstico</i>	<i>Raza</i>	<i>Sexo</i>	<i>Edad</i>	<i>Sitio</i>
117	CCEC	Schnauzer gigante	H	11	Lecho ungueal
118	CCEC	Labrador retriever	M	6	Lecho ungueal
119	CCEC	Schnauzer gigante	H	5	Lecho ungueal
120	CCEC	Bóxer	M	9	Lecho ungueal
121	CCEC	Caniche	H	6	Lecho ungueal
122	CCEC	Dogo Argentino	H	5	Flanco
123	CCEC	Mestizo	M	5	Lecho ungueal
124	CCEC	NE	M	8	Escroto
125	CCEC	Golden retriever	H	7	Lumbar
126	CCEC	Rottweiler	H	9	Lecho ungueal
127	CCEC	Bullmastiff	M	9	Metatarso
128	CCEC	Rottweiler	M	8	Lecho ungueal
129	CCEC	Bull terrier	H	6	Abdomen
130	CCEC	Mestizo	M	5	Prepucio
131	CCEC	Pointer	H	7	Abdomen
132	CCEC	Mestizo	H	9	Abdomen
133	CCEC	Caniche	H	3	Anca
134	CCEC	NE	H	7	Inguinal
135	CCEC	Dogo Argentino	M	7	Prepucio
136	CCEC	Dogo Argentino	H	6	Flanco
137	CCEC	Golden retriever	M	6	Lecho ungueal
138	CCEC	Schnauzer gigante	H	9	Lecho ungueal
139	CCEC	Bóxer	H	6	Abdomen
140	CCEC	NE	NE	NE	NE
141	CCEC	Ovejero Alemán	H	8	Axila
142	CCEC	Pointer	M	12	Abdomen
143	CCEC	NE	H	8	Abdomen
144	CCEC	Pitbull	M	9	Flanco
145	CCEC	Dálmata	H	7	Inguinal
146	CCEC	Bóxer	H	6	Pierna
147	CCEC	Fox terrier	M	7	Dorsal
148	CCEC	Caniche	M	8	Cuello
149	CCEC	Doberman	M	10	Antebrazo
150	CCEC	Mestizo	M	8	Cuello

CCEC, carcinoma de células escamosas cutáneo; M, macho; H, hembra; Edad expresada en años; NE, no especificado.

Tabla 5. Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica de las diferentes muestras de epidermis normal de caninos.

<i>Caso</i>	<i>pS6</i>	<i>Ki-67</i>	<i>pAkt</i>	<i>PTEN</i>	<i>pEGFR</i>	<i>E-cadh</i>	<i>β-cat</i>	<i>YAP</i>	<i>p63</i>	<i>CK5</i>
1	0	0	0	0	3	4	4	0	3	4
2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
3	1	0	0	3	3	4	4	0	3	4
4	0	0	0	1	0	4	4	0	3	4
5	0	0	0	0	2	4	4	0	3	4
6	0	0	0	3	2	4	4	0	3	4
7	0	0	0	1	3	4	4	0	3	4
8	0	0	0	0	0	4	4	0	3	4
9	0	0	0	0	3	4	4	0	3	4
10	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
11	0	0	0	0	0	4	4	0	3	4
12	0	0	0	0	0	4	4	0	3	4
13	0	0	0	0	0	4	4	0	3	4
14	1	0	0	3	3	4	4	0	3	4
15	1	0	0	0	0	4	4	0	3	4
16	1	0	1	0	0	4	4	1	3	4
17	0	0	0	0	3	4	4	0	3	4

Valores asignados: 0, menos del 10% de las células teñidas; 1, entre el 10 y el 25%; 2, entre el 25 y el 50%; 3, entre 50 y 75%; 4, entre 75 y 100%; NR, muestra no representativa.

Tabla 6. Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica de las diferentes muestras de epidermis preneoplásica de caninos.

<i>Caso</i>	<i>pS6</i>	<i>Ki-67</i>	<i>pAkt</i>	<i>PTEN</i>	<i>pEGFR</i>	<i>E-cadh</i>	<i>β-cat</i>	<i>YAP</i>	<i>p63</i>	<i>CK5</i>
1	3	0	3	3	4	4	4	4	3	4
2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
3	3	0	3	3	3	4	4	3	3	4
4	4	0	3	3	4	4	4	4	3	4
5	3	0	3	3	4	4	4	4	3	4
6	4	0	3	3	3	4	4	3	3	4
7	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
8	1	0	2	2	4	4	4	4	3	4
9	3	0	3	3	3	4	4	2	3	4
10	4	0	3	3	4	4	4	3	3	4
11	4	0	3	3	4	4	4	4	3	4
12	4	0	3	4	4	4	4	4	3	4

Valores asignados: 0, menos del 10% de las células teñidas; 1, entre el 10 y el 25%; 2, entre el 25 y el 50%; 3, entre 50 y 75%; 4, entre 75 y 100%; NR, muestra no representativa.

Tabla 7. Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica de las diferentes muestras de papilomas cutáneos caninos.

<i>Caso</i>	<i>pS6</i>	<i>Ki-67</i>	<i>pAkt</i>	<i>PTEN</i>	<i>pEGFR</i>	<i>E-cadh</i>	<i>β-cat</i>	<i>YAP</i>	<i>p63</i>	<i>CK5</i>
1	2	0	1	0	0	4	4	3	3	4
2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
3	2	0	2	0	0	4	4	1	3	4
4	3	0	1	0	0	4	4	1	3	4
5	3	0	1	0	0	4	4	1	3	4
6	3	0	3	0	0	4	4	3	3	4
7	3	0	2	0	3	4	4	2	3	4
8	3	0	2	0	3	4	4	2	3	4
9	4	1	4	0	4	4	4	3	3	4
10	4	0	2	1	0	4	4	3	3	4
11	1	0	2	1	3	4	4	3	3	4
12	3	0	2	1	3	4	3	3	3	4
13	4	0	1	1	4	4	4	0	3	4
14	2	0	2	2	0	4	3	3	3	4
15	3	0	2	2	0	4	4	3	3	4
16	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
17	3	0	2	2	2	4	4	3	3	4
18	1	0	1	2	3	3	4	3	3	4
19	3	0	2	2	3	4	3	3	3	4
20	3	0	2	2	3	3	4	3	3	4
21	2	0	2	2	4	3	3	3	3	4
22	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
23	3	0	2	2	4	4	3	3	3	4
24	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
25	3	0	2	2	4	4	3	3	3	4
26	3	1	3	2	4	3	4	3	3	4
27	3	1	3	2	4	4	4	3	3	4
28	4	1	2	2	4	4	4	3	3	4
29	2	0	1	3	0	4	4	3	3	4
30	2	0	2	3	0	4	4	3	3	4
31	2	0	2	3	3	4	4	3	3	4
32	2	0	2	3	3	4	3	3	3	4
33	2	0	2	3	3	4	3	3	3	4
34	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
35	3	0	2	3	3	3	3	3	3	4
36	3	0	2	3	3	4	3	3	3	4
37	3	0	3	3	3	4	3	1	3	4
38	3	0	3	3	4	3	3	2	3	4
39	4	0	3	3	4	4	3	3	3	4
40	4	1	2	4	4	4	3	3	3	4
41	4	0	4	4	4	4	4	3	3	4

Valores asignados: 0, menos del 10% de las células teñidas; 1, entre el 10 y el 25%; 2, entre el 25 y el 50%; 3, entre 50 y 75%; 4, entre 75 y 100%; NR, muestra no representativa.

Tabla 8. Análisis cuantitativo de la inmunohistoquímica de las diferentes muestras de carcinomas de células escamosas cutáneos caninos.

<i>Caso</i>	<i>pS6</i>	<i>Ki-67</i>	<i>pAkt</i>	<i>PTEN</i>	<i>pEGFR</i>	<i>E-cadh</i>	<i>β-cat</i>	<i>YAP</i>	<i>p63</i>	<i>CK5</i>
1	3	0	0	0	1	4	3	0	3	4
2	3	0	3	0	0	4	4	0	3	4
3	0	1	2	0	0	4	4	2	3	4
4	3	1	2	0	3	0	1	1	3	4
5	2	0	2	0	3	3	3	0	3	4
6	3	0	3	0	0	2	2	2	3	4
7	0	0	1	0	0	3	2	2	4	4
8	4	0	2	0	0	3	3	0	4	4
9	4	0	2	0	0	3	4	0	3	4
10	4	0	3	0	0	3	3	1	3	4
11	4	1	2	0	4	0	4	4	3	4
12	3	0	0	0	0	3	4	3	4	4
13	3	0	2	0	0	4	3	0	4	4
14	3	0	3	0	0	3	0	0	3	4
15	3	0	3	0	0	4	4	0	3	4
16	0	0	2	0	3	3	3	3	3	4
17	2	0	3	0	0	3	3	0	3	4
18	4	0	2	0	3	3	4	3	3	4
19	1	0	2	0	0	2	2	2	3	4
20	3	0	3	0	1	0	3	0	3	4
21	1	0	0	0	0	3	4	3	3	4
22	2	0	0	0	0	3	4	0	3	4
23	4	0	4	0	0	3	4	3	3	4
24	2	0	2	0	4	2	3	2	4	4
25	4	0	3	0	2	3	4	2	3	4
26	4	1	4	0	4	4	4	2	3	4
27	2	0	0	0	0	3	4	2	3	4
28	3	0	0	0	1	3	3	2	3	4
29	3	0	2	3	3	3	4	3	3	4
30	4	0	4	0	3	0	3	2	3	4
31	2	0	0	1	3	3	3	0	3	4
32	4	0	0	1	0	0	3	3	3	4
33	3	0	2	1	3	4	3	2	3	4
34	3	0	4	1	2	3	3	1	3	4
35	3	0	3	1	2	3	3	1	3	4
36	4	0	0	1	3	3	3	1	3	4
37	4	0	4	1	0	3	3	1	3	4
38	4	0	2	1	3	2	3	2	4	4

Tabla 8. Continuación

<i>Caso</i>	<i>pS6</i>	<i>Ki-67</i>	<i>pAkt</i>	<i>PTEN</i>	<i>pEGFR</i>	<i>E-cadh</i>	<i>β-cat</i>	<i>YAP</i>	<i>p63</i>	<i>CK5</i>
39	2	0	2	1	0	3	3	3	3	4
40	1	1	3	1	0	0	4	3	4	4
41	2	1	0	1	0	0	3	NR	4	4
42	4	1	2	1	3	4	4	3	3	4
43	4	0	2	1	4	3	3	2	3	4
44	4	1	0	2	3	3	3	3	3	4
45	2	0	2	1	3	3	3	2	3	4
46	4	1	4	2	2	3	4	2	3	4
47	3	0	3	2	2	3	3	3	3	4
48	2	0	1	2	2	2	3	3	3	4
49	4	1	4	2	4	3	3	3	3	4
50	4	0	0	2	3	4	4	2	3	4
51	4	0	2	2	4	4	4	3	3	4
52	4	0	0	2	4	3	4	4	4	4
53	4	1	3	2	3	3	4	4	4	4
54	3	1	2	2	4	3	4	4	3	4
55	2	0	0	2	3	4	4	4	4	4
56	4	0	0	2	0	3	4	2	3	4
57	2	0	1	2	2	4	4	3	3	4
58	4	1	0	3	2	0	1	3	3	4
59	4	1	3	3	4	0	0	4	3	4
60	3	1	2	3	0	3	3	2	3	4
61	4	1	4	3	3	2	3	3	3	4
62	4	1	2	3	4	3	3	2	3	4
63	4	1	0	3	3	2	3	4	3	4
64	0	0	0	3	4	3	4	4	4	4
65	4	1	2	3	3	3	4	3	3	4
66	4	0	2	3	4	3	4	4	3	4
67	4	0	0	3	2	3	4	3	3	4
68	4	0	0	3	4	3	4	3	4	4
69	4	0	3	3	0	0	2	4	3	4
70	2	1	1	3	0	4	4	3	3	4
71	4	1	3	3	4	4	4	2	4	4
72	2	0	1	3	1	3	3	4	3	4
73	1	1	3	3	3	1	0	3	3	4
74	4	1	4	3	3	3	4	2	3	4
75	2	1	0	3	0	1	3	3	3	4
76	3	0	2	3	4	3	4	1	3	4
77	2	0	0	3	0	3	4	3	4	4
78	2	0	1	3	0	3	3	2	3	4

Tabla 8. Continuación

<i>Caso</i>	<i>pS6</i>	<i>Ki-67</i>	<i>pAkt</i>	<i>PTEN</i>	<i>pEGFR</i>	<i>E-cadh</i>	<i>β-cat</i>	<i>YAP</i>	<i>p63</i>	<i>CK5</i>
79	1	0	2	3	2	4	4	3	3	4
80	4	0	0	3	0	3	3	1	3	4
81	3	0	1	3	0	3	4	0	3	4
82	3	0	2	3	4	0	4	2	3	4
83	3	0	2	3	3	3	4	3	3	4
84	4	0	2	3	4	3	3	3	3	4
85	3	1	3	3	4	4	4	1	3	4
86	2	0	2	3	4	3	3	3	3	4
87	2	0	0	3	0	3	4	2	3	4
88	4	0	0	3	2	3	3	0	3	4
89	2	0	2	3	0	3	4	3	4	4
90	3	0	4	3	2	3	3	3	4	4
91	2	0	2	3	0	4	4	3	3	4
92	0	0	0	3	0	2	3	3	3	4
93	4	1	4	4	3	3	3	3	3	4
94	2	1	0	4	3	3	3	4	3	4
95	3	1	1	4	0	3	4	2	3	4
96	3	1	3	4	0	4	3	4	3	4
97	4	1	0	4	4	3	3	4	3	4
98	4	0	3	4	3	3	3	3	4	4
99	4	0	2	4	4	3	4	2	3	4
100	2	0	2	4	3	4	4	3	4	4
101	3	0	3	4	4	3	4	4	3	4
102	2	0	2	4	0	0	4	0	3	4
103	4	0	3	4	3	4	4	3	3	4
104	2	0	3	4	2	0	3	3	4	4
105	1	0	2	4	0	4	3	3	3	4
106	2	0	3	4	3	2	4	3	4	4
107	3	0	2	4	3	3	3	4	3	4
108	1	0	3	4	2	3	4	3	4	4
109	3	0	2	4	2	1	3	3	4	4
110	2	1	2	4	0	3	3	3	3	4
111	0	0	2	4	0	4	4	2	3	4
112	3	0	3	4	1	2	3	4	4	4
113	3	0	1	4	3	1	3	0	3	4
114	3	1	2	4	4	0	4	4	3	4
115	2	0	3	4	0	2	4	3	4	4
116	1	0	3	4	0	4	3	2	4	4
117	4	0	0	4	0	3	3	2	3	4
118	4	0	2	4	4	3	4	2	3	4

Tabla 8. Continuación

<i>Caso</i>	<i>pS6</i>	<i>Ki-67</i>	<i>pAkt</i>	<i>PTEN</i>	<i>pEGFR</i>	<i>E-cadh</i>	<i>β-cat</i>	<i>YAP</i>	<i>p63</i>	<i>CK5</i>
119	3	0	2	4	4	3	4	4	3	4
120	0	0	2	4	0	3	4	2	4	4
121	3	0	0	4	0	3	3	1	3	4
122	3	0	3	4	4	3	4	3	3	4
123	4	0	0	4	4	3	3	2	3	4
124	1	0	3	4	3	3	4	4	4	4
125	0	0	3	4	0	0	3	2	4	4
126	4	0	3	4	2	3	3	4	4	4
127	3	1	3	4	4	4	4	3	3	4
128	1	0	1	4	0	0	3	3	4	4
129	2	0	2	4	3	4	4	4	3	4
130	2	0	3	4	4	3	4	2	4	4
131	1	0	2	4	4	3	4	2	3	4
132	0	1	3	4	3	3	4	4	4	4
133	2	0	1	4	3	3	4	3	4	4
134	1	0	3	4	2	3	4	4	4	4
135	4	0	3	4	3	3	4	3	4	4
136	3	1	3	4	1	3	4	2	4	4
137	4	0	2	4	1	4	4	3	3	4
138	0	0	2	4	0	3	3	4	4	4
139	4	0	0	4	3	3	4	2	4	4
140	1	0	3	4	0	2	4	2	3	4
141	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
142	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
143	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
144	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
145	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
146	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
147	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
148	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
149	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
150	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Valores asignados: 0, menos del 10% de las células teñidas; 1, entre el 10 y el 25%; 2, entre el 25 y el 50%; 3, entre 50 y 75%; 4, entre 75 y 100%; NR, muestra no representativa