



Universitat de Lleida

# Caracterització de les alteracions moleculars dels carcinomes basocel·lulars esporàdics

Rafael Aguayo Ortiz

Dipòsit Legal: L.956-2013

<http://hdl.handle.net/10803/123548>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

# **Caracterització de les alteracions moleculars dels carcinomes basocel·lulars esporàdics**

Rafael Aguayo Ortiz

**Directors de tesi:**

Dr. Eloi Garí Marsol

Dr. Josep Manel Casanova Seuma

**Universitat de Lleida**



Institut de Recerca  
Biomèdica de Lleida



Universitat de Lleida  
Departament de Medicina

## **Caracterització de les alteracions moleculars dels carcinomes basocel·lulars esporàdics**

**Rafael Aguayo Ortiz**

***Director de tesi***

**Dr. Eloi Garí Marsol**

***Director de tesi***

**Dr. Josep Manel Casanova Seuma**

Memòria presentada per Rafael Aguayo Ortiz per optar a títol de doctor per la Universitat de Lleida.

Treball dirigit pel Dr. Eloi Garí Marsol, del Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Universitat de Lleida i pel Dr. Josep Manel Casanova Seuma, cap de la Secció de Dermatologia de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida.

Lleida, 16 de juliol del 2013.

*Desgraciats els homes que tenen totes les idees clares.*

**Louis Pasteur**

*Vés amb compte a l'hora de llegir llibres de medicina, pots morir d'una errata.*

**Mark Twain**

*Deixem les conclusions pels idiotes.*

**Pío Baroja**

*Les persones devem el progrés als insatisfets.*

**Aldous Huxley**

*La veritable ciència ensenya, per sobre de tot, a dubtar i ser ignorant.*

**Miguel de Unamuno**

*Ni suposo ni proposo; exposo.*

**Voltaire**

*La teoria és assassinada tard o d'hora per l'experiència.*

**Albert Einstein**

*Pots arribar a tot arreu, sempre que caminis el suficient.*

**Lewis Carroll**

*... luchas duro, si eres el hijo de nadie...*

**José María Sanz**



## ÍNDEX

Introducció.....	p. 1
1. Aspectes generals, clínica, epidemiologia i tractament.....	p. 2
1.1 Concepte.....	p. 2
1.2 Classificació.....	p. 3
1.2.1 Classificació clínica.....	p. 3
1.2.2 Classificació histològica.....	p. 6
1.2.2.1 Formes indiferenciades.....	p. 7
1.2.2.2 Formes diferenciades.....	p. 10
1.3 Pronòstic.....	p. 11
1.4 Epidemiologia.....	p. 12
1.5 Factors de risc.....	p. 19
1.6 Tractament.....	p. 22
2. Fisiopatologia del carcinoma basocel·lular.....	p. 23
2.1 Origen cel·lular del carcinoma basocel·lular.....	p. 23
<i>Stem cells</i> i fol·licle pilós.....	p. 24
Funció de les <i>stem cells</i> del fol·licle pilós.....	p. 25
Teoria de l'origen a les <i>stem cells</i> del fol·licle pilós.....	p. 26
Teoria de l'origen a l'epiteli interfol·licular.....	p. 27

2.2 Origen molecular del carcinoma basocel·lular.....	p. 29
Via Hedgehog.....	p. 30
Descripció de la via Hedgehog.....	p. 31
Funció de la senyal Hedgehog.....	p. 33
Via Hedgehog i relació amb la pell.....	p. 33
3. Altres vies de transducció de senyal implicades en la formació del carcinoma basocel·lular.....	p. 34
3.1 La importància de $\beta$ -catenina i la via Wnt.....	p. 34
3.2 Via Erk i carcinoma basocel·lular.....	p. 36
Hipòtesis.....	p.39
Objectius.....	p.41
Resultats.....	p. 43
Apartat 1: Cultiu de cèl·lules tumorals de carcinoma basocel·lular.....	p. 44
Introducció.....	p. 45
Material i mètodes.....	p. 46
Recollida de cèl·lules tumorals.....	p. 46
Cultiu cel·lular.....	p. 47
Immunofluorescència.....	p. 48
Resultats.....	p. 49
Discussió.....	p. 54
Bibliografia.....	p. 56

Apartat 2: Expressió de $\beta$ -catenina i ciclina D1 en carcinomes basocel·lulars independents de Gli1.....	p. 58
Introducció.....	p. 59
Material i mètodes.....	p. 61
Pacients i preparació de les mostres.....	p. 61
Immunohistoquímica.....	p. 62
Immunoblot.....	p. 63
Resultats.....	p. 64
Acumulació de Gli en carcinoma basocel·lular esporàdic.....	p. 64
Acumulació de $\beta$ -catenina a mostres de carcinoma basocel·lular esporàdic.....	p. 67
Expressió de ciclina D1 en mostres de carcinoma basocel·lular esporàdic.....	p. 69
Discussió.....	p. 71
Bibliografia.....	p. 75
Apartat 3: Activació d'Erk 1/2 a fibroblasts de l'estroma de carcinoma basocel·lular esporàdic.....	p. 83
Introducció.....	p. 83
Material i mètodes.....	p. 83
Pacients i preparació de les mostres.....	p. 85
Extret de proteïna.....	p. 86
Immunoblot.....	p. 86
Immunohistoquímica.....	p. 87
Cultiu cel·lular.....	p. 87

Immunofluorescència.....	p. 88
Anàlisi estadístic.....	p. 88
Resultats.....	p. 89
L'acumulació d'Erk1/2 fosforilat estava present a l'estroma dels CBCs.....	p. 89
Aïllament i anàlisi de fibroblasts procedents de l'estroma dels CBCs.....	p. 93
Discussió.....	p. 96
Bibliografia.....	p. 99
Discussió.....	p. 103
1. Posta a punt de l'obtenció de cultiu de cèl·lules tumorals de CBC.....	p. 104
2. Importància de la via Sonic Hedgehog en la formació de CBCs esporàdics.....	p. 107
3. La proliferació tumoral no és atribuïble a un únic patró característic de senyalització en tots els CBCs.....	p. 117
4. Relació entre aspectes clínics i els marcadors moleculars.....	p. 119
5. Paper de l'estroma en el CBC.....	p. 121
Conclusions.....	p. 124
Bibliografia.....	p. 127
Annex 1: Bowen disease associated with human papillomavirus infection of the nail bed.....	p. 143
Abstract.....	p. 143
Case report.....	p. 144

Discussion.....	p. 146
References.....	p. 149
Annex 2: Squamous cell carcinoma developing in Jadassohn’s sebaceous nevus: a case report and review of the literature.....	p. 151
Abstract.....	p. 151
Introduction.....	p. 152
Case report.....	p. 153
Discussion.....	p. 155
References.....	p. 162
Apèndix.....	p.168

## AGRAÏMENTS

Quan s'arriba al final d'un camí és el moment de mirar enrere i recapitular, per tal de valorar les experiències positives i d'aprofitar les negatives abans d'iniciar el següent. És de justícia agrair la feina d'aquells que han fet més transitable i diàfan aquest recorregut.

Són una bona colla de gent la que ha fet possible aquest treball; sense ells no hauria estat possible que això tirés endavant. Aquí només intento fer la difícil tasca (només a l'abast de poques persones) de transformar sensacions en paraules, però més enllà de les lletres, resten les converses, les complicitats, els esforços, les decepcions i els èxits compartits.

Sense cap mena de dubte, el resultat més valuós d'aquesta tesi és el fet d'haver coincidit amb vosaltres, d'haver compartit estones de la meua vida.

Moltíssimes gràcies a tots:

A l'Eloi Garí, principal responsable de que ara estigues llegint això. L'única persona capaç de convertir un fracàs en un somriure, a través d'una frase memorable. Eloi, el dia que triomfem, serà l'hòstia !!! Gràcies per acollir-me tan bé des del primer dia i d'haver invertit tant de temps en mi. Espero que continuïs sent el "sensei" per a molts altres després de jo... *no se lo va a creer...*

A la Rita Fernández. Si bé vàrem coincidir poc, la teua feina als primers experiments són els fonaments del treball que posteriorment esdevindria aquesta tesi.

A la Marta Rafel, les meves mans a l'IRB quan jo no podia ser-hi (...bé, i quan hi era també). Gràcies per les hores compartides a la taula del laboratori, a la campana (amb doble guant, eh??), al microscopi...i per ensenyar-me a fer westerns, dividir cèl·lules, fer dilucions... carai, quants llocs i quantes coses!

A la Maria Santacana, pel teu suport tècnic i les teves opinions. La teva ajuda ha sigut imprescindible.

A la Sònia Gatius, pels teus comentaris, apreciacions i feina al microscopi.

A la Maria Ruiz, per la teva ajuda en l'aprovació del projecte per part del comitè d'ètica.

A l'Olga Almacellas, la Imma Montoliu i la Sònia Rius per l'assistència tècnica prestada.

Al Xavier Matias-Guiu, per obrir-me les portes de l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida i proporcionar-me tot allò necessari per fer la meva feina.

Al Josep Manel Casanova, treballador incansable. És d'admirar la teva capacitat i voluntat de millorar dia rere dia. Gràcies per donar-me la oportunitat de fer aquest treball i introduir-me al món de la ciència. Gràcies pels comentaris, les correccions, les opinions aportades i per dedicar una gran part del teu temps a la meva persona.

Al Manel Baradad: Mestre. Ja saps el perquè.

A la Rosa Martí, la responsable de que la meva vida professional s'hagi decantat pel món de la dermatologia. Si els nostres camins no s'haguessin creuat, de ben segur ara no seria on sóc ni aquest treball s'hauria realitzat. Ets

el clar exemple de que només tractant bé a les persones, aquestes poden arribar molt lluny, o si més no, on es proposin. Mil gràcies.

A la Verònica Sanmartín, per ajudar-me sempre en allò ha estat al teu abast. Gràcies pel teu treball desinteressat i per la teva implicació amb la meva “guerra”.

A (gairebé tota) la secció de dermatologia de l’Hospital Universitari Arnau de Vilanova durant la meva època de resident. Gràcies per l’ajuda i el recolzament.

Als meus pares. Gràcies per haver-me donat l’educació que he rebut i per ensenyar-me la cultura de l’esforç. Aquest és el millor llegat que em podeu lliurar. Gràcies per la paciència, per aguantar-me (que té mèrit) i pel vostre suport. Gràcies per la llibertat que m’heu donat. És el valor més important. Va per vosaltres, que no vàreu tenir aquesta oportunitat per la injustícia de nàixer en uns temps tan infames.

Al Xavi, que de ben segur també passaràs per aquí. El futur és teu. No t’aturis mai.

Menció especial per Sant Mariano Màrtir, que sense buscar-ho (o potser sí) ha sigut contínuament objecte de la nostra ira i disenteria.

I a tothom que alguna vegada m’ha preguntat...*què, com va la tesi?* ... i s’ha aturat a sentir la meva resposta.



## RESUM

El carcinoma basocel·lular (CBC) és la neoplàsia més freqüent en l'ésser humà. La importància d'aquest tumor rau tant en la gran morbiditat que produeix com en l'enorme despesa sanitària que ocasiona als sistemes de salut de gairebé tot el món. Malgrat que el seu tractament és essencialment quirúrgic, existeixen casos on no està indicat aquest abordatge terapèutic i seria interessant el fet de conèixer les alteracions moleculars que comporten la formació de la neoplàsia per tal d'establir possibles dianes farmacològiques. Per aquestes raons hem cregut convenient aprofundir en l'estudi d'aquest tumor, centrant-nos en la fisiopatologia i caracterització molecular.

A través de l'estudi de la síndrome de Gorlin-Goltz s'ha establert la importància de la via Sonic hedgehog (Shh) en la fisiopatologia del CBC. Nosaltres, mitjançant tècniques com l'immunoblot i la immunohistoquímica (mesurant els nivells de proteïna Gli1) hem determinat que aquesta via està activada en aproximadament la meitat dels casos de CBC esporàdic, confirmant les dades genètiques que es coneixen sobre aquest tema. Analitzant vies alternatives, hem trobat casos amb alta activitat de  $\beta$ -catenina sense afectació de la via Shh i això ens fa pensar que la via Wnt pot tenir un paper fonamental en aquests casos. Hem detectat per immunoblot l'acumulació de  $\beta$ -catenina en la meitat dels casos estudiats, relacionat-se de forma directa amb l'activitat proliferativa de la neoplasia.

Mitjançant l'anàlisi dels nivells d'Erk fosforilat per immunohistoquímica, hem confirmat que la via de les MAP quinases no està activa en el CBC malgrat que el tumor, encara que de forma lenta, té activitat proliferativa. Com a novetat, hem descrit que aquesta via sí és important a l'estroma peritumoral. Els fibroblasts que envolten el tumor mostren una clara "activació" de la via de les MAP quinases, però aquest fet no es correspon amb un increment de la proliferació. Hem aconseguit aïllar aquests fibroblasts tumorals activats en cultiu, observant que mantenen aquestes peculiaritats. L'explicació a aquest fet pot residir en que l'activitat Erk seria important en la modificació de la matriu extracel·lular per tal de facilitar la progressió de la neoplàsia. Tanmateix, són necessaris més estudis per tal d'establir la importància d'aquest entorn "activat" en la progressió tumoral.

D'altra banda, no hem trobat cap relació entre l'expressió de diferents proteïnes i el tipus de CBC, l'edat, el sexe del pacient ni la localització tumoral, en l'objectiu de relacionar clínica i fisiopatologia.

A més, durant el meu període de residència i elaboració d'aquest treball, ens hem interrogat sobre aspectes singulars en càncer cutani, fruit de la pràctica clínica diària. Així, hem inclòs un annex amb dos articles publicats en revistes internacionals.

## RESUMEN

El carcinoma basocelular (CBC) es la neoplasia más frecuente en el ser humano. La importancia de este tumor radica tanto en la gran morbilidad que produce como en el enorme gasto sanitario que ocasiona a los sistemas de salud de casi todo el mundo. A pesar de que su tratamiento es esencialmente quirúrgico, existen casos donde no está indicado este abordaje terapéutico y sería interesante el hecho de conocer las alteraciones moleculares que comportan la formación la neoplasia para establecer posibles dianas farmacológicas. Por estas razones hemos creído conveniente profundizar en el estudio de este tumor, centrándonos en la fisiopatología y caracterización molecular.

A través del estudio del síndrome de Gorlin-Goltz se ha establecido la importancia de la vía Sonic hedgehog (Shh) en la fisiopatología del CBC. Nosotros, mediante técnicas como el inmunoblot y la inmunohistoquímica (midiendo los niveles de proteína Gli1) hemos determinado que esta vía está activada en aproximadamente la mitad de los casos de CBC esporádico, confirmando los datos genéticos que se conocían sobre este tema. Analizando vías alternativas, hemos encontrado casos con alta actividad de  $\beta$ -catenina sin afectación de la vía Shh y esto nos hace pensar que la vía Wnt puede tener un papel fundamental en estos casos. Hemos detectado por inmunoblot la acumulación de  $\beta$ -catenina en la mitad de los casos estudiados, relacionándose de forma directa con la actividad proliferativa de la neoplasia.

Mediante el análisis por inmunohistoquímica de los niveles de Erk fosforilado, hemos confirmado que la vía de las MAP cinasas no está activa en el CBC a pesar de que el tumor, aunque de forma lenta, tiene actividad proliferativa. Como novedad, hemos descrito que esta vía sí es importante en el estroma peritumoral. Los fibroblastos que envuelven el tumor muestran una clara “activación” de la vía de las MAP cinasas, pero este hecho no se corresponde con un incremento de la proliferación. Hemos conseguido aislar estos fibroblastos tumorales activados en cultivo, observando que mantienen dichas peculiaridades. La explicación a este hecho puede residir en que la actividad Erk sería importante en la modificación de la matriz extracelular con tal de facilitar la progresión de la neoplasia. Así mismo, son necesarios más estudios para establecer la importancia de este entorno “activado” en la progresión tumoral.

Por otro lado, no hemos encontrado ninguna relación entre la expresión de diferentes proteínas y el tipo de CBC, la edad, el sexo del paciente ni la localización tumoral, en el objetivo de relacionar clínica y fisiopatología.

Además, durante mi periodo de residencia y elaboración de este trabajo, nos hemos interrogado sobre aspectos singulares en cáncer cutáneo, fruto de la práctica clínica diaria. Así, hemos incluido un anexo con dos artículos publicados en revistas internacionales.

## **ABSTRACT**

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common malignancy in humans. The importance of this tumor lies both in the high morbidity produced as in the high costs caused to the health systems of whole world. Although its treatment is essentially surgical, there are cases where it is not indicated this therapeutic approach, then it would be interesting to know the molecular alterations that involve the formation of this neoplasm to establish potential drug targets. For these reasons we have decided to study this tumor, focusing on the physiopathology and molecular characterization.

Through the study of Gorlin-Goltz syndrome, the importance of the Sonic hedgehog pathway (Shh) in the pathophysiology of BCC was well established. Using techniques such as immunoblotting and immunohistochemistry (measuring the levels of the Gli 1 protein), we have determined that this pathway is activated in about half of cases of sporadic BCC, confirming the previously known genetic data. Analyzing alternative pathways, we found samples with high activity of  $\beta$ -catenin pathway without affecting Shh. This result suggests that the Wnt pathway may have a important role in these cases. We detected by immunoblot the accumulation  $\beta$ -catenin in half of the studied cases, correlating with the proliferative activity of the neoplasm.

By immunohistochemical analysis of phosphorylated Erk levels, we have observed that the MAP kinase pathway is not activated in the CBC, not correlating with the slow-progress in the behaviour of the tumor. As a novelty, we have described that this pathway is important in the peritumoral stroma. Fibroblasts surrounding the tumor showed a clear "activation" of the MAP kinase pathway, but this does not correspond to an increase of proliferation. We have isolated these activated tumor fibroblasts in culture, noting that they keep these peculiarities. The explanation for this may be that Erk activity would be important in the modification of the extracellular matrix, facilitating the progression of the tumor. Also, further studies are needed to establish the importance of this environment "activated" in tumor progression.

Also, during my formation as a dermatologist and preparation of this work, we wondered about some skin cancer singularities, as result of daily clinical practice. So, we have included an annex with two papers published in international journals.

# **INTRODUCCIÓ**

## **1. Aspectes generals: clínica, epidemiologia i tractament**

### **1.1 Concepte**

El carcinoma basocel·lular (CBC), descrit per primera vegada al 1827 per Jacob<sup>1</sup>, és el càncer més freqüent a l'ésser humà<sup>2</sup>, representant un 80% del càncer cutani no melanoma<sup>3</sup> i el 25% del total de les neoplàsies diagnosticades als Estats Units<sup>4</sup>. La seva incidència al global del món sencer encara està incrementant un 10% de forma anual, sobretot en dones joves<sup>5</sup>. En menors de 30 anys, al Regne Unit, la incidència al 2006 era de 1.79/100.000 habitants/any (al 1989 era de 0.73, el que representa un augment de 8.53%)<sup>6</sup>. Aquestes xifres tan elevades, comporten de forma inherent que es destinin quantitats ingents de diners dels sistemes de salut al seu diagnòstic i tractament.

Característicament es defineix com un tumor epidèrmic maligne, de creixement lent però localment invasiu, que de forma predominant afecta a la població blanca. Malgrat això, les metàstasis són rares (0.03 – 0.55%) i es localitzen a ganglis limfàtics, pulmons, ossos, fetge o pell<sup>7,8</sup>.

La importància d'aquesta neoplàsia rau en la gran morbiditat que ocasiona a causa de la invasió i destrucció del teixit local, particularment de les zones fotoexposades (sobretot cap i coll, on s'estima que es localitzen un 85% dels casos)<sup>9,10</sup>, amb el consegüent compromís funcional i estètic que se'n deriva.

Des del punt de vista mèdic, el CBC es pot catalogar com “el tumor del dermatòleg”, ja que pel seu alt nombre de diagnòstics (sobretot al nostre entorn, com veurem més endavant a l'epidemiologia), el professional ha de desenvolupar una notable destresa tant en el diagnòstic com en l'avaluació del tractament a escollir.



Per tant, es pot considerar que la importància del carcinoma basocel·lular té una doble vessant: constitueix un greu problema de salut, al ser el càncer més freqüent del món, i econòmicament representa una elevada font de despesa als sistemes de salut.

## **1.2 Classificació**

Per la seva classificació s'han de tenir en compte tant les característiques clíniques com les histològiques, entre les quals existeix una certa correlació amb implicacions pronòstiques.

### **1.2.1 Classificació clínica**

L'aspecte clínic dels CBC és molt variat i les classificacions són múltiples. Per descriure de forma simple els diferents subtipus, els dividirem en les cinc formes més utilitzades a la pràctica dermatològica diària; aquestes són nodular, superficial, *ulcus rodens*, esclerodermiforme i pigmentat. (figura 1). A més, hi ha dues formes especials, que són el fibroepitelioma de Pinkus i el CBC terebrant, que malgrat ser rares també s'han de tenir en compte.

- **Nodular**: és el subtipus clínic més freqüent. Es presenta com una pàpula o un nòdul circumscribit, eritematós o blanc nacrat, on es poden distingir telangiectàsies. Es localitzen preferentment a la cara i el coll.

Els CBC nodulars es poden dividir en diversos subtipus, que encara que descrits a la bibliografia, s'utilitzen molt poc en la pràctica clínica diària. Aquests són: el **perlat quístic**, que està format per diversos nòduls perlats, amb vora elevada i superfície plena de telangiectàsies; el **perlat ulcerat**, que no deixa de

ser un perlat simple que ha evolucionat fins la ulceració i el **pla-cicatritzial**, que és freqüent a temples i galtes i consisteix en una placa llisa, rosada amb moltes telangiectàsies, delimitada per vores sobreelevades i perlades, que s'anirà cobrint de crostes hemorràgiques. També formen part d'aquest grup l'**úlcero-cicatritzial** que és quan l'anterior s'ulcera i el **vegetant**, tumor papil·lomatós que s'assembla al carcinoma escatós.

- **Ulcus rodens**: és aquell CBC que està ulcerat des del principi, amb tendència al sagnat i crosta adherida. Les vores són llises, i el fons està infiltrat. Sol ser de mal pronòstic per la capacitat invasiva que té i la resistència als tractaments locals.

- **Superficial**: es localitzen, sobretot, al tronc. Gairebé són asimptomàtics i de creixement molt lent. Es poden confondre amb èczemes i divideixen 2 en subtipus:

- **eritematós**: placa eritematosa (de vermell viu a rosada) infiltrada, amb vores elevades i brillants.

- **pagetoide**: placa plana de color vermell-grisós amb escata adherida.

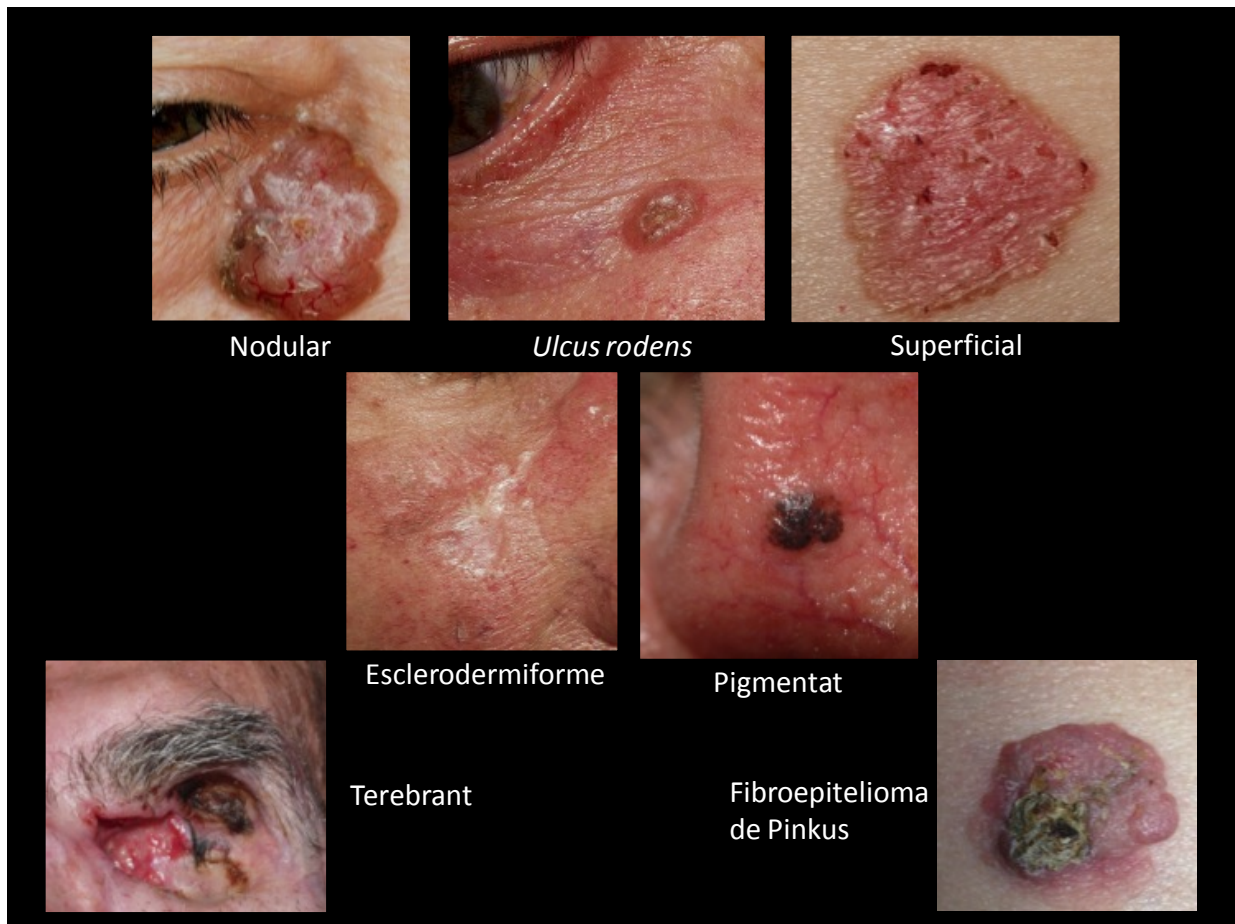
- **Esclerodermiforme**: placa de color ivori, dura al tacte i engruixida, que simula una cicatriu o una placa de morfea. Les vores no es poden delimitar fàcilment i té un creixement agressiu, el que implica que es consideri el de pitjor pronòstic.

- **Pigmentat:** qualsevol de les formes anteriors pot presentar focus de pigmentació clínica per augment dels melanòcits i presència de melanòfags. És més habitual a les formes nodulars i superficials i es pot confondre clínicament amb un melanoma.

- **Fibroepitelioma de Pinkus:** És una pàpula rosada, que es localitza habitualment a la regió dorsal baixa. Pot confondre's amb lesions benignes (acrocordons, papil·lomes cutanis, queratosis seborreiques...).

Les formes finals, a les quals s'arriba per deixadesa del pacient o manca de resposta a tractaments realitzats, reben el nom de **terebrants**. Es tracta de tumors que infiltren estructures adjacents resultant altament mutilants i fins i tot, letals.

**Figura 1:** Classificació clínica del carcinoma basocel·lular.



### 1.2.2 Classificació histològica<sup>4</sup>

L'arquitectura histològica del CBC és clau per establir el comportament, i per tant, el pronòstic. Per aquest motiu, la classificació segons la histologia es considera més important que la clínica i és la que més freqüentment es fa servir. Així distingirem entre dos grups, el sòlid (o indiferenciat) i aquells que presenten característiques de diferenciació.

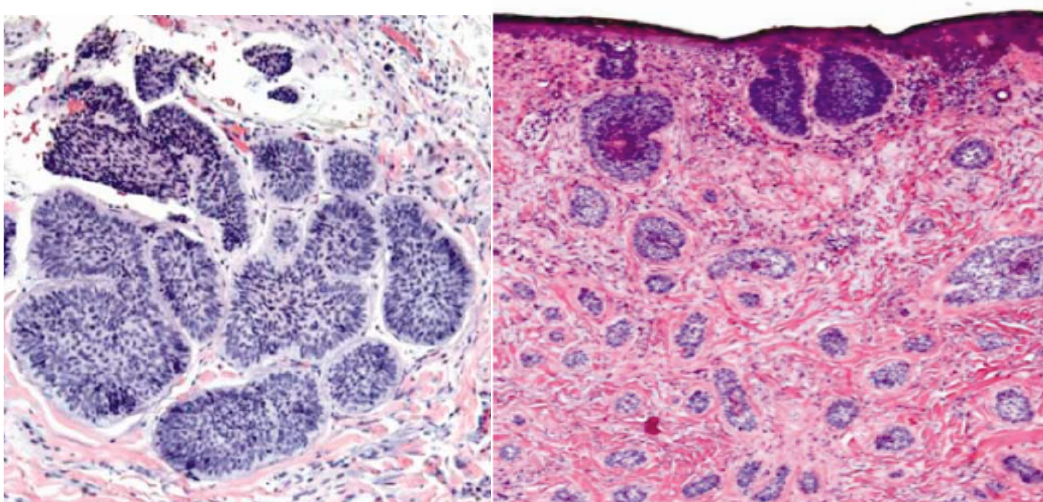
### 1.2.2.1 Formes indiferenciades

Aquí es divideixen en formes de creixement indolent (nodular i superficial) i formes de creixement agressiu (esclerodermiforme, basoescatós i infiltrant).

#### De creixement indolent

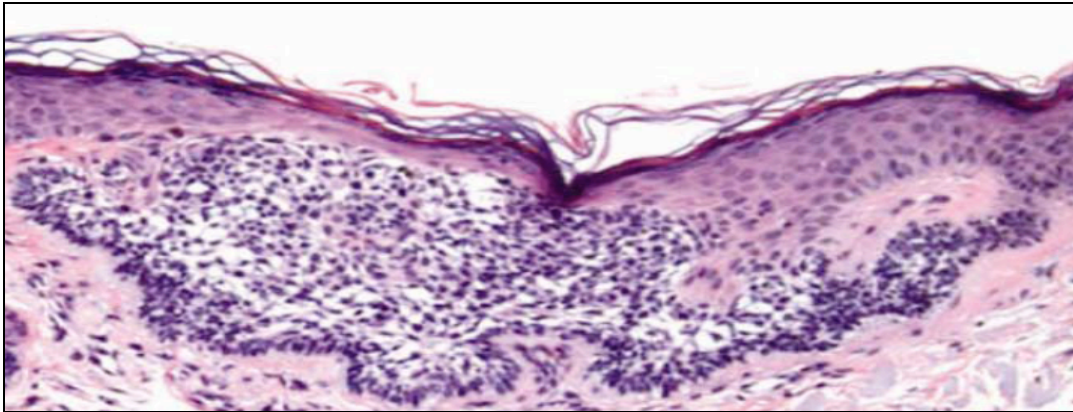
- **Nodular** (o nòdulo-quístic) (60%): és la forma més freqüent. Està format per nius de cèl·lules basaloides de diferent mida tant a la dermis papil·lar com a la reticular, formant també esquerdes amb l'estroma. Es pot trobar melanina a dins el tumor i histiòcits a l'estroma (figura 2).

- **Micronodular**: Es manifesta com a nius tumorals amb una forma similar al nodular, però més petits i molt dispersats en una distribució asimètrica que s'estén per tota la dermis i la hipodermis (figura 2).



**Figura 2:** A l'esquerra, imatge histològica d'un CBC nodular, a la dreta, la d'un micronodular.

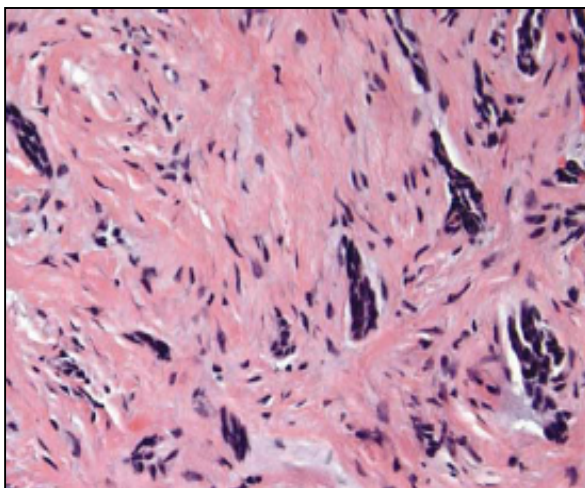
- **Superficial** (representa aproximadament un 25% del total): es caracteritza per una proliferació de cèl·lules basaloides atípiques que es col·loquen de forma paral·lela a la superfície epidèrmica, formant fenedures entre les cèl·lules de la palissada i l'estroma. Pot tenir pigment en algunes ocasions (figura 3).



**Figura 3:** Histologia d'un CBC superficial.

#### De creixement agressiu

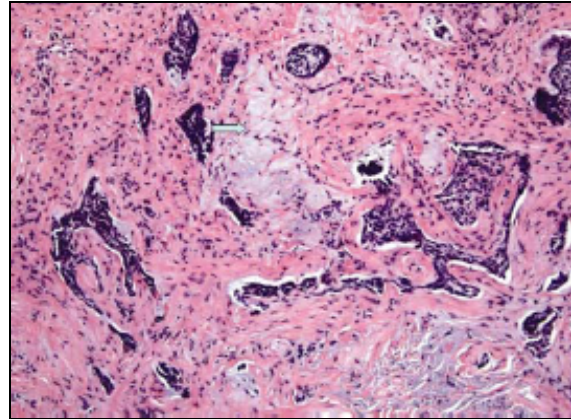
- **Esclerodermiforme** (1-5%): Són columnes de cèl·lules basaloides que s'endinsen en un estroma molt dens de col·lagen i fibroblasts fins al teixit subcutani. Les cèl·lules presenten abundant mitosis i necrosis. Aquí les fenedures entre epiteli i estroma són poc freqüents (figura 4).



**Figura 4:** Característiques histològiques del CBC esclerodermiforme.

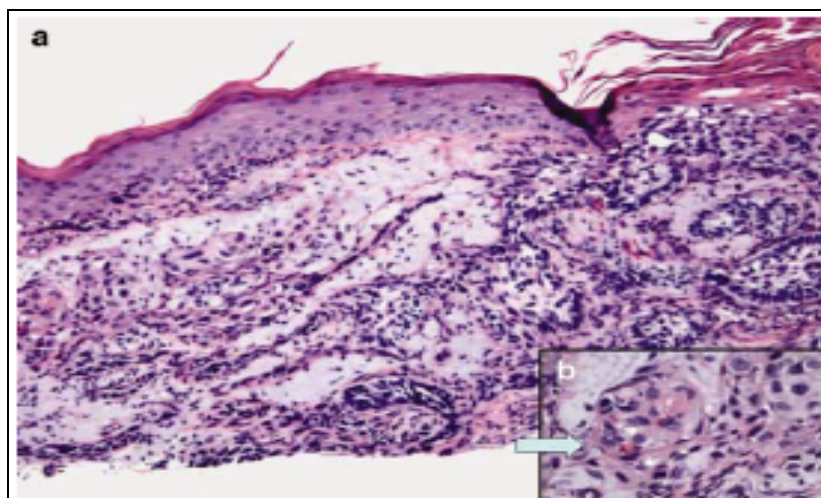


- **Infiltratiu:** Els nius de cèl·lules tumorals tenen mides irregulars, angulacions agudes a la perifèria i molta activitat mitòtica. Òbviament, arriben a hipodermis. L'estroma és fibrós (figura 5).



**Figura 5:** Aspecte histològic del CBC infiltratiu. La fletxa assenya elastosi solar.

- **Basoescatós:** Aquí es veuen grans llengües dentades infiltrants de cèl·lules tumorals, amb morfologia clarament basaloide però palissada perifèrica abortiva. Hi ha àrees que mostren ponts entre les cèl·lules i queratinització citoplasmàtica (figura 6).



**Figura 6:** (a) les llengües de cèl·lules tumorals infiltren la dermis al CBC basoescatós. (b) la fletxa assenya en detall la queratinització citoplasmàtica a les àrees escatoses.

### 1.2.2.2 Formes diferenciades

La diferenciació que presenten no afecta al pronòstic.

- CBC **queratòsic** (o pilar): aquesta forma està composta per nius tumorals arrodonits que presenten queratinització i degeneració central. Típicament, aquests quists estan mancats de capa granulosa i estan plens de queratina i runes de paraqueratosi. És una variant del CBC nodular.

- CBC **infundibuloquístic**: La proliferació de cèl·lules basaloides està típicament en continuïtat amb l'epidermis suprajacent i es mostra com nius allargats i arrodonits que envolten estructures plenes de queratina, revestides per una epiteli estratificat que mostra una capa de cèl·lules granuloses. Les cèl·lules que revesteixen aquests quists plens de queratina manifesten diferenciació progressiva escatosa amb una vora exterior basaloide.

- CBC **fol·licular**: En aquesta forma, al voltant dels nius tumorals, hi ha unes cèl·lules sense nucli i citoplasma eosinòfil, que recorden a les "cèl·lules fantasma" del pilomatrixoma, que acompanyen a zones de calcificacions.

- CBC **pleomòrfic**: Tenen la mateixa arquitectura que el nodular, però amb nucli gegant i hipercromàtic amb citoplasma amorf.



- **Fibroepitelioma de Pinkus:** es manifesta com uns filaments allargats de cèl·lules epitelials basaloides immersos en un estroma format per abundant col·lagen i matriu mixoide. La transició epiteli estroma està separat per fenedures.

- CBC amb diferenciació a altres estructures: com a glàndula sebàcia o a conducte sudorípar.

### **1.3 Pronòstic**

El pronòstic depèn d'altres factors a part del subtipus histològic. Aquests són la mida, la localització, la mala delimitació dels marges (pobrament definits clínicament), la invasió perineural, la manca de resposta a tractaments previs (o recurrència) i la immunosupressió<sup>11</sup>. La mida influeix en la resposta al tractament. Per això, en CBC grans i gegants (es consideren així els majors de 5 cm) on no estigui indicada la cirurgia és recomanable la combinació de diversos tractaments mèdics<sup>12</sup>.

Segons la localització, els CBC d'alt risc són els que es localitzen al nas, solc nasogenià, parpelles i àrees periorbitals, llavis, mentó i orelles (per les estructures veïnes que pot afectar), els de risc intermedi estan situats a cuir cabellut, front, zones malars i preauriculars i es consideren de baix risc aquells que afecten el coll, el tronc i les extremitats<sup>13</sup>.

#### **1.4 Epidemiologia**

Com ja s'ha comentat anteriorment, la importància d'aquesta patologia resideix en les altes taxes d'incidència a les que s'associa. Degut al gran impacte que causen aquestes xifres i la despesa econòmica que comporta als sistemes de salut, són molts els estudis epidemiològics publicats, de forma constant, sobre les diferents poblacions d'arreu del món. La despesa ocasionada als Estats Units d'Amèrica va ser de 426 milions de dòlars a principis dels 2000, representant el 5è càncer que més despesa ocasiona<sup>14</sup>. Al 2002, les xifres a Anglaterra van ser de 190 milions de lliures<sup>15</sup> i a Alemanya, el mateix any, la despesa fou de 130 milions d'euros. A Austràlia, el 2001, el diagnòstic i tractament del CBC va ocasionar una inversió de 264 milions de dòlars al sistema de salut<sup>16</sup>.

Malgrat les múltiples dades disponibles sobre incidència, certament és difícil la comparació d'aquestes, ja que als diferents estudis les estadístiques s'expressen o bé en taxes crues o bé estandarditzades ja sigui a la població mundial, a l'europea o a l'americana. Aquestes xifres, però, ens serveixen per fer-nos una idea generalitzada, a grans trets, de la magnitud de la importància d'aquest tumor. Revisant la literatura, i desgranant els estudis més recents (les dades es recullen a la taula 1), podem veure que on més s'estudia és al Regne Unit. A Anglaterra, la incidència a l'any 2006, s'estima de 76.21 per cada 100.000 habitants/any si estandarditzem a la població europea<sup>17</sup> (a partir d'ara, sempre en referirem a valors d'incidència per cada 100.000 habitants i any), amb grans diferències segons la zona d'estudi. Al sud-est i a Londres, els valors són realment molt baixos; 0.43 i 0.24 respectivament, explicant-se per les diferències ètniques dels pobladors d'aquestes zones, de fototipus foscos

degut a la forta immigració. En canvi, al nord d'Anglaterra les xifres són similars a les regions veïnes, amb taxes que s'aproximen als 100 casos nous per cada  $10^5$  habitants/any. Així, aquestes xifres poden extrapolar-se, estandarditzades respecte la població mundial, a països com Escòcia (97.5 per homes i 67.4 per dones al 2003)<sup>18</sup>, Gal·les (114.2 al 1998, repartit en 127.9 en el sexe masculí i 104.8 en el femení)<sup>19</sup>, Irlanda del Nord (94 a homes i 72 a dones, al 2002)<sup>20</sup> i la República d'Irlanda (91 al 2011, 98 per a homes i 85.7 per a dones)<sup>21</sup>.

A l'Europa continental, els valors d'incidència del CBC varien força entre els països. Als Països Baixos, les taxes són de 148 en homes i 141 en dones (any 2008, estandardització europea) o bé 101 en ambdós sexes si l'estandardització és mundial<sup>22</sup>. A Dinamarca, també trobem números força elevats, ja que l'any 2007 la incidència (estandarditzada respecte població mundial) era de 91.2 en homes i 96.6 en dones<sup>23</sup>. La incidència de CBCs a Itàlia és de 87.9 (incidència crua a 2003)<sup>24</sup> i Suïssa és del 69.3 a homes i 62.2 a dones (any 1992, estandarditzat a població mundial)<sup>25</sup>. Com a dada curiosa, destacar que el país helvètic és el situat a major alçada d'Europa i per tant, el que més radiació ultraviolada rep. La zona italiana fronterera amb Suïssa té les mateixes característiques, mostrant així unes xifres similars al veí. A Alemanya, el 2003 les taxes ajustades a població mundial eren de 82.7 en homes i 71.1 en dones<sup>26</sup>. A l'altra cara de la moneda, trobem Croàcia amb taxes d'incidència crua de 54.9 a homes i 53.9 a dones l'any 2005<sup>27</sup>, Finlàndia, amb incidència ajustada a població mundial de 49 en homes i 45 a dones (any 1995)<sup>28</sup> i Eslovàquia, amb 38 casos nous estandarditzats segons població mundial cada  $10^5$  habitants/any (1994)<sup>29</sup>.

Segons els darrers treballs, a l'Europa continental, la incidència creix un 1/100.000 habitants/any, mentre que al Regne Unit ho fa un 6/100.000 habitants any. El perquè no s'ha establert i serien necessaris més estudis<sup>17</sup>.

Austràlia és on la incidència és més alta d'arreu del món. La causa és l'elevada exposició a la radiació ultraviolada, degut al forat a la capa d'ozó que afecta aquesta àrea. A la literatura s'hi troben fins a 16 estudis, dels quals es pot concloure que combinant els dos sexes, la incidència és de 884 /100.000 habitants/any, unes 10 vegades més que al Regne Unit. També hi ha variacions entre les zones estudiades. Les xifres més espectaculars són les de Nambour, Queensland (a l'est) on la incidència és de 1514 l'any 2006 (ajustat a població mundial, 1813 en homes i 1269 en dones)<sup>30</sup>.

L'evidència més gran de que la incidència de CBC incrementa si ens apropem a latituds més baixes (o sigui, a més radiació ultraviolada) és el cas d'Estats Units d'Amèrica, on hi ha una gran diferència entre els estats del nord i els del sud. Si mirem al nord, a New Hampshire<sup>31</sup> i Minnesota<sup>32</sup>, durant la dècada dels noranta, la incidència estandarditzada a la població mundial era de 170 i 146, respectivament. En canvi, els estudis realitzats al sud, l'estat d'Arizona, al 1996 ens ensenyava unes xifres crues de 935.9 en homes i 497.1 en dones<sup>33</sup>.

Al Canadà, els estudis fets a Manitoba<sup>34</sup>, que està a igual latitud que Europa, la incidència ajustada a la població mundial és de 93.9 a homes i 77.4 en dones (any 2000), mentre que a Alberta<sup>16</sup>, les mateixes estimacions són de 147 en homes i 119 en dones (any 2006).

A la resta de la geografia mundial, pocs són els treballs publicats. A Jordània, l'any 2000, la incidència era de 8.8, ajustat a la població mundial<sup>35</sup>. Malgrat que la latitud és la mateixa que els EUA, les xifres són molt menors, demostrant els efectes del tipus de pell.

A Colòmbia<sup>36</sup>, la taxa és de 41 per 10<sup>5</sup> habitants/any, l'any 2007.











A l'estat espanyol, les dades són disperses. A Sòria<sup>37</sup>, la incidència ajustada a població mundial era de 57.9 l'any 2000. A Granada, la taxa crua al 2000 era de 51.6 per homes i 40.6 per a dones<sup>38</sup>. Xifres més elevades trobem a Mallorca amb dades crues de 100.8 a homes i 72 a dones (període 1993-1997)<sup>39</sup> i a Navarra, on són de 88.1 i 67.5 respectivament (període 1998-2002)<sup>40</sup>.









Si analitzem el nostre entorn, també hi ha dades publicades sobre Catalunya. Així, al barcelonès nord, al 2007, la incidència era de 128/100.000 habitants/any, si estandarditzem a la població mundial o 195.5 si és europea (la taxa crua és de 253.2)<sup>41</sup> i a Girona<sup>42</sup>, el 2007 la incidència estandarditzada a la població mundial era de 44.56.

Ja al nostre territori, la incidència crua a Lleida l'any 2009 va ser de 137.5 casos nous per cada 100.000 habitants, segons el nous diagnòstics registrats al servei de dermatologia de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova. Aquest índex elevat es pot explicar per la gran quantitat de població que desenvolupa una feina agrícola a les nostres contrades. Un altre estudi sobre població lleidatana és la tesi de la Dra. Marta Ortega, on l'any 2003 detecta una

prevalença de CBC de 1.83% en persones (no disposem, però, de dades d'incidència per comparar)<sup>43</sup>.

## Introducció

PAÍS	LOCALITZACIÓ ESTUDI	ANY	ESTANDARDITZACIÓ	INCIDÈNCIA TOTAL	INCIDÈNCIA HOMES	INCIDÈNCIA DONES
<b>Lleida i entorn</b>						
	Lleida	2009	Crua	137.5		
	Barcelonès Nord	2007	Crua/Mundial/Europea	253.2/128/195.5		
	Girona	2007	Mundial	44.56		
<b>Europa continental</b>						
	Sòria (nord)	2000	Mundial	57.9		
	Navarra (nord)	2002	Crua		88.1	67.5
	Granada (sud)	2000			51.6	51.6
	Mallorca	1997			100.8	72
	Trentino, Itàlia	2003	Crua	87.9		
	Global dels Països Baixos	2008	Europea		148	141
			Mundial		101	101
	Vaud, Suïssa	1992	Mundial		69.3	62.2
	Northrhine-Westphalia, Alemanya	2003	Mundial		82.7	71.1
	Global de Croàcia	2003	Crua		54.9	53.9
	Global d'Eslovàquia	1994		38		
	Global de Dinamarca	2007	Mundial		91.2	96.6
	Global de Finlàndia	1995	Mundial		49	45

<b>Regne Unit i Eire</b>						
	Global d'Anglaterra	2006	Europea	76.21		
	Global d'Escòcia	2003	Mundial		97.5	67.4
	West Glamorgan, Gal·les (sud)	1998	Mundial	114.2	127.9	104.8
	Global d'Irlanda del Nord	2002	Mundial	86.8	94	72
	Global de la República d'Irlanda	2011	Mundial	91	98	85.7
<b>Amèrica del Nord</b>						
	Nord (N. Hampshire)	1996	Mundial	170	310	166
	Nord (Minnesota)	1984	Estats Units	146	175	124
	Sud (Arizona)	1996	Cruces		935.9	497.1
	Manitoba	2000	Mundial		93.9	77.4
	Alberta	2006			147	119
<b>Oceania</b>						
	Global d'Austràlia	mitja	Mundial	884		
	Nambour, Queensland	2006			1514	1813

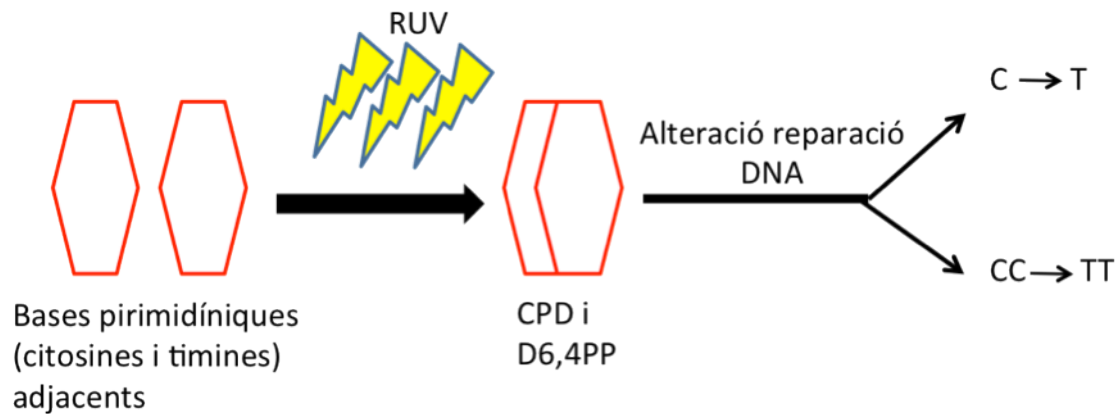
**Taula 1:** Resum de les dades epidemiològiques recollides a estudis d'arreu del món. (\*) la incidència es calcula per cada 100.000 persones/any.



### **1.5 Factors de risc**

El factor de risc més determinant a l'hora de desenvolupar un CBC és l'exposició solar acumulada al llarg de la vida<sup>44</sup>. Particularment afecta persones amb fenotips predisposats a rebre dany per radiació ultraviolada (RUV): és a dir, ulls blaus, pèl roig i abundants nevus i a aquelles que per feina o per oci han tingut exposició solar perllongada<sup>4</sup>. De forma recent, s'ha objectivat que molts d'aquests pacients han rebut radiació ultraviolada de forma artificial, provinents de cabines de bronzejat<sup>45</sup>, cosa que ha influït clarament en l'augment de la incidència actual i en la presentació a edats més precoces<sup>46</sup>.

La relació entre la radiació ultraviolada i el càncer cutani (inclòs el CBC) està ben establerta, ja que les mutacions trobades en aquests tumors presenten "l'empremta" típica d'aquestes irradiacions (figura 7). Tant la llum ultraviolada B (UVB) com la A (UVA), en menor mesura, produeixen un dany directe sobre l'ADN, generant fotoproductes típics d'aquesta agressió: els dímers de ciclobutà pirimidina i dímers 6,4 pirimidina pirimidona. Quan aquests fotoproductes no es reparen de forma adequada donen lloc a mutacions característiques; el canvi d'una única base citosina a timina o de dues citosines a dues timines<sup>47,48</sup>. Quan les mutacions induïdes per RUV es donen en gens clau pel control del cicle cel·lular és quan esdevenen les neoplàsies cutànies. Aquestes "empremtes de la RUV" es detecten en aproximadament el 40% de mutacions al gen PTCH al CBC esporàdic<sup>49</sup>. No hi ha xifres sobre la incidència de la RUV en la resta d'elements de la via hedgehog (veure més endavant).



**Figura 7:** Quan la radiació ultraviolada incideix sobre dues bases pirimidíniques contigües l'ADN pot formar unions covalents entre elles amb la producció de dímers de ciclobutà pirimidina (CPD) i 6,4 pirimidina pirimidona. Si no són reparades s'obtenen les mutacions típiques de la RUV.

Altres factors descrits són l'exposició a agents químics com l'arsènic i els derivats del quitrà. Actualment, molts estudis intenten relacionar el desenvolupament del CBC amb la infecció per determinats virus, sobretot pel virus del papil·loma humà<sup>50</sup>, i sembla haver-hi una relació que obre un interessant camp d'investigació i debat per futurs treballs.

Els CBCs poden sorgir sobre cicatrius, fistules, úlceres, cremades i focus d'inflamació crònica, motiu pel qual aquestes lesions també es consideren factors de risc. A més, múltiples genodermatosis i malalties congènites incrementen el risc de patir CBC, com el *xeroderma pigmentosum*, les síndromes de Gorlin-Goltz, Rasmussen, Rombo, Bazex-Christol-Dupré, l'albinisme i la malaltia de Darier. Les causes són l'alteració en la reparació de mutacions al DNA produïdes per la radiació ultraviolada o una disminució en la pigmentació cutània amb el consegüent augment de la susceptibilitat a

aquesta. Tots els factors de risc que s'han relacionat amb el CBC es resumeixen a la taula 2

**Taula 2:** Factors de risc que han sigut relacionats a l'aparició del CBC.

<b>Factors de risc associats a CBC</b>
<b>Ambientals</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Radiació ultraviolada</b> (és el principal)</li> <li>- Exposició a arsènic</li> <li>- Exposició a quitrans</li> </ul>
<b>Constitutius</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fototipus (pells clares, segons classificació de Fitzpatrick)</li> <li>- Predisposició genètica</li> <li>- Sexe masculí</li> <li>- Tendència a tenir nevus<sup>51</sup></li> </ul>
<b>Conductuals</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ús de cabines de bronzejat</li> <li>- Nombre de cremades que cursen amb ampul·les<sup>52</sup></li> <li>- Nombre d'anys fumant</li> </ul>
<b>Malalties genètiques i altres patologies</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Síndrome de Gorlin-Goltz</li> <li>- <i>xeroderma pigmentosum</i></li> <li>- Síndrome de Rasmussen</li> <li>- Síndrome de Rombo</li> <li>- Síndrome de Bazex-Christol-Dupré</li> <li>- Albinisme</li> <li>- Malaltia de Darier</li> <li>- Estats d'immunosupressió</li> <li>- Infeccions víriques</li> </ul>
<b>Trastorns integritat cutània</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cicatrius</li> <li>- Cremades</li> <li>- Fístules</li> <li>- Úlcères</li> <li>- Inflamació crònica</li> </ul>
<b>Tractaments mèdics<sup>53</sup></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Radioteràpia</li> <li>- Fototeràpia (sobretot PUVA)</li> <li>- Immunosupressió (post-transplantament o altres causes)</li> </ul>

**Taula 3:** Fototipus de la pell humana segons la classificació de Fitzpatrick.

Fototipus de Fitzpatrick	
I	Individus pèl-rojos, d'ulls verds. Sempre es cremen, mai es bronzegen
II	Individus de pèl ros i ulls blaus. Sempre es cremen, a vegades es bronzegen
III	Individus de pèl castany i pell mat. A vegades es cremen, normalment es bronzegen
IV	Individus morens i pell mat. Fàcil bronzejat, rarament es cremen
V	Individus mediterranis, magrebins i hindús
VI	Individus de pell negra

## 1.6 Tractament

Com a tractament del CBC es fan servir una àmplia gamma d'alternatives. A l'hora de triar una opció o una altra, s'ha de tenir en compte si el CBC és d'alt o de baix risc i els resultats cosmètics de la intervenció que realitzem (sí bé es cert que es tracta d'un tumor i l'objectiu primordial és eradicar-lo).

La tècnica que resulta més efectiva en quant a l'exèresi del tumor sencer i la prevenció de recidives posteriors és l'extirpació quirúrgica i per això és el tractament d'elecció en tumors d'alt risc. En aquells casos amb marges mal definits o en zones on per les seves característiques hem d'estalviar teixit és important realitzar un control intraoperatori dels marges; aquesta tècnica s'anomena cirurgia de Mohs.

Els CBCs de baix risc es poden tractar amb altres tècniques quirúrgiques com el curetatge, la criocirurgia (amb nitrogen líquid), i el làser de CO<sub>2</sub>. Altres tècniques són les destruïtives no-quirúrgiques, com la radioteràpia, la teràpia fotodinàmica i el tractament tòpic amb imiquimod (immunoestimulador) o 5-fluorouracil (agent quimioteràpic)<sup>54</sup>. Aquests dos darrers grups terapèutics no ens permeten el control histològic dels marges i per tant, comporten un control més estret del pacient<sup>55</sup>.

Els darrers avenços en el coneixement de l'etiologia molecular del CBC permeten el desenvolupament de fàrmacs que actuen sobre la via de senyalització alterada en la formació del tumor (veure més endavant), molt útils en aquells pacients amb lesions múltiples (per exemple, la síndrome de Gorlin) o en aquells casos avançats o metastàsics on la resta de tractaments siguin inviablès. Entre ells, n'hi ha de sistèmics, com la ciclopamina (poc utilitzat a causa dels seus efectes secundaris) i el recentment aprovat vismodegib<sup>54,56</sup> i tòpics<sup>57</sup> com l'LDE225. Aquests fàrmacs, encara que en fase experimental o amb molt poca experiència clínica, obren un nou camp d'investigació en el tractament del CBC.

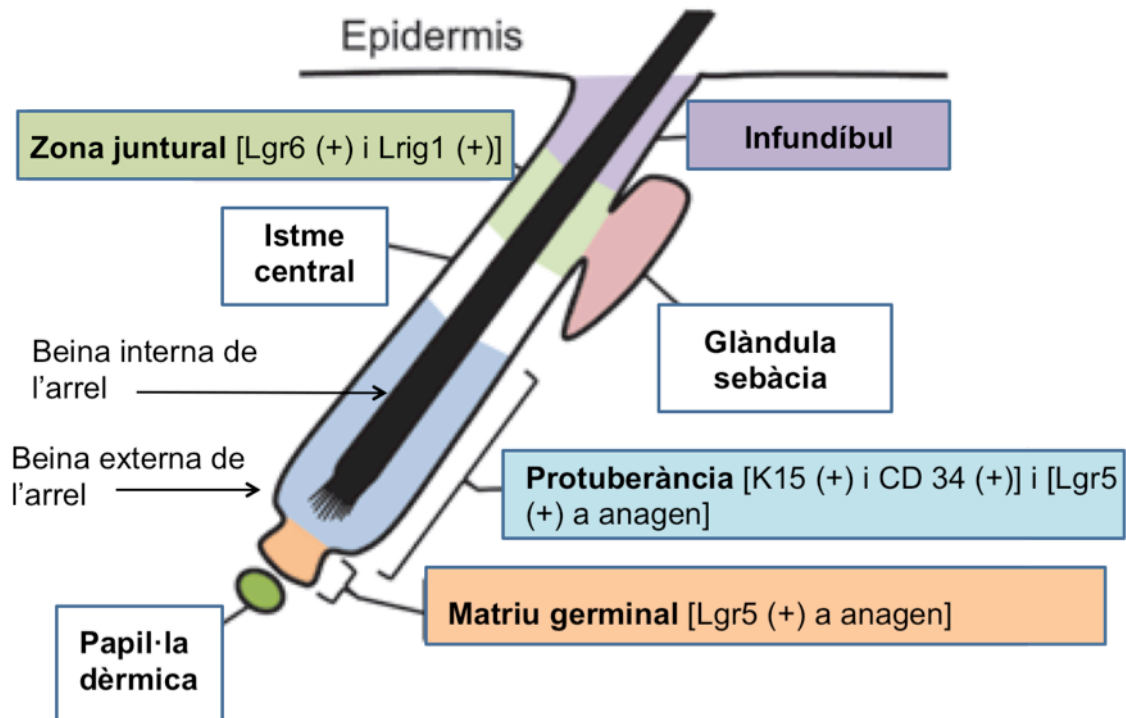
## **2. Fisiopatologia del carcinoma basocel·lular**

### **2.1 Origen cel·lular del carcinoma basocel·lular**

Identificar les cèl·lules que originen les neoplàsies humanes representa el major desafiament de la biologia del càncer. L'origen anatòmic del CBC és encara incert. A l'actualitat hi ha dues teories enfrontades sobre les cèl·lules on s'origina; d'una banda hi ha la hipòtesi, ja proposada al 1948 per Lever<sup>58</sup> i recolzada per Ackerman<sup>59</sup>, de que el tumor s'inicia a les *stem cells* del fol·licle pilós (FP). D'altra banda, estudis més recents proposen l'epiteli interfol·licular com a origen del CBC, sense especificar quines cèl·lules estarien implicades<sup>60,61</sup>. Aquestes dues teories han conviscut durant anys, però sembla que a hores d'ara, l'origen a les *stem cells* del FP s'està consolidant com a hipòtesi més probable.

Stem cells i fol·licle pilós

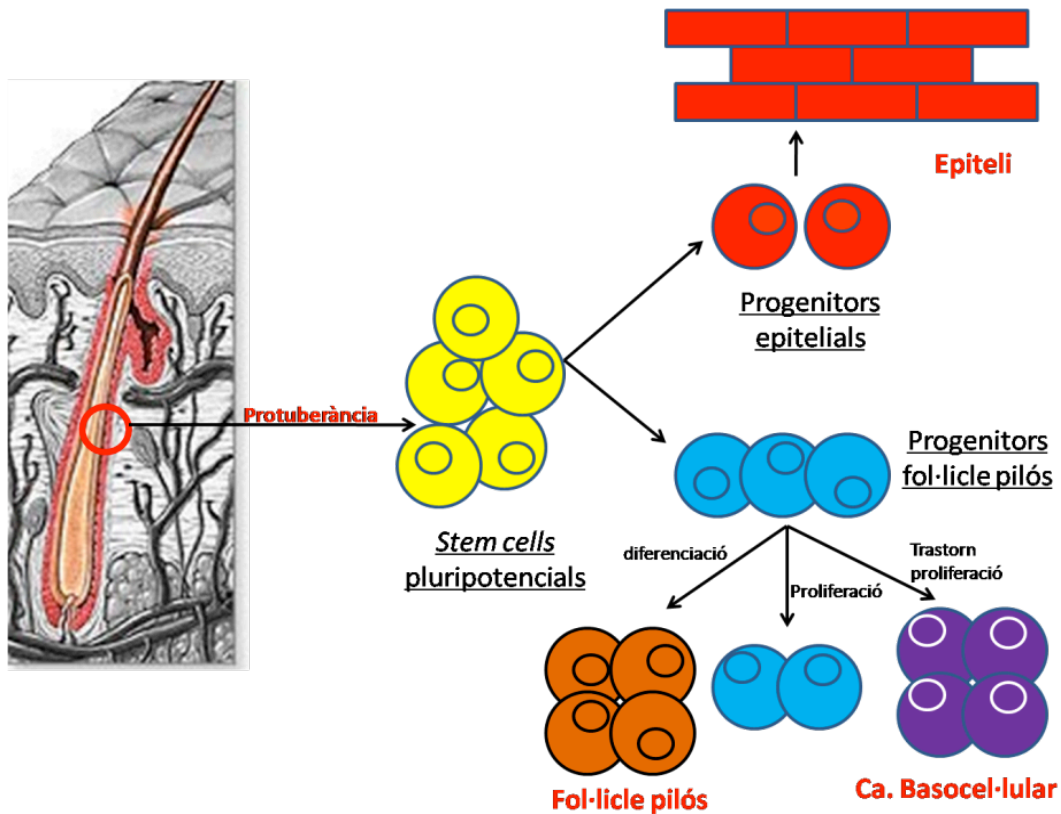
El FP és una gran reserva de *stem cells* epitelials i cèl·lules progenitores (figura 8). El grup més important està present a la protuberància, situada per sota de la desembocadura de la glàndula sebàcia i de la inserció del múscul *erector pili*. Aquestes expressen marcadors com la citoqueratina 15 (K15) i CD34. Un altre grup es localitza a la zona juntural, per sobre de la protuberància i properes a la glàndula sebàcia. Els marcadors que expressen són Lgr6 i Lrig1. El tercer grup, que expressa Lgr5, es troba a la matriu germinal del pèl i a la protuberància de les restes del FP a la fase de telogen, però es situa a la beina externa de l'arrel quan s'inicia la fase d'anagen<sup>62</sup>.



**Figura 8.** Esquema de l'estructura del fol·licle pilós en fase de telogen. Entre claudàtors, els marcadors que expressen les *stem cells* dels compartiments on pertanyen.

### Funció de les *stem cells* del FP

S'ha descrit que les *stem cells* multipotents del FP (localitzades a la protuberància) donen lloc tant a progenitors epitelials com als progenitors del fol·licle pilós. Els progenitors epitelials proliferen i es diferencien en epiteli estratificat. Els progenitors del FP són els precursors d'aquests (figura 9). La via Sonic Hedgehog és l'encarregada de regular la proliferació i el manteniment d'aquesta població (veure més endavant).



**Figura 9:** La protuberància del fol·licle pilós és rica en *stem cells*.

### Teoria de l'origen a les *stem cells* del fol·licle pilós

És la teoria que més consistència té i defensada per la majoria d'autors que han desenvolupat el tema. Són diverses les evidències que situen l'origen tumoral a les *stem cells* del fol·licle pilós<sup>63</sup>:

- Els CBCs expressen citoqueratines similars a les de la beina externa de l'arrel del pèl i no a les que s'expressen a l'epiteli interfol·licular.
- El CBC sorgeix com a resultat de l'activació aberrant de la via Sonic hedgehog, l'expressió de la qual es limita essencialment als FP.



- Després de l'exposició a radiacions ionitzants, la formació de CBCs al cuir cabellut ocorre de forma concomitant amb l'aparició de tricoblastomes, tumors molt similars al FP.

Aquesta teoria s'ha estudiat en models murins amb èxit. Wang *et al*<sup>63</sup>, van detectar K15 (com ja hem vist, present a *stem cells* de la protuberància) en CBC induït a ratolins. Grachtchouk *et al*<sup>64</sup>. també van observar en aquests mamífers que quan estimulaven la via hedgehog de les *stem cells* de la protuberància del FP, obtenien CBCs nodulars. En canvi, d'igual manera troben que si ho feien a l'epidermis interfol·licular, també en sorgien, però de tipus superficial.

#### Teoria de l'origen a l'epiteli interfol·licular (EIF)

Aquesta hipòtesi és més controvertida i pobrament demostrada de forma científica, ja que encara no s'ha pogut confirmar la presència de cap tipus concret d'*stem cell* específic a la capa basal de l'epidermis. Només hi ha un treball, de Youssef *et al.*, on aconsegueixen estimular la formació de CBCs provocant una hiperactivació de la via Sonic hedgehog a la pell interfol·licular i no al FP dels ratolins transgènics utilitzats<sup>61</sup>.

S'ha vist que a la capa basal de l'EIF hi ha heterogeneïtat proliferativa. D'aquí es dedueix que aquelles cèl·lules que es divideixen infreqüentment serien les *stem cells* que regularien l'homeòstasi d'aquest epiteli<sup>65</sup>. A la cua de ratolí, l'homeòstasi s'explica per un senzill model: una població única cel·lular té tres opcions estocàstiques de divisió, que són la formació de dues cèl·lules que es diferenciaran, dues cèl·lules que romandran indiferenciades, o una de cada. Un

equilibri simètric a l'hora de fer les divisions asseguraria aquesta autoregulació<sup>66</sup>. Si aquestes cèl·lules són *stem cells* només és una qüestió semàntica, ja que com em vist, tenen propietats d'autorenovació i diferenciació, però la seva capacitat de reparar el dany a l'epidermis no ha estat demostrada. A la capa basal de l'EIF humà també s'han identificat tipus cel·lulars amb índex de proliferació baix i amb marcadors de *stem cells* com integrines b1 i Lrig1. Aquestes, tendeixen a agrupar-se a la zona més inferior de la unió dermoepidèrmica, on sembla que hi ha un microambient específic que protegeix dels estímuls de diferenciació<sup>67</sup>.

S'especula que en el cas de CBCs sorgits a l'EIF, aquests també derivarien de *stem cells* del fol·licle pilós que han arribat aquí a través del procés de reparació de ferides. Es pensa que quan la pell rep una noxa (ja sigui una ferida física, una radiació, una úlcera crònica, etc...), es desencadena una resposta que fa que aquestes cèl·lules dels FP veïns, sobretot les Lgr5 (+), repoblin l'EIF danyat per reepitelitzar-lo<sup>62</sup>. Aquesta explicació és defensada per Grachtchouk *et al*<sup>64</sup> quan troben CBCs superficials a l'EIF dels seus ratolins (veure apartat anterior). A més, sembla que les vies Sonic hedgehog i Wnt, implicades en la gènesi del tumor (veure més endavant), són les que controlen el comportament de les *stem cells* durant la reparació de ferides, mentre que no estarien presents a les *stem cells* que presumptament poblarien l'EIF<sup>68</sup>

També s'ha dit que la mutació de p53 als queratinòcits de l'EIF, causada per la radiació ultraviolada, comporta una hiperactivació de la via Sonic hedgehog que explicaria el desenvolupament de CBC a aquesta zona<sup>63</sup>.

Com es pot comprovar, de moment no hi ha gaires arguments amb prou fonament científic que recolzin l'origen del CBC a l'EIP i sembla que la participació del FP és més evident. No obstant, seran necessaris més estudis per establir quina regió anatòmica és la responsable de la carcinogènesi d'aquesta neoplàsia.

## **2.2 Origen molecular del carcinoma basocel·lular**

Clàssicament, la formació del CBC s'ha associat de manera clara a l'activació constitutiva de la via Sonic hedgehog (Shh). La implicació d'aquesta via s'ha demostrat gràcies a l'estudi de la síndrome de Gorlin-Goltz o síndrome del CBC nevoide (SCBCN). Aquest trastorn congènit, autosòmic dominant, consisteix en el desenvolupament de nombrosos CBCs des d'edats primerenques, a més d'altres alteracions sistèmiques associades. Analitzant la genètica d'aquesta patologia, s'han identificat un ampli espectre de mutacions que inactiven el gen PTCH1 i condueixen a una hiperactivació constitutiva de la via, qüestió que ha sigut clau per entendre la patogènesi del CBC. Els pacients amb síndrome de Gorlin reben en herència una còpia mutada del gen PTCH1, localitzat al cromosoma 9q22.3, sorgint els tumors quan es perd l'heterozigositat.

Per tal de comprovar la relació entre aquesta via i l'oncogènesi del CBC, s'han fet diversos experiments en models murins, confirmant l'aparició de tumors en ratolins amb hiperactivació de Shh<sup>61,63</sup>.

Un cop coneguda la contribució d'aquesta mutació genètica a la tumorigènesi, el següent pas era identificar si els pacients amb CBC esporàdic mostren també mutacions que es manifestin com hiperactivació de la senyal hedgehog.

Malgrat que hi ha força variabilitat entre els diferents estudis, es calcula que entre un 50% i un 80% dels CBC esporàdics es deuen a alteracions de la via hedgehog, sobretot per mutacions a PTCH1 (30-60%) i SMO (10- 20%). Les alteracions de PTCH2, la proteïna Sonic i els factors GLI són molt rares<sup>69,70</sup>. Independentment de l'alteració de la via Shh, també cal destacar que les mutacions a p53 són presents, aproximadament, a la meitat de CBCs esporàdics. Aquest fet indicaria que possiblement seria necessària l'alteració concomitant d'aquestes dues senyals (Shh i p53) per la formació del tumor<sup>49</sup>.

Malgrat que la sobreexpressió de la via Sonic hedgehog constitueix el paradigma de la fisiopatologia del CBC, sembla ser que la formació tumoral també depèn de la intensitat de la senyal oncogènica, ja que una hiperactivació d'aquesta via per sota d'un determinat nivell comporta la formació d'altres hamartomes diferents al CBC<sup>64</sup>.

A causa de la seva presència i importància a altres teixits, la disregulació d'aquesta via també és responsable d'altres neoplàsies com el medul·loblastoma, el carcinoma escatós d'esòfag, el carcinoma de bufeta i algunes neoplàsies de mama, pulmó i pròstata<sup>71</sup>.

### Via hedgehog

La via hedgehog (Hh) va ser inicialment descrita a *Drosophila*. Els seus membres són gens encarregats de codificar la polaritat segmentària, sent responsables de determinar el desenvolupament anteroposterior de les estructures en la mosca del vinagre. Hedgehog, el lligand principal, és una molècula secretada que es modifica per addició d'una fracció de colesterol en

el seu extrem C-terminal i es sotmet a una escissió autocatalítica per donar un fragment actiu N-terminal. Mentre que a *Drosophila* només hi ha una única proteïna hedgehog general, en vertebrats s'han identificat tres proteïnes homòlogues: Sonic (Shh), Desert (Dhh) i Indian (Ihh). Estudis *in vitro* suggereixen que cadascuna d'aquestes proteïnes poden actuar a través de la mateixa via de transducció de senyal, i que els diferents gens regulen els patrons dels diferents òrgans segons les seves singularitats.

#### Descripció de la via Sonic hedgehog (Shh) (figura 10) <sup>72</sup>

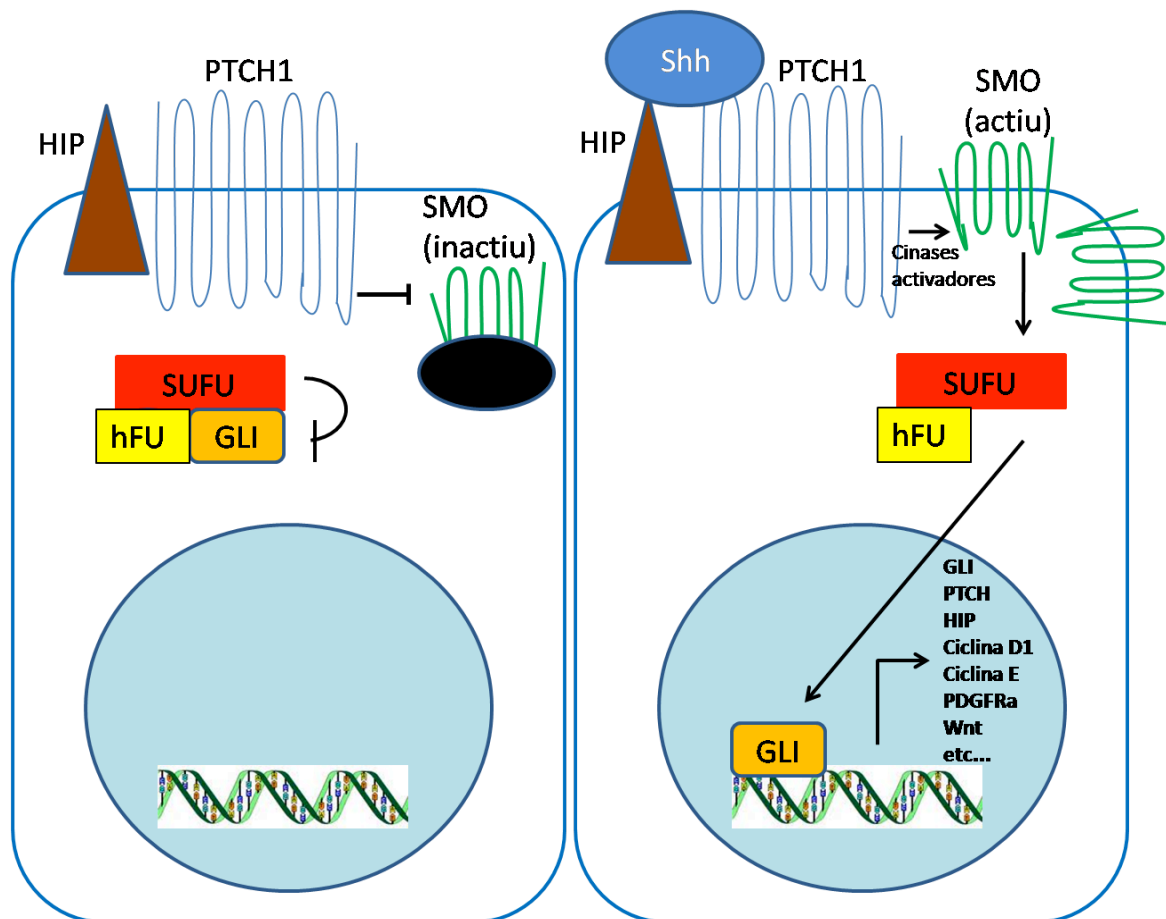
Shh és el lligand específic del receptors transmembrana *patched* 1 (PTCH 1) i *patched* 2 (PTCH 2). PTCH 1 és la forma majoritària a l'ésser humà. *Hedgehog interacting protein* (HIP) és una altra proteïna transmembrana capaç d'unir-se a Shh i serveix per limitar de quantitat de Shh disponible per la unió a PTCH.

En absència de lligand, la funció de PTCH és inhibir l'activitat de la proteïna *smoothed* (SMO). Quan Shh s'uneix a PTCH, s'inicien una sèrie d'esdeveniments que provoquen la fosforilació d'SMO i per tant la seva activació i acumulació a la membrana citoplasmàtica. Encara que aquest procés no està ben descrit del tot, se sap que intervenen diferents cinases, com la proteïna G acoblada al receptor de la cinasa 2 (GRK2), la caseïna-cinasa 1 i la proteïna-cinasa A.

L'activació de SMO condueix a la modulació del complex de proteïnes format pels factors de transcripció GLI (GLI1, GLI2 i GLI3, homòlegs de *cubitus interruptus* a *Drosophila*), i proteïnes conegudes com *fused* (hFu) i supressores d'aquestes (SuFu). Normalment el complex hFu/SuFu segresta els factors de

transcripció GLI al citoplasma. L'activació de SMO fosforila la família GLI i permet la translocació d'aquests al nucli (en absència de lligand estan ancorades a citoesquelet), on regulen l'activitat del seus gens diana, com WNT, BMP, ciclins D i E, MYC, HIP, components del factor de creixement epidèmic i del factor de creixement endotelial vascular i el mateix PTCH1 i GLI, entre d'altres<sup>69,70</sup>.

**Figura 10:** Descripció de la via Shh.



Funció de la senyal hedgehog

El gen hedgehog més estudiat als vertebrats és Shh, implicat en el desenvolupament embrionari del sistema nerviós central, les extremitats, els pulmons, les dents i dels fol·licles pilosos. Dhh i Lhh intervenen en el desenvolupament de les cèl·lules de la línia germinal i del sistema esquelètic respectivament<sup>71</sup>.

Via hedgehog i relació amb la pell

Durant l'embriogènesi, la senyal hedgehog és imprescindible per la formació del fol·licle pilós (FP). Aquesta, per tal de desenvolupar l'estructura del FP, regula la comunicació entre la placoda (epidermis primitiva) i les cèl·lules mesenquimals especialitzades que formen la papil·la dèrmica<sup>70</sup>.

A la vida adulta, la via Hh sembla tenir un doble efecte sobre la pell; d'una banda, és important pel manteniment del component cel·lular del FP i d'una altra banda, és el desencadenant del cicle del pèl:

- Pel que fa al manteniment del component cel·lular, les *stem cells* multipotents de la protuberància del FP expressen PTCH transitòriament quan proliferen i a l'inici de cada cicle del fol·licle pilós. Els progenitors del FP expressen PTCH quan proliferen, però s'infraregula quan entra en diferenciació. Així doncs, el patró d'expressió de PTCH reflexa el paper que té la senyalització de la via Hh en el manteniment de l'equilibri del compartiment *stem-cell*/cèl·lules progenitores.

- En quant a la funció d'aquesta senyal sobre la regulació del cicle del pèl, Hh és el factor desencadenant per iniciar la fase d'anagen al FP mitjançant l'expressió de la via Wnt/b-catenina<sup>70</sup>.

### **3. Altres vies de transducció de senyal implicades en la formació del CBC.**

#### 3.1 La importància de $\beta$ -catenina i la via Wnt (figura 11)

Recentment s'ha descrit el paper de  $\beta$ -catenina en el desenvolupament de diversos tumors d'estirp pilosa, entre ells el CBC, del càncer de pàncrees i del de pròstata<sup>73</sup>. B-catenina és una proteïna multifuncional que controla nombroses activitats, tant a la membrana citoplasmàtica com al nucli. A la membrana fa efecte de pont entre el citoesquelet i les cadherines, desenvolupant una funció estructural. Al nucli,  $\beta$ -catenina fa de mitjancera en la senyal Wnt/TCF<sup>74</sup>. Aquesta via és extremadament complexa i encara està en estudi.

Al citoplasma, la  $\beta$ -catenina que està lliure pateix una constant degradació proteolítica per part del complex format per les proteïnes GSK3 $\beta$ , APC i axina.

L'activació de la via Shh té un doble efecte sobre la regulació de  $\beta$ -catenina. Primerament, s'inhibeix aquest complex proteolític que la degrada, mitjançant la inducció de la via Wnt (no es coneix com s'activa). D'altra banda, també hi intervé la inducció de *Snail*, per part de Gli1, encarregat d'infraregular la transcripció d'E-cadherina<sup>75</sup>. El resultat d'ambdues accions és l'increment de la concentració de  $\beta$ -catenina lliure citoplasmàtica disponible per translocar-se al nucli. Això comporta l'activació dels factors de transcripció I $\kappa$ B/TCF (és un

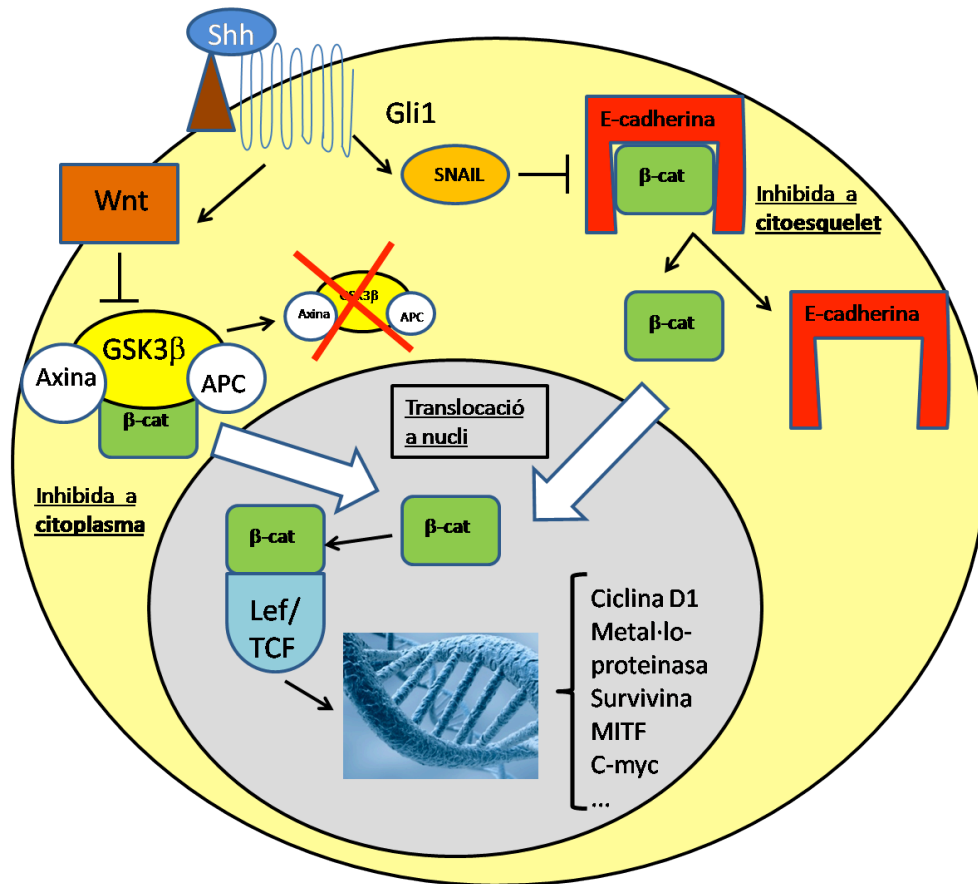


complex de proteïnes), induint la transcripció de gens que regulen el cicle cel·lular, com MYC, ciclina D1 i metal·loproteïnases de matriu extracel·lular, implicades en la degradació estromal<sup>76,77</sup>.

A més d'aquesta funció sobre la proliferació cel·lular, l'acumulació de  $\beta$ -catenina també afavoreix el creixement tumoral, ja que promou la transició epiteli – mesènquima (TEM). Com hem dit, un dels múltiples papers de  $\beta$ -catenina és l'estructural. El fet de deslocalitzar-se de la membrana provoca la pèrdua de l'adhesió cel·lular mitjançada per E-caderina a les cèl·lules epitelials, induint així un canvi de fenotip cap a mesènquima. Aquest mecanisme és afavorit per la senyal hedgehog i l'expressió de factors de la família *Snail*. La conseqüència és una reorganització del citoesquelet i l'adquisició de mobilitat cel·lular, que justificaria la migració i la invasió tumoral<sup>78,79</sup>.

Per tant, una alteració en la regulació en l'activitat Shh que impliqués activació constant, hauria de comportar una elevada concentració de  $\beta$ -catenina nuclear amb el corresponent augment de la proliferació cel·lular i la inducció de la transició epiteli - mesènquima.

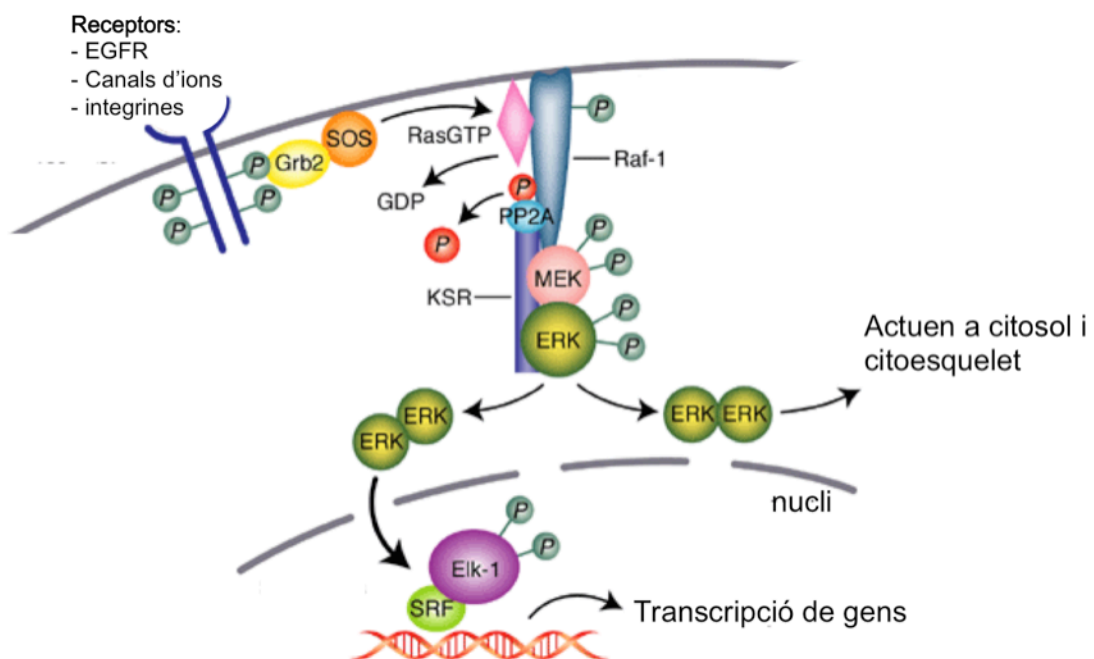
Figura 11: descripció de la via Wnt



### 3.2 Via ERK i carcinoma basocel·lular

La cascada de senyalització MAPK/ERK (figura 12) és activada per una gran varietat de receptors implicats en el creixement i la diferenciació cel·lular, incloent receptors de la tirosina cinasa (RTKs) - com el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR, per les sigles en anglès) -, integrines i canals d'ions. Els components específics de la cascada varien àmpliament segons els diferents estímuls, però l'arquitectura de la via normalment inclou un conjunt d'adaptadors (Shc, GRB2, Crk, etc...) que uneixen els receptors a factors d'intercanvi de nucleòtids guanina (SOS, CG3, etc...) i es transdueix la senyal a petites proteïnes d'unió a GTP (Ras, Rap1) les quals activen la unitat central de

la cascada composta per diferents cinases: MAPKKK (Raf), MAPKK (MEK1/2) i MAPK (Erk, de l'anglès *extracellular signal-regulated kinase*). El dímer d'Erk actiu pot regular objectius tant al citosol com al nucli, on fosforila una gran varietat de factors de transcripció, implicats en múltiples funcions cel·lulars com adhesió, progressió al cycle cel·lular, migració, supervivència, diferenciació, proliferació i metabolisme. El tipus de resposta cel·lular promoguda per l'activació d'Erk és complexa, ja que depèn de diferents circumstàncies, com el nivell de proteïna fosforil·lada i el temps d'activació (una senyal sostinguda promou diferenciació, mentre que una senyal transitòria afavoreix proliferació)<sup>80</sup>.

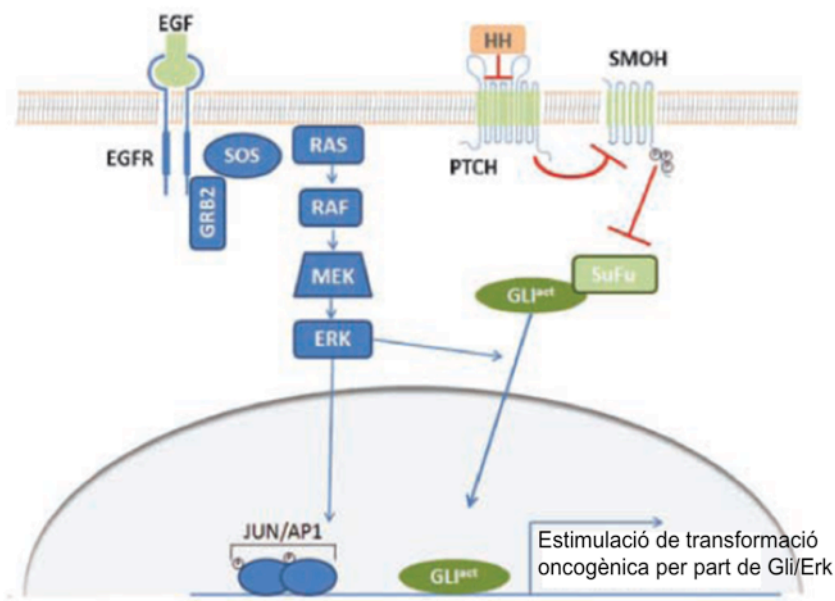


**Figura 12:** Esquema de la via Ras/Raf/Mek/Erk.

El paper que cursa la inducció d'aquesta via és important i conegut en el càncer de pàncrees i en la progressió del melanoma. Pel que fa al CBC, se sap que també està implicada, però el mecanisme no és conegut de forma completa.

Les dades que es coneixen avui en dia és que la via Erk actua de forma sinèrgica amb hedgehog en l'inici i el creixement del CBC. La senyal iniciada per EGFR, a través de l'activació de la via Ras/Raf/Mek/Erk, estimula la unió del complex JUN/AP-1 amb el DNA i coopera amb GLI per induir els gens que promouran la transformació oncogènica<sup>81</sup> (figura 13).

A més, també es suggereix que existeix un sistema de retroalimentació entre les dues vies, de manera que els productes resultants de l'activació de la via Erk són capaços de modular l'estabilitat, la localització subcel·lular i l'expressió de les proteïnes Gli, de forma independent a Shh<sup>81</sup> i per l'altre costat, l'activació del PDGF $\alpha$  (de l'anglès *platelet-derived growth factor*) per part de Gli1 induiria la via Erk<sup>82</sup>.



**Figura 13:** Model de cooperació entre les vies Ras/Raf/Mek/Erk i hedgehog, proposat per Schnidar *et al*, que comportaria l'inici i el creixement del carcinoma basocel·lular.

**HIPÒTESIS**

El plantejament d'aquesta tesi té com a base de treball diferents hipòtesis d'inici:

1- Les alteracions moleculars essencials en la formació d'un CBC poden canviar la fisiologia cel·lular de manera que aquestes alteracions i els fenotips es mantinguin en cèl·lules en cultiu. Per tant seria interessant analitzar el comportament *in vitro* de cèl·lules obtingudes de biòpsies de CBC.

2- Possiblement existeixen múltiples vies alterades durant la formació dels CBC. Per treballs genètics sabem que en un 50% dels CBC esporàdics hi ha alteracions en la via Hedgehog, però no està comprovat que addicionalment hi hagi altres vies alterades. A més, encara queda per explicar el 50% restant.

3- Independentment de l'existència de diverses vies afectades, creiem que moltes d'elles han de confluir en uns reguladors concrets que donarien els fenotips que caracteritzen els CBCs. Per exemple, les vies Hedgehog, WNT i ERK conflueixen totes en elevar l'expressió de ciclina D1 que regula l'estat proliferatiu.

4- També, podem hipotetitzar que les diferències que marquen el subtipus clínic del tumor (nodular, superficial...) es corresponguin a diferents alteracions específiques en l'origen del tumor.

**OBJECTIUS**

En relació a les hipòtesis plantejades els nostres objectius són:

1. Posta a punt de mètodes de cultiu primari i anàlisi molecular de cèl·lules de pell humana, tant sana com tumoral:

1a- Manteniment de cultius de queratinòcits i fibroblasts a partir de biòpsies.

1b- Dissenyar un protocol per a l'obtenció de proteïna total a partir de les biòpsies.

2. Caracterització de les alteracions moleculars dels carcinomes basocel·lulars esporàdics:

2a- Fins ara, l'estudi de la freqüència d'alteració de la via Sonic hedgehog en el carcinoma basocel·lular esporàdic s'ha realitzat analitzant alteracions genòmiques i estudis d'expressió dels mRNAs regulats per la via, principalment Gli1. El nostre objectiu en aquest punt és determinar per immunoblot el nivell d'acumulació de la proteïna Gli1 en les mostres de CBC i avaluar, a partir d'aquestes dades, la freqüència d'activació real de la via hedgehog en els CBCs esporàdics.

2b- Identificar quines serien les altres vies afectades, a partir o com alternativa de la via hedgehog. En concret volem analitzar les vies Wnt i Erk com a candidates a mediar en la formació dels CBCs.

3. Un tercer objectiu és determinar l'existència de divergències a nivell molecular entre els diferents tipus de CBC, per tal de poder establir marcadors específics i alternativament obtenir informació sobre els canvis inicials en la formació del CBC.



# **RESULTATS**

# **APARTAT 1**

## **Cultiu de cèl·lules tumorals de carcinoma basocel·lular.**

### **Introducció**

Amb l'objectiu de realitzar experiments amb carcinoma basocel·lular (CBC) resultaria interessant el fet de poder obtenir una línia cel·lular tumoral capaç de perpetuar-se a través de cultius successius. Revisant la bibliografia veiem que aquesta tasca no és gens fàcil, malgrat que es ve intentant des de fa molt de temps (el primer article publicat amb aquest objectiu data del 1968)<sup>1</sup>. Mentre que en el ratolí s'ha aconseguit fer cultius de CBC de més de 40 passatges<sup>2</sup>, hi ha pocs estudis (i són força antics) destinats al cultiu de cèl·lules de CBC humà i tots coincideixen en la gran dificultat que comporta establir-los a llarg termini. La ràpida queratinització de les cèl·lules *in vitro* i la mort que se'n deriva és la principal causa del fracàs en aquests experiments<sup>1,3</sup>. Sembla ser que el tipus de medi utilitzat i la concentració de calci són les claus per a un correcte creixement *ex vivo* del tumor, però els factors que impossibiliten la consecució d'aquestes línies cel·lulars romanen encara incerts.

Clàssicament, el cultiu d'aquestes cèl·lules s'ha anomenat "cultiu de queratinòcits" per la idea que el CBC derivava de les cèl·lules basals epidèrmiques. En aquest treball evitarem aquest terme, a causa de la incertesa de l'origen tumoral, que darrerament s'atribueix a les *stem cells* del fol·licle pilós (veure introducció) i farem servir el terme "cèl·lules basaloides" per referir-nos a les tumorals, nom més rigorós ja que es tracta d'una descripció morfològica i no implica relacionar-les amb el seu origen.

Destaquen, pel seu èxit, un treball xinès del 1994, on asseguren obtenir un cultiu de més de 100 passatges<sup>4</sup> i el treball de Grando i col·laboradors<sup>5</sup> al 1996. Centrant-nos en aquest darrer, el resultat dels cultius és la presència de tres tipus cel·lulars diferents: queratinòcits, fibroblasts i cèl·lules duals (fusiformes i alhora epitelioides).

Nosaltres, basant-nos en el mètode descrit per Grando *et al*<sup>5</sup>, i combinant-lo amb la tècnica de cultiu en ratolí de So *et al*, hem intentat posar a punt una tècnica de cultiu de cèl·lules basaloides de CBC. Per a la validació del mètode i del tipus cel·lular hem fet estudis de proliferació (BrdU) i immunofluorescència contra diversos marcadors (citoqueratina 5 i vimentina).

## **Material i mètodes**

### Recollida de cèl·lules tumorals

Es van recollir quinze CBCs de quinze pacients diferents que van ser intervinguts de forma consecutiva a la secció de dermatologia de l'Hospital Universtari Arnau de Vilanova de Lleida. Aquests pacients van ser triats a l'atzar sense tenir en compte edat, sexe, localització del tumor ni subtipus tumoral. Les mostres de CBC s'extreuen realitzant una biòpsia mitjançant punx de 4 mil·límetres al centre de la massa tumoral, després d'haver sigut extirpada quirúrgicament. Les mostres de pell sana van ser obtingudes de forma idèntica en zones lliures de qualsevol tipus de lesió de pacients intervinguts per causa no neoplàsica (extirpació de nevus, quists...). Un cop recollida la mostra, la guardem en medi de cultius de queratinòcits (Defined Keratinocyte-SFM,

GIBCO-Invitrogene) amb gentamicina 5µg/ml i *growth supplement* (10 µg/ml) a 4° fins el seu processament.

### Cultiu cel·lular

La biòpsia conservada a 4° (tant de teixit tumoral com sa) és rentada tres vegades amb solució PBS (buffer fosfat salí)-EDTA. Posteriorment, retallem l'epidermis (de 2 a 4 mm) del total de la mostra - amb tisores de dissecció - i es diposita en un tub amb 2 ml de tripsina 0.25% i 2 µl de gentamicina, deixant-se a 4° *overnight*.

Afegim 1 ml de DMEM (Dulbeccos modified Eagle's Medium) + sèrum dialitzat boví al 10% al tub per aturar l'efecte de la tripsina i la mostra es disgrega amb la pipeta. El component resultant és centrifugat a 1000 revolucions per minut durant 5 minuts.

El *pellet* de cèl·lules obtingut és resuspès en 40 µl de medi i repartim 10 µl per pou de 2 cm<sup>2</sup>. Les plaques estaven tractades amb col·lagen tipus I 100 µgr/ml.

Les cèl·lules es van incubar en 0.5 ml per pou dels diferents medis:

- DKSFM (Defined keratinocyte-serum free medium) + *growth supplement* (insulina, EGF i FGF) + antibiòtics ( penicil·lina/estreptomomicina 100 µgr/ml i gentamicina 10µgr/ml), seguint les instruccions del proveïdor (*Gibco Cat. No. 10744-019*).
- DKSFM (Defined keratinocyte-serum free medium) + FBS (*fetal bovine serum, Gibco Cat. No. 26400-036*) dialitzat + *growth supplement* (insulina,

EGF i FGF) + antibiòtics ( penicil·lina 100 µgr/ml i gentamicina 10µgr/ml)  
+ 0.1 mM de CaCl<sub>2</sub>.

- DMEM (*invitrogen*) amb 10% FBS.

Les cèl·lules es van mantenir a 37°C amb CO<sub>2</sub> al 5%. La incubació va ser de 15 dies, canviant el medi cada 2-3 dies.

### Immunofluorescència

Un cop rentat cadascun del pous amb PBS es va fixar la mostra amb paraformaldehid al 4% (300 µl) durant 15 minuts i es va permeabilitzar amb metanol (300 µl) durant 3 minuts.

Es torna a rentar i bloquejar amb BSA 5% (albúmina sèrica bovina) durant 30 minuts.

Un cop rentat amb PBS, afegirem l'anticòs primari a una concentració adequada en 300 µl de BSA 0.5% per cada pou i es deixa un temps variable, que pot ser *overnight*.

Abans d'afegir l'anticòs secundari la mostra és rentada amb PBS tres vegades. Farem servir l'anticòs secundari adient en concentració adequada en 300 µl de BSA 0.5% per pou, deixant-ho durant 45 minuts a temperatura ambient. Després de realitzar rentats tres vegades més, s'afegeix slowfade.

Anticossos:

**Marcatge amb brdU:**

Anticòs primari: *Rat*  $\alpha$  Brdu + CaCl<sub>2</sub> 2mM + MgCl<sub>2</sub> 5mM + DNAsa 0.025 U/ $\mu$ l.

Incubació durant 2 hores a temperatura ambient.

Anticòs secundari: *Goat*  $\alpha$  *Rat* 488 1/1000 + Hoescht 1/2000.

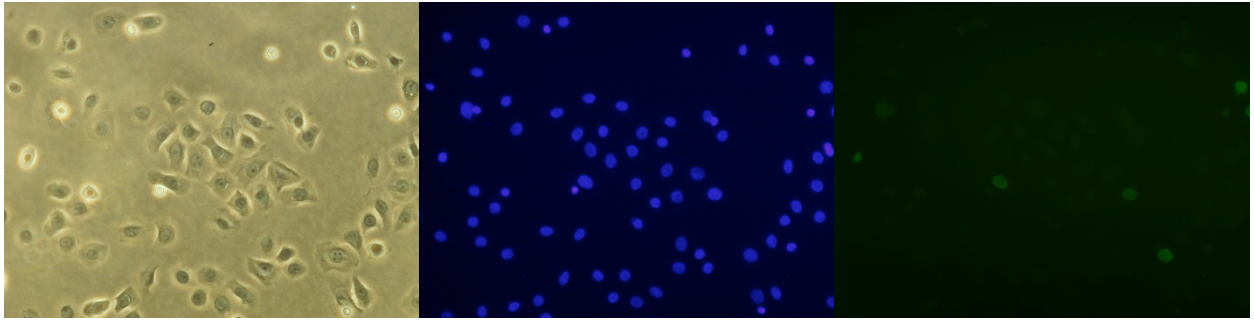
**Per realitzar la caracterització:**

Anticossos primaris: Anticòs *Rabbit*  $\alpha$  citoqueratines, *Mouse*  $\alpha$  vimentina.

Anticossos secundaris: *Goat*  $\alpha$  *Rat* 488 i *Donkey*  $\alpha$  *Mouse* 594. També afegirem Hoescht 1/2000 per tenyir els nuclis.

**Resultats**

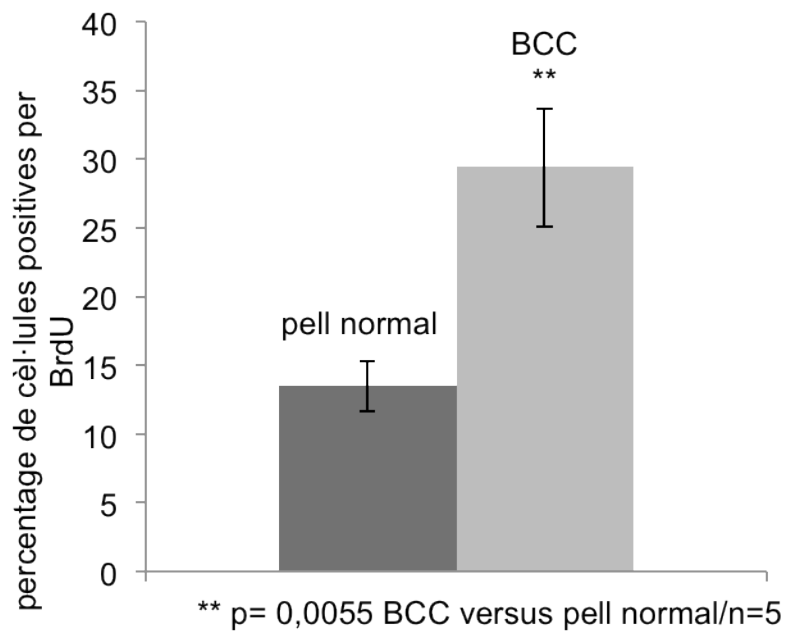
Únicament vàrem observar la presència de cèl·lules similars a queratinòcits a les plaques amb medi DKSFM i suplementes de creixement (figura 1), encara que no vam aconseguir una línia cel·lular ja que als pocs dies queratinitzaven i morien. A les plaques on hi havia DMEM, les cèl·lules fracassaven resultant inviàbles i en el medi DKSFM enriquit amb sèrum fetal boví obteníem cèl·lules polaritzades amb aspecte de fibroblasts.



**Figura 1:** Cultiu d'epidermis de CBC en medi DKSFM i suplementes de creixement. A l'esquerra, imatge de cèl·lules amb morfologia de queratinòcits. Al centre, marcatge dels nuclis amb Hoescht. A la dreta, marcatge de les cèl·lules amb BrdU (x4000)

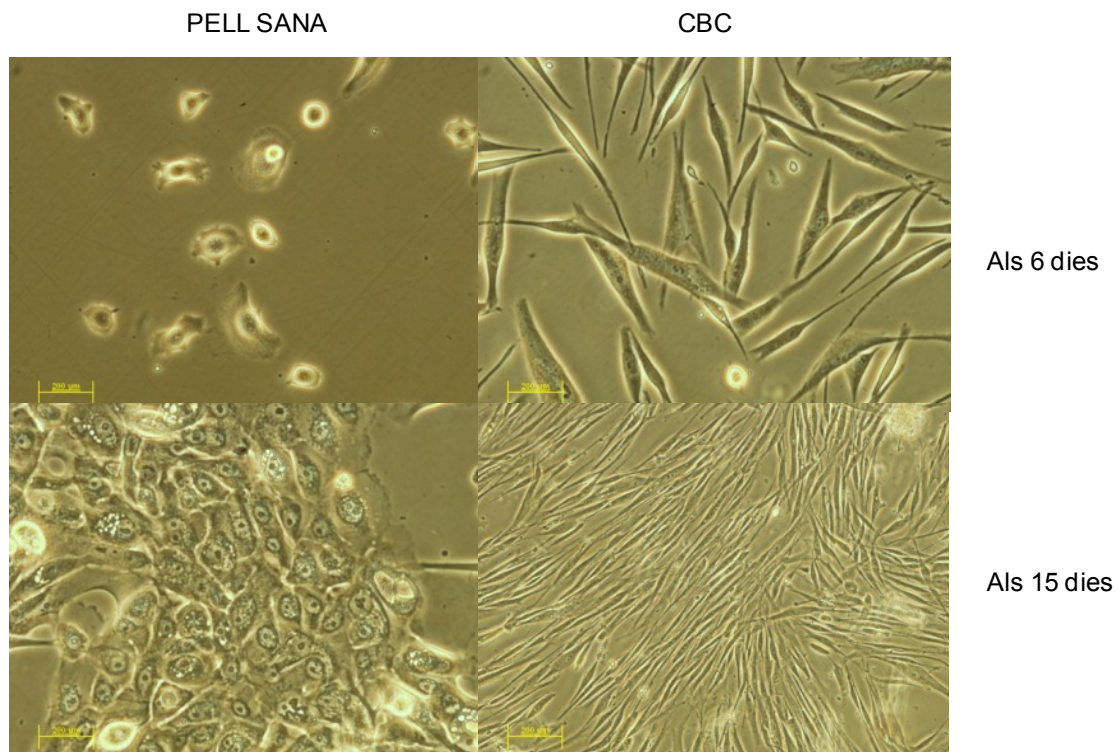
Malgrat el poc temps de manteniment de les cèl·lules abans de la seva mort, vam aprofitar els primers dies de cultiu per avaluar la proliferació tumoral respecte els controls de pell sana. Així, vam mesurar la incorporació nuclear de BrdU a les 24 i a les 48 hores posteriors a la plantada de les cèl·lules (figura 1). El BrdU és un nucleòtid anàleg de la timidina que s'incorpora a l'ADN durant la mitosi cel·lular. D'aquesta manera vam observar que hi havia una major proliferació de les cèl·lules tumorals (que era del 29.44%) (figura 2) respecte els queratinòcits de pell sense patologia (13.48%) de forma estadísticament significativa.





**Figura 2:** Diferències en la proliferació de cèl·lules tumorals respecte pell sana

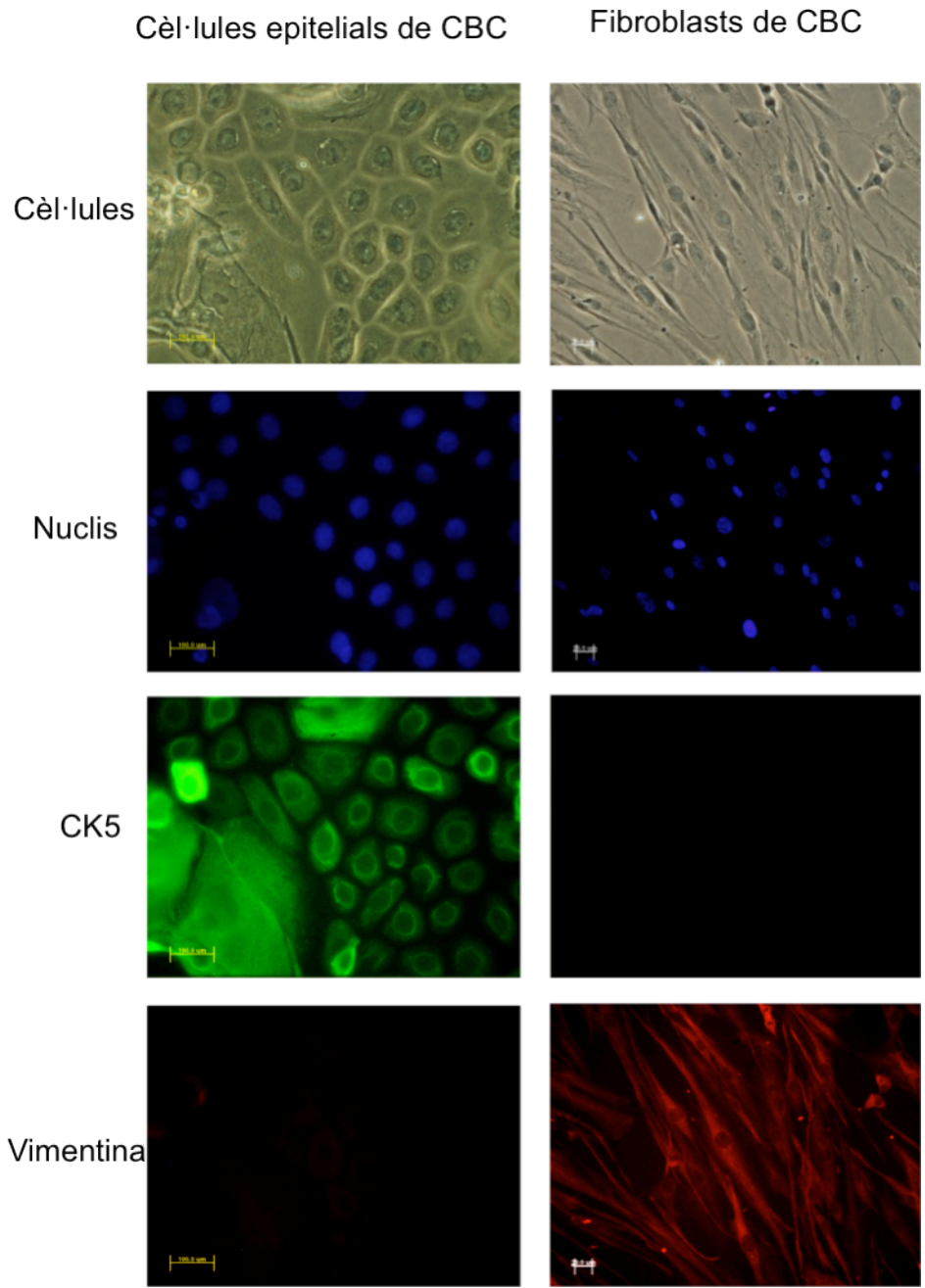
Com hem comentat anteriorment, als experiments amb medi DKSFM i sèrum fetal boví, apareixien cèl·lules allargades, que es podien mantenir viables fàcilment després de diversos passatges (figura 3).



**Figura 3:** Comparativa de cèl·lules obtingudes en medi KSFM amb sèrum a les mostres de pell sana (queratinòcits) i de CBC (X 400 les dues imatges superiors i X 200 les dues inferiors). La barra groga equival a 200 micres.

Per intentar discernir de quin tipus cel·lular es tractava, vàrem realitzar immunotinció per marcadors de queratinòcits (Ck - citoqueratina - 5) i fibroblasts (vimentina), tant en les cèl·lules queratinòcit-*like* observades al medi DKSFM com a les fibroblasts-*like* que creixien amb sèrum.

Els resultats van ser que les primeres marcaven per Ck 5 i resultaven negatives per vimentina, dades que esperem trobar a les cèl·lules epitelials tumorals, confirmant estudis previs<sup>5</sup> (figura 4). El fet contrari succeeix a les segones, indicant que es tracten de fibroblasts (figura 4).



**Figura 4:** Immunofluorescència de les cèl·lules cultivades en dos medis diferents, que ens permet discernir entre cèl·lules d'estirp epitelial i fibroblasts.

## Discussió

En aquest treball hem intentat posar a punt un mètode de cultiu de cèl·lules tumorals de CBC. De forma insatisfactòria, i coincidint amb la coneguda dificultat d'aconseguir aquest objectiu per manca de protocols establerts en CBC humans (l'únic que hi ha publicat com a viable no ens ha funcionat a nosaltres), no hem aconseguit una tècnica que ens permeti l'obtenció i manteniment de cèl·lules tumorals a llarg termini. La ràpida queratinització i mort cel·lular impediè la consolidació d'una línia de CBC, aguantant les cèl·lules viables només durant uns pocs dies. No obstant això, els experiments realitzats durant les primeres hores de cultiu mostren que les cèl·lules tumorals tenen molta més replicació que els queratinòcits de pell sana (més del doble), malgrat que el CBC es considera un tumor de progressió lenta a causa de la seva poca agressivitat i no esperaríem una diferència tan gran.

Si afegíem sèrum fetal boví al medi utilitzat (veure mètodes), creixien unes cèl·lules que mostraven un aspecte allargat, fusiforme, amb tendència a polaritzar-se. Aquestes, podrien correspondre's amb cèl·lules basaloides tumorals que han adquirit aquest fenotip en cultiu, ja que al treball de Grandó *et al*<sup>5</sup>. ens mostren com a resultat unes cèl·lules similars. Però el fet de tenir morfologia de cèl·lules mesenquimals i les característiques del medi de cultiu, molt similars al medi utilitzat per fibroblasts, ens fan sospitar que les cèl·lules es tracten de fibroblasts. La negativitat de la immunotinció per citoqueratina 5, la presència de la qual es considera característica del CBC<sup>6</sup>, ens confirma que no estem davant del mateix tipus cel·lular crescut al medi sense sèrum i que considerem com a tumoral.

Una altra hipòtesi seria que les cèl·lules similars a fibroblasts siguin cèl·lules de transició epiteli-mesènquima, les quals inicialment serien basaloides però modificant el fenotip mitjançant l'expressió d'una sèrie de marcadors (com podria ser la vimentina) i la pèrdua d'uns altres (determinades citoqueratines) esdevinguessin una població cel·lular diferent. Encara no està establerta la importància de la transició epiteli-mesènquima al CBC, però sí resulta fonamental a altres neoplàsies cutànies (com el carcinoma escatós i el melanoma) i en molts tipus de carcinomes epitelials extracutanis, jugant un paper important en el manteniment i la invasió tumoral. Això ens faria reflexionar que també podria ser un factor destacat en l'esdevenir del CBC.

## **Bibliografia**

1. Flaxman B A, Van Scott E J. Keratinization in vitro of cells from a basal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1968; 40: 411–422.
2. So PL, Langston AW, Daniallinia N, Hebert JL, Fujimoto MA, Khaimskiy Y, Aszterbaum M, Epstein EH Jr. Long-term establishment, characterization and manipulation of cell lines from mouse basal cell carcinoma tumors. *Exp Dermatol*. 2006;15:742-50.
3. Flaxman B A. Growth in vitro and induction of differentiation in cells of basal cell cancer. *Cancer Res* 1972; 32: 462–469.
4. Chiang LC, Chiang W, Yu HS, Sheu HM, Chen HY. Establishment and characterization of a continuous human basal cell carcinoma cell line from facial skin (I) cytological behavior of early passages. *Gaoxiong Yi Xue Ke Xue Za Zhi*. 1994;10:170-6.
5. Grando SA, Schofield OM, Skubitz AP, Kist DA, Zelickson BD, Zachary CB. Nodular basal cell carcinoma in vivo vs in vitro. Establishment of pure cell cultures, cytomorphologic characteristics, ultrastructure, immunophenotype, biosynthetic activities, and generation of antisera. *Arch Dermatol*. 1996;132:1185-93.

6. Alessi E, Venegoni L, Fanoni D, Berti E. Cytokeratin profile in basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol.* 2008;30:249-55.

## **APARTAT 2**



## **Expressió de $\beta$ -catenina i Ciclina D1 en carcinomes basocel·lulars independents de Gli1**

### **Introducció**

El carcinoma basocel·lular (CBC) és el càncer cutani més comú i la neoplàsia més freqüent en població caucàsica<sup>1</sup>, i la seva incidència encara està incrementant de forma constant<sup>2</sup>. Encara que el seu creixement és lent, pot arribar a ser localment molt destructiu<sup>3</sup>. La principal causa que intervé en la formació del CBC és l'exposició a la radiació ultraviolada, però hi ha altres factors de risc associats, com el sexe masculí, l'edat avançada, el nombre de cremades solars de segon grau patides al llarg de la vida<sup>1,4</sup>, les radiacions ionitzants i la ingesta d'arsènic<sup>5</sup>.

Mitjançant l'anàlisi de les alteracions moleculars del CBC en pacients amb la síndrome de Gorlin, sembla clar que les mutacions que constitueixen una activació constitutiva de la via Sonic hedgehog (Shh) són les responsables del desenvolupament d'aquest càncer. Intentant extrapolar aquesta fisiopatologia als casos de CBC esporàdics, els estudis genètics realitzats relacionen l'alteració de Shh amb l'etiologia d'entre un 50% i un 70% dels tumors. La via Shh regula el creixement cel·lular, la diferenciació i la formació d'òrgans durant el desenvolupament embrionari, i durant la vida adulta, s'encarrega de mantenir el pool d'*stem cells*<sup>6-8</sup>. També coopera amb el factor de creixement epidèrmic (EGF per les seves sigles en anglès) en la regulació de la diferenciació

epidèrmica i la selecció de llinatge<sup>9</sup>. A més del CBC, la manca de regulació de la via Shh també està implicada en la formació del medul·loblastoma, el glioma i el rhabdomiosarcoma<sup>10-12</sup>.

PTCH, una proteïna amb 12 passos transmembrana, és el receptor de la proteïna de senyal Sonic Hedgehog. PTCH té un efecte inhibitori sobre Smoothed (SMO), que també té 7 passos transmembrana. Així doncs, la funció de PTCH és reprimir constitutivament SMO. La interacció de Sonic hedgehog amb PTCH allibera aquest efecte inhibitori sobre SMO i com a resultat s'activa la família de proteïnes Gli (hi ha tres proteïnes Gli humanes, que són factors de transcripció)<sup>6,12</sup>. L'activació de SMO allibera Gli1 del seu segrest citoplasmàtic, i una vegada al nucli, Gli1 activa la seva expressió en un bucle de *feed back* positiu<sup>13</sup>. Per tant, d'aquí es pot deduir que a causa de la hiperactivació de la via Shh, l'expressió de Gli1 està suprarregulada al CBC<sup>14</sup>. D'altra banda, per reforçar aquesta hipòtesi, s'ha demostrat que l'excés d'expressió de Gli1 a l'epidermis de ratolins transgènics pot provocar el desenvolupament de CBCs<sup>15</sup>.

Dos dels diferents objectius de Gli1 són la regulació de  $\beta$ -catenina i Ciclina D1<sup>16</sup>.  $\beta$ -catenina sembla jugar un paper important en la formació del CBC, tal com s'ha demostrat experimentalment en models murins<sup>17</sup>. A l'epiteli,  $\beta$ -catenina està associada a la membrana citoplasmàtica interactuant amb E-cadherina. L'alliberament de  $\beta$ -catenina i posterior acumulació al nucli és un pas clau per la transformació neoplàsica de l'epiteli<sup>18,19</sup>. S'ha suggerit que l'activació de  $\beta$ -catenina per part de Gli1 s'aconsegueix a través de diferents

vies<sup>17, 20-22</sup>. La migració de  $\beta$ -catenina al nucli i la seva interacció amb el complex proteic Lef1/Tcf promou la transcripció de diversos gens com, per exemple, Ciclina D1<sup>23</sup>. A més, Gli1 per sí sol també pot induir l'expressió de Ciclina D1<sup>16</sup>.

D'acord amb aquestes dades, diferents autors han estudiat els nivells de  $\beta$ -catenina i Ciclina D1 als CBCs i proposen que uns nivells elevats d'aquestes dues proteïnes s'associen amb altes taxes de proliferació i major agressivitat dels tumors<sup>24-26</sup>.

En aquest treball hem determinat l'activació i l'expressió de  $\beta$ -catenina i Ciclina D1 en mostres de CBC esporàdic. Hem observat que diverses mostres no expressaven Gli1 però presentaven activació de  $\beta$ -catenina, Ciclina D1 i elevades taxes de proliferació. Per això, proposem la presència d'alteracions diferents a aquelles que afecten a la via Shh, capaces de promoure l'expressió de  $\beta$ -catenina i Ciclina D1 durant la formació del CBC.

### **Material i mètodes**

#### Pacients i preparació de les mostres

Les mostres de CBC van ser obtingudes de 18 pacients afectats d'aquest tumor que van acudir de forma consecutiva a la sala d'operacions del servei de dermatologia de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida per la seva exèresi (amb la pertinent aprovació de l'estudi per part del comitè ètic de l'hospital). Aquests pacients van ser triats de forma aleatòria, sense

discriminació de sexe, edat, subtipus o localització del tumor (taula 1). Les mostres de pell sana, utilitzades com a control, van ser extrems de pacients sense aquesta patologia que els mateixos dies van ser intervinguts per altres causes (exèresi de nevus o d'altres lesions tumorals), fent servir els marges sans de les peces o la pell restant de fer penjalls o empelts. Per preparar la mostra, es va realitzar una biòpsia de la massa tumoral en forma de punx de 4 mil·límetres, just després de l'exèresi quirúrgica, i es va congelar en nitrogen líquid (el mateix procediment val per les mostres de pell sana). La resta de la peça quirúrgica va ser fixada amb formol per tal de realitzar l'anàlisi immunohistoquímic i la tinció amb hematoxilina – eosina per confirmar el diagnòstic.

### Immunohistoquímica

Els blocs de parafina van ser tallats amb un gruix de 3  $\mu\text{m}$  i assecats durant 1 hora a 65°C abans de realitzar el pre-tractament de desparafinització, rehidratació i recuperació d'epítops. Aquest es realitzà al Mòdul de Pre-tractament PT-LINK (DAKO) a 95°C durant 20 minuts en buffer 50x Tris/EDTA a pH de 9. Abans de la tinció dels talls, la peroxidasa endògena va ser bloquejada. Els anticossos usats foren: Gli1 (*rabbit polyclonal*, Santa Cruz),  $\beta$ -Catenina (*mouse monoclonal*, DAKO), ki67 (MIB1 *mouse monoclonal*, DAKO), i Ciclina D1 (*rabbit monoclonal*, DAKO). Després de la incubació, la reacció va ser visualitzada amb l'EnVision FLEX Detection Kit (Dako, Glostrup, Denmark), fent servir com a substrat el cromogen diaminobenzidina. Controls positius i negatius van ser també testats. Es va obtenir una puntuació histològica

(*histoscore*) de cada mostra, amb un rang de 0 (sense immunoreactivitat) fins a 300 (màxima immunoreactivitat), segons l'aplicació de la següent fórmula:  
 $histoscore = 1x \text{ (tinció lleugera)} + 2x \text{ (tinció moderada)} + 3x \text{ (tinció forta)}$ .

El percentatge d'immunotinció de Ki67 va ser quantificat mitjançant l'ús d'un software: *automated cellular imaging system* (DAKO). El percentatge de cada mostra resulta del càlcul de la mitja de sis regions diferents. Per comparar els nivells de proliferació de  $\beta$ -catenina i Gli1 en mostres tant positives com negatives, es van agrupar cada cohort i es va obtenir una mitja i un interval de confiança ( $p < 0.01$ ).

### Immunoblot

Per obtenir l'extracte de proteïnes, es va tallar la part apical de la peça extreta mitjançant el punx (epidermis + dermis), rebutjant la resta (hipodermis). La mostra es va afegir a 70  $\mu$ l de *lysis buffer* (urea 1M, SDS 1%, 100mM de Tris-HCl pH 6.8) juntament amb una cullerada de *glass beads* (425-600 micres, Sigma). La barreja va ser escalfada a 95°C durant 2 minuts. Després, es va disgregar amb el sistema FastPrep FP120 (BIO101) durant 60 segons, dues vegades, a força 5. Un cop recuperat l'extret s'afegeix 2x Laemmli buffer. Per comprovar que l'extret resultant és vàlid, es va avaluar la quantitat de proteïna de cada mostra mesurant els nivells d'actina. Només 5 mostres de 27 van mostrar nivells baixos. Les mostres de proteïna es van posar en SDS-PAGE, transferir a membranes PVDF (Millipore) i analitzar per immunoblot. Els anticossos secundaris corresponents es van detectar fent servir substrat

quimioluminiscent HRP Immobilion Western (Millipore). La quimioluminiscència va ser captada amb l'ajuda de la càmera CCD (Lumimager, Roche).

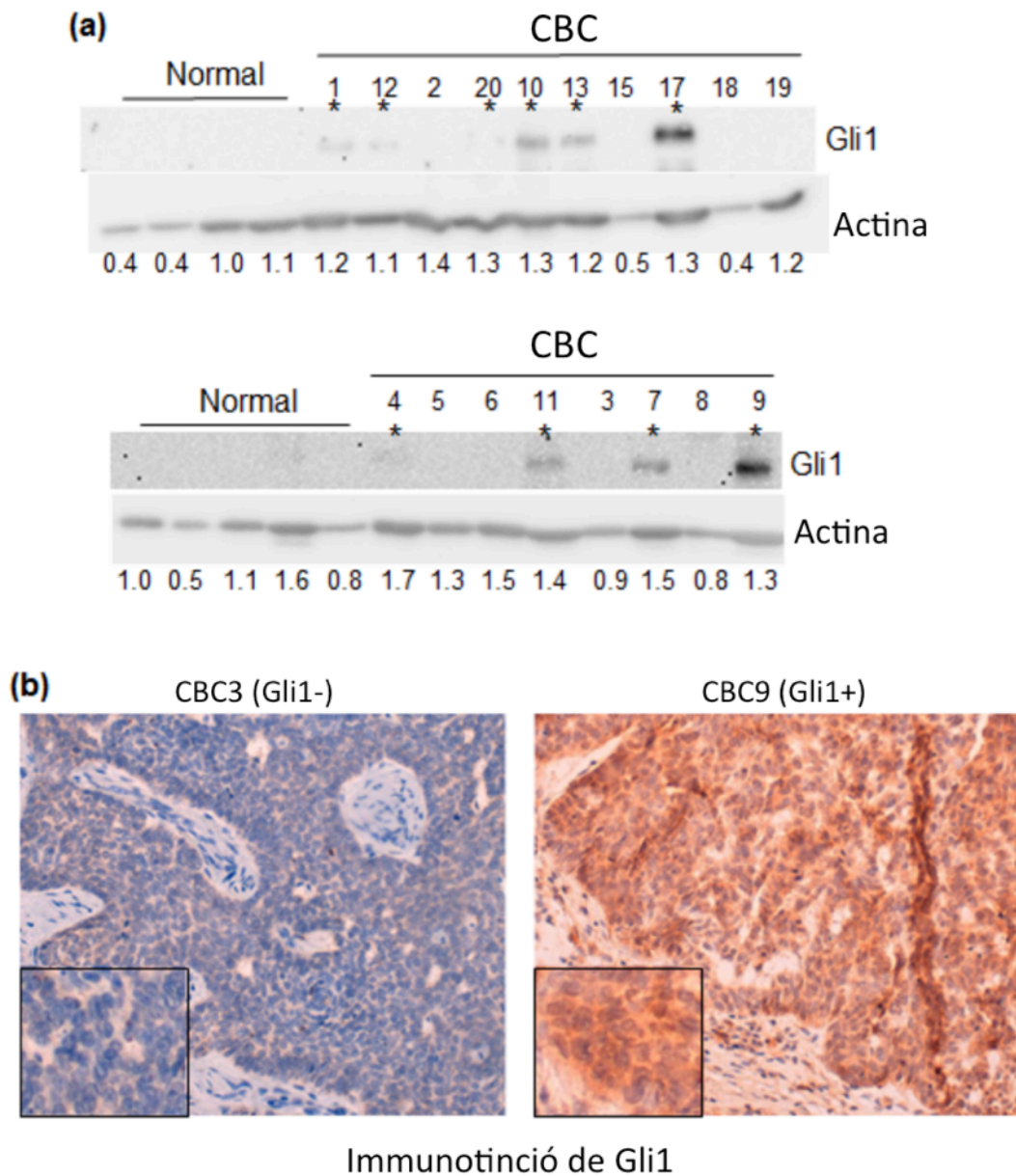
La quantificació de les bandes es va realitzar amb el software d'anàlisi de gels del Lumimager. Els resultats van ser expressats com a valors relatius. Els anticossos primaris foren: Gli1 (*rabbit polyclonal*, Cell Signaling), Actina (*monoclonal clone C4*, Millipore),  $\beta$ -Catenina (*monoclonal clone 14*, BD), i Phospho-RB (Ser-608) (*rabbit polyclonal*, Cell Signaling).

## Resultats

### Acumulació de Gli1 en CBCs esporàdics

L'activació de la via Shh en aquests CBCs s'evidencia per l'acumulació de la proteïna Gli1<sup>13</sup>. Per tant, amb la finalitat d'establir quines mostres de CBC mostraven activació de la via Shh, vàrem analitzar els nivells de Gli1. Amb aquest objectiu, vam obtenir un extret total de proteïnes a partir de biòpsies tumorals (punx de 4 mm) i vam determinar els nivells de Gli1 i actina per immunoblot. Vàrem observar acumulació de Gli1 a deu (55%) de les divuit mostres, i com esperàvem, les mostres de pell sana no presentaven expressió (figura 1a). Els diversos resultats obtinguts van ser corroborats fent servir anàlisis immunohistoquímics prèviament descrits per Ghali *et al*<sup>27</sup>. Així, per exemple, la immunotinció de Gli1 mostrava una senyal positiva mixta a citoplasma i nucli a la mostra 9, mentre que no s'observava senyal a la mostra 3 (figura 1b). No es van observar diferències significatives en el percentatge de

Ki67 entre les mostres que acumulaven Gli1 (mitja de 52.9% $\pm$ 5.9) i aquelles que no n'acumulaven (mitja de 54.7% $\pm$ 7.5) (figura 3b). Per això, aquestes dades indiquen que, a part de l'activació de Shh i Gli1, hi ha vies alternatives que desencadenen la proliferació del CBC esporàdic.



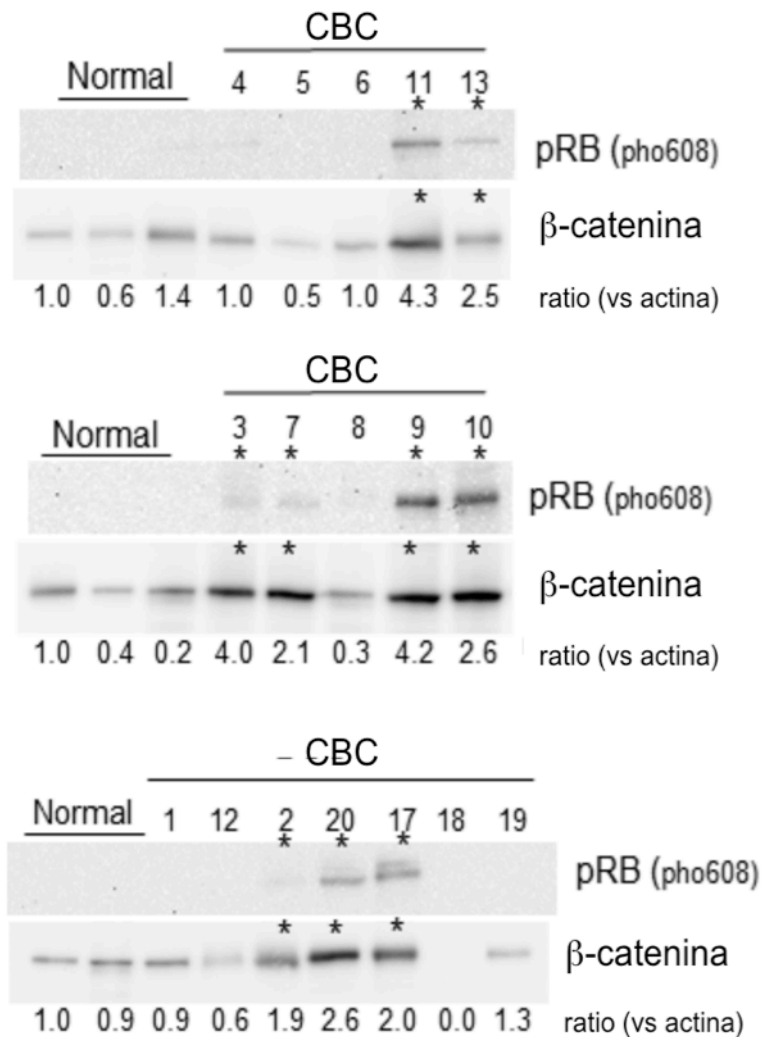
**Figura 1:** Expressió de Gli1 en CBC esporàdic. (a) Anàlisi per immunoblot d'extrets proteics de biòpsia, per tal de detectar acumulació de Gli1. Els números sota els panells representen la quantificació d'actina utilitzada com a control de càrrega. Els asteriscs indiquen les mostres positives per Gli1. (b) Els CBCs fixats amb formaldehid van ser inclosos en parafina i processats per immunotinció de Gli1. La cantonada esquerra inferior mostra una regió amplificada. Imatge amplificada 200x.



### Acumulació de $\beta$ -catenina a mostres de CBC esporàdic

L'acumulació de Gli1 comporta l'expressió de la via Wnt, que indueix l'estabilització de la  $\beta$ -catenina a citoplasma i la seva migració al nucli<sup>14,20,25,28,29</sup>. Això suggereix que l'activació de  $\beta$ -catenina per part de la senyal Shh és requerida en la carcinogènesi del CBC, demostrant-se aquesta teoria en treballs amb ratolí<sup>17</sup>. Segons aquesta hipòtesi, es podria pensar que les mostres amb poca o nul·la expressió de Gli1 no tenen activació de  $\beta$ -catenina. Per comprovar-ho, vam comparar el grau d'activació de  $\beta$ -catenina entre les nostres mostres de CBC. Per això vàrem analitzar quantitativament l'activació de  $\beta$ -catenina per immunoblot, mesurant la seva quantitat respecte actina, feta servir com a control de càrrega. L'acumulació de  $\beta$ -catenina es va detectar en nou (53%) de les disset mostres, però dues d'aquestes (2 i 3) eren Gli1 negatives, suggerint que  $\beta$ -catenina es pot acumular en absència d'activació de la via Shh (figura 2). De forma alternativa, tres mostres Gli1 positives (malgrat que amb nivells certament baixos) com són 1,4 i 12, no mostraven acumulació de  $\beta$ -catenina.

D'acord amb altres treballs publicats, mostres amb acumulació de  $\beta$ -catenina, com 3 i 9, ens ensenyaven una reducció de tinció d'aquesta a la membrana i un increment de la senyal a citoplasma i nucli, sobretot al centre de la massa tumoral<sup>24,25,28</sup> (figura 3a i altres dades no es mostren).



**Figura 2:** Proliferació i acumulació de  $\beta$ -catenina a CBC esporàdic. Els extrems proteics de les biòpsies es van sotmetre a immunoblot per detectar acumulació de fosfo-pRB ser-608 i  $\beta$ -catenina. Els asteriscs indiquen les mostres amb nivells elevats d'ambdues. Els números de sota els panells indiquen la proporció de  $\beta$ -catenina respecte actina.

L'activació de  $\beta$ -catenina es relaciona amb l'increment de proliferació del CBC, comprovat per la immunotinció de Ki67<sup>25</sup>. Nosaltres també hem obtingut diferències significatives comparant els percentatges de Ki67 entre mostres que acumulen  $\beta$ -catenina (mitja de 57.9% $\pm$ 5.7) i mostres que no n'acumulen (mitja

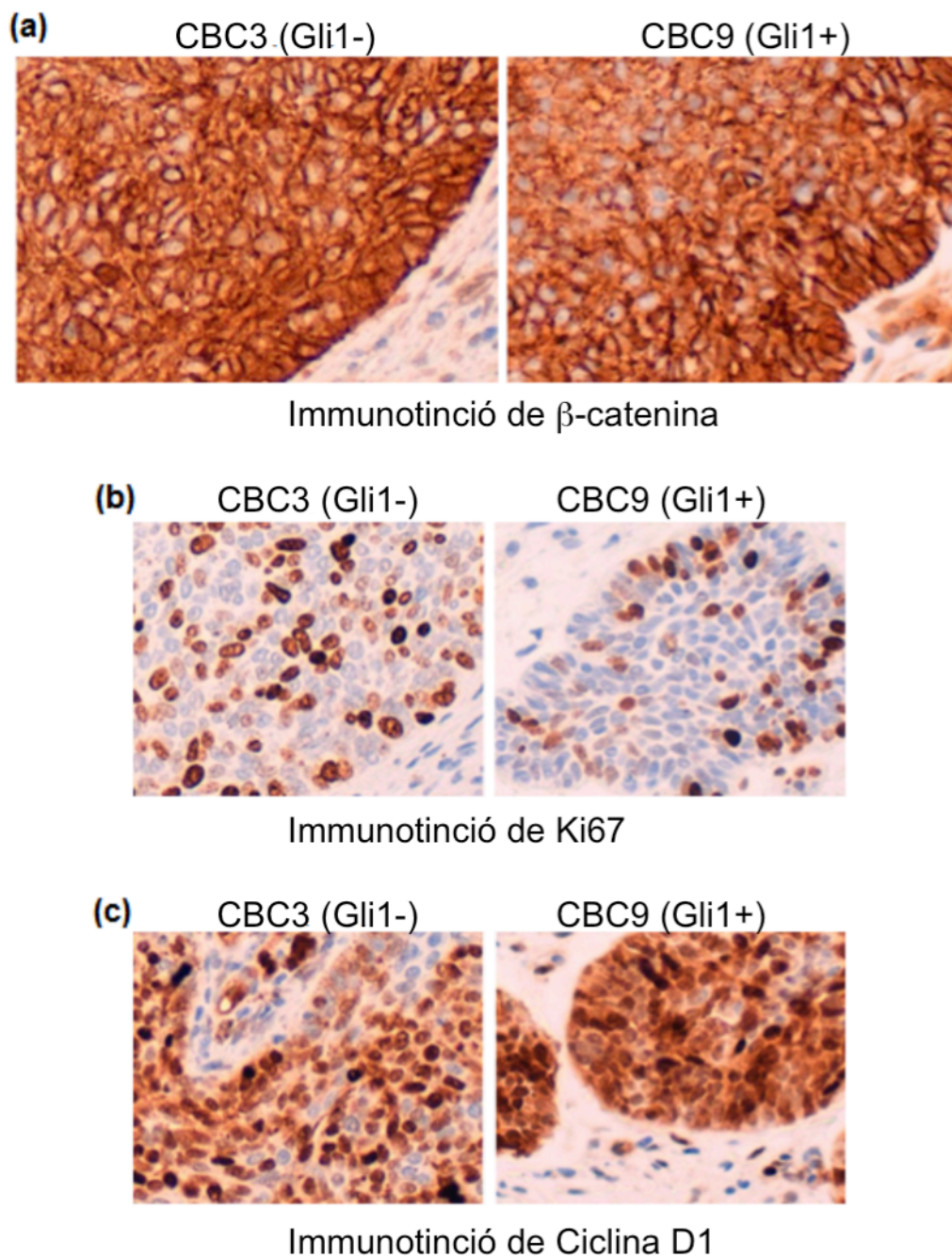
de 48% $\pm$ 3.2) ( $\alpha < 0.01$ ). Per mesurar la proliferació de les nostres mostres per immunoblot, hem determinat l'acumulació de pRB fosforilat a serina-608, que és induït per l'activitat Ciclina E-Cdk2 i Ciclina D1-Cdk4, indicant el pas de la cèl·lula a un nou cicle de divisió cel·lular. Com es pot observar a la figura 2, la proliferació detectada com a acumulació de pRB fosforilat coincidí amb mostres que també tenien increment de  $\beta$ -catenina, reafirmant les dades ja publicades. Aquests resultats confirmen que la supraregulació de  $\beta$ -catenina s'associa amb elevades taxes de proliferació tumoral<sup>25</sup>.

### Expressió de Ciclina D1 en mostres de CBC esporàdic

Com que Ciclina D1 està sobre-expressada en nombroses neoplàsies i es considera un objectiu de la regulació de Gli1 i  $\beta$ -catenina, vam dur a terme l'anàlisi de l'expressió de Ciclina D1 a les nostres mostres. Desafortunadament, no es va poder realitzar una anàlisi paral·lela amb immunoblot per problemes amb la sensibilitat dels anticossos sobre els extrems proteics. Per aquesta raó, vam fer l'anàlisi amb immunohistoquímica i quantificació mitjançant un mètode d'*histoscore* (veure mètodes) (figura 3c, taula 1). Els resultats ens ensenyaven que el 80% de mostres Gli1 positives tenien un *score* elevat de Ciclina D1 i en només una mostra (la número 12) s'objectivava nivells baixos. Malgrat això, de les mostres Gli1 negatives, cinc (62%) contaven amb nivells elevats de Ciclina D1, i d'aquestes, tres no presentaven acumulació de  $\beta$ -catenina (5, 6 i 8) (taula 1). Els resultats obtinguts confirmen que la sobre-regulació de Ciclina D1 és

rellevant en la formació del CBC<sup>26</sup> i suggereix que la seva expressió pot ser controlada independentment de Gli1 i  $\beta$ -catenina.

**Figura 3:** Anàlisi immunohistoquímic de  $\beta$ -catenina (a), Ki67 (b) i Ciclina D1 (c). Imatge amplificada 200x.



## Discussió

La majoria de treballs genètics indiquen clarament que una gran part de CBCs esporàdics estan associats a mutacions de gens que controlen l'activació de la via Shh<sup>30,31</sup>. Fent servir dues tècniques diferents, immunohistoquímica i immunoblot, en el present treball demostrem que també existeix una fracció de CBC esporàdics que semblen independents de l'activació constitutiva de la via Shh (visualitzat com a acumulació de Gli1). Així, proposem un escenari en el qual diferents vies de senyalització indueixen dianes comuns, com  $\beta$ -catenina o Ciclina D1, que caracteritzen molecularment als CBCs<sup>17,24-26,32</sup>. D'acord amb aquesta idea, els nostres experiments mostren que l'acumulació de  $\beta$ -catenina i Ciclina D1 poden ser desencadenades en absència d'acumulació de Gli1 en determinats CBCs esporàdics. Les nostres dades també ens ensenyen que la presència o l'absència de Gli1 no sembla relacionar-se ni amb el tipus clínic de CBC ni amb la freqüència d'aparició en els pacients (taula 1).

Aquest treball confirma publicacions prèvies que proposen que l'activació de  $\beta$ -catenina pot ser la característica comuna entre els CBCs esporàdics, i que aquesta es correlaciona amb la proliferació tumoral<sup>24,25,28,29</sup>. A través de diferents enfocaments, els nostres resultats aporten noves evidències que assenyalen que  $\beta$ -catenina pot marcar quins CBCs són altament proliferatius (com veiem en les mostres on detectem fosfo-pRB concomitant amb acumulació de  $\beta$ -catenina). Encara que tant pRB com Ki67 són bons marcadors de proliferació, fosfo-pRB marca la transició G1/S, cosa que no fa Ki67<sup>33</sup>.

Les cèl·lules proliferatives amb cycle més lent o nivells baixos de transició G1/S poden presentar alts nivells de Ki67 però baixos de fosforilació de pRB<sup>34</sup>. El nostre treball suggereix que l'acumulació de  $\beta$ -catenina en CBCs es relaciona amb cycle cel·lular ràpid i, per aquest a raó, les mostres sense acumulació de  $\beta$ -catenina exhibien nivells baixos de fosforilació de pRB que foren indetectables als nostres extrems crus.

Amb els resultats obtinguts al nostre estudi ens surgeix una pregunta: quina és l'alteració que condueix a l'activació de  $\beta$ -catenina i l'expressió de Ciclina D1 en absència de l'estímul de Gli1?. Hi ha diverses explicacions a aquest fet. Aquestes són la presència de mutacions a la pròpia  $\beta$ -catenina (en les seqüències de reconeixement per part de GSK3 $\beta$ ), o alteracions que impliquin la pèrdua de funció a APC o GSK3 $\beta$ , ja descrites a diferents neoplàsies com les de còlon, fetge, pròstata, ovari i endometri<sup>23</sup>. Alguns treballs, però, suggereixen que mutacions a  $\beta$ -catenina o APC no conegudes fins avui serien les responsables d'aquests casos<sup>23,25</sup>, defensant així també l'alteració de la via Wnt com a responsable de la formació dels CBCs independents de Gli1.

Alternativament, altres esdeveniments podrien ser els responsables d'aquesta activació. La dissociació de la membrana i l'acumulació nuclear de  $\beta$ -catenina pot ser estimulada a través d'altres mecanismes que promoguin la seva fosforilació a les tirosines 142 i 654<sup>34,36</sup>.

L'expressió de Ciclina D1 durant la formació del CBC també podria ser induïda per  $\beta$ -catenina en absència de Gli1. Malgrat això, hem trobat moltes mostres

que tenen expressió elevada de Ciclina D1 i manca d'acumulació de  $\beta$ -catenina i Gli1, indicant que existeixen explicacions alternatives. D'acord amb aquesta afirmació, val a dir que s'ha trobat el polimorfisme G870A a Ciclina D1 d'alguns CBCs, i aquest provoca l'estabilització i acumulació de la proteïna<sup>31,37</sup>. Això podria entrar aparentment en contradicció amb les mostres 4,5 i 8, on veiem elevada expressió de Ciclina D1 sense l'acumulació detectable de pRB fosforilat (associació que seria d'esperar) (figura 2 i taula 1), però és ben conegut que en molts tipus de neoplàsies, la supraregulació de Ciclina D1 no es correlaciona amb l'hiperfosforilació de pRB<sup>34,38</sup>, sinó que pot actuar en vies independents de Cdk i fosfo-pRB per regular la proliferació i la migració cel·lular<sup>39,40</sup>. Així, podem insinuar que existeixen diferents mecanismes d'acció de Ciclina D1 que conduirien a la formació del CBC.

## Apartat 2: $\beta$ -catenina i Ciclina D1 en CBCs

**Taula 1** Dades de Gli1,  $\beta$ -catenina i Ciclina D1 de les mostres de CBC esporàdic

Mostra	Subtipus clínic	Edat/ Sexe <sup>a</sup>	Localització	Freqüència	Gli1	$\beta$ -catenina P-score <sup>d</sup>	pRB	Ciclina D1 H-score <sup>e</sup>
BCC1	morfeiforme	81/d	cella	descone- guda	+	0.9	-	90
BCC2	superficial	74/h	galta	múltiple	-	1.9	+	90
BCC3	mixt <sup>f</sup>	76/h	pre- auricular	3r	-	4.0	+	200
BCC4	micronodular	51/h	nas	1r	+	1.0	-/+	160
BCC5	nodular	100/h	orella	3r	-	0.5	-	200
BCC6	mixt	75/h	galta	múltiple	-	1.0	-	250
BCC7	nodular pigmentat	77/d	galta	1r	++	2.1	+	170
BCC8	micronodular	79/h	templa	1r	-	0.3	-	210
BCC9	nodular pigmentat	75/h	galta	1r	+++	4.2	++	170
BCC10	mixt	69/h	abdomen	1r	++	2.6	++	160
BCC11	nodular	78/h	cama	múltiple	++	4.3	++	150
BCC12	morfeiforme	74/h	nas	1r	+	0.6	-	10
BCC13	nodular	79/d	front	1r	++	2.5	+	270
BCC15	micronodular	76/h	front	1r	-	nd <sup>c</sup>	nd	230
BCC17	nodular	81/h	pre- auricular	1r	+++	2.0	++	180
BCC18	nodular	67/d	nas	1r	-	-	-	30
BCC19	micronodular	63/h	cuir cabellut	1r	-	1.3	-	40
BCC20	superficial	85/d	esquena	1r	+ <sup>b</sup>	2.6	++	250

(a) Edat en anys /d=dona i h=home

(b) La banda Gli1 en aquesta mostra va ser feble a causa d'una bombolla. Les dades es va confirmar en un gel independent (no mostrat)

(c) no determinada

(d) L'score proteic determinat a la figura 2

(e) Score histològic 0-300 (veure mètodes)

(f) Mixt: combinació de dos patrons diferents al mateix tumor: nodular i micronodular.



## **Bibliografia**

1. Kyrgidis A, Tzellos TG, Vahtsevanos K, Triaridis S. New concepts for basal cell carcinoma. Demographic, clinical, histological risk factors, and biomarkers. A systematic review of evidence regarding risk for tumor development, susceptibility for second primary and recurrence. *J Surg Res* 2010;159:545-56.
2. Kiiski V, de Vries E, Flohil SC, et al: Risk factors for single and multiple basal cell carcinomas. *Arch Dermatol* 2010;146:848-855.
3. Wallberg P, Kaaman T, Lindberg M: Multiple basal cell carcinoma. A clinical evaluation of risk factors. *Acta Derm Venereol* 1998;78:127-129.
4. Tilli CM, Van Steensel MA, Krekels GA, Neumann HA, Ramaekers FC: Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2005;152:1108-1124.
5. Aszterbaum M, Epstein J, Oro A, et al. Ultraviolet and ionizing radiation enhance the growth of BCCs and trichoblastomas in patched heterozygous knockout mice. *Nat Med* 1999;5:1285-91.
6. Von Hoff DD, LoRusso PM, Rudin CM, et al. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2009;361:1164-72

7. Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM: Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 2004;432:324-331.
8. Liu S, Dontu G, Mantle ID, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res* 2006; 66:6063-71.
9. Palma V, Ruiz i Altaba A. Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development* 2004;131:337-45.
10. Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer* 2003;3:903-11
11. Wicking C, Smyth I, Bale A: The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene* 1999;18:7844-7851.
12. Daya-Grosjean L, Couvé-Privat S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett* 2005;225:181-92.
13. Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A. Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* 1997;389:876-881.

14. Bonifas JM, Pennypacker S, Chuang PT, et al. Activation of expression of hedgehog target genes in basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol* 2001;116:739-42.
15. Nilsson M, Undèn AB, Krause D, et al. Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3438-43.
16. Zhu H, Lo HW. The Human Glioma-Associated Oncogene Homolog 1 (GLI1) Family of Transcription Factors in Gene Regulation and Diseases. *Curr Genomics* 2010;11:238-45.
17. Yang SH, Andl T, Grachtchouk V, et al. Pathological responses to oncogenic Hedgehog signaling in skin are dependent on canonical Wnt/beta3-catenin signaling. *Nat Genet* 2008;40:1130-5.
18. Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 2004;18:2225-30.
19. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303:1483-7.

20. Liu ZL, Li Y, Kong QY, et al. Immunohistochemical profiling of Wnt, NF-kappaB, Stat3 and Notch signaling in human epidermal tumors. *J Dermatol Sci* 2008;52:133-6.
21. Katoh M, Katoh M. Transcriptional regulation of WNT2B based on the balance of Hedgehog, Notch, BMP and WNT signals. *Int J Oncol* 2009;34:1411-5.
22. Li X, Deng W, Lobo-Ruppert SM, Ruppert JM. Gli1 acts through Snail and E-cadherin to promote nuclear signaling by beta-catenin. *Oncogene* 2007;26:4489-98.
23. Doglioni C, Piccinin S, Demontis S, et al. Alterations of beta-catenin pathway in non-melanoma skin tumors: loss of alpha-ABC nuclear reactivity correlates with the presence of beta-catenin gene mutation. *Am J Pathol* 2003;163:2277-87.
24. Yamazaki F, Aragane Y, Kawada A, Tezuka T. Immunohistochemical detection for nuclear beta-catenin in sporadic basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2001;145:771-7.
25. Saldanha G, Ghura V, Potter L, Fletcher A. Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. *Br J Dermatol* 2004;151:157-64.

26. Staibano S, Lo Muzio L, Pannone G, et al. DNA ploidy and cyclin D1 expression in basal cell carcinoma of the head and neck. *Am J Clin Pathol* 2001;115:805-13.
27. Ghali L, Wong ST, Green J, Tidman N, Quinn AG. Gli1 protein is expressed in basal cell carcinomas, outer root sheath keratinocytes and a subpopulation of mesenchymal cells in normal human skin. *J Invest Dermatol* 1999;113:595-9.
28. El-Bahrawy M, El-Masry N, Alison M, Poulsom R, Fallowfield M. Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2003;148:964-70.
29. Oh ST, Kim HS, Yoo NJ, Lee WS, Cho BK, Reichrath J. Increased immunoreactivity of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and  $\beta$ -catenin in high-risk basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2011;165:1197-204.
30. Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 2005;152:43-51.
31. Zhang H, Ping XL, Lee PK, et al. Role of PTCH and p53 genes in early-onset basal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2001;158:381-5.

32. Liang SB, Furihata M, Takeuchi T, et al. Overexpression of cyclin D1 in nonmelanocytic skin cancer. *Virchows Arch* 2000;436:370-6.
33. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:7212-20.
34. Nielsen NH, Emdin SO, Cajander J, Landberg G. Deregulation of cyclin E and D1 in breast cancer is associated with inactivation of the retinoblastoma protein. *Oncogene* 1997;14:295-304.
35. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.
36. David MD, Yeramian A, Duñach M, et al. Signalling by neurotrophins and hepatocyte growth factor regulates axon morphogenesis by differential beta-catenin phosphorylation. *J Cell Sci* 2008;121:2718-30.
37. Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. *Oncogene* 2006;25:1620-8.
38. Zukerberg LR, Yang WI, Gadd M, et al. Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. *Mod Pathol* 1995;8:560-7.

39. Ewen ME, Lamb J. The activities of cyclin D1 that drive tumorigenesis. Trends Mol Med 2004;10:158-62.

40. Velasco-Velázquez MA, Li Z, Casimiro M, Loro E, Homsí N, Pestell RG. Examining the role of cyclin D1 in breast cancer. Future Oncol 2011;7:753-65.

## **APARTAT 3**



## **Activació d'ERK1/2 a fibroblasts de l'estroma de carcinoma basocel·lular esporàdic.**

### **Introducció**

Les cinases ERK 1 i 2 (de l'anglès *extracellular signal-regulated kinases*) formen part del mòdul de transducció de senyal Ras/Raf/MEK/ERK i juguen un paper central a les xarxes de senyal que controlen múltiples respostes cel·lulars<sup>1</sup>. Ambdues cinases són idèntiques en un 84% de la seva seqüència i comparteixen múltiples (si no totes) de les seves funcions. ERK1/2 són activades per fosforilació i al seu torn, s'encarreguen de fosforilar un ample espectre de senyals implicats en la proliferació cel·lular, diferenciació, supervivència i mobilitat. El tipus de resposta cel·lular promoguda per ERK1/2 depèn de diferents circumstàncies; per exemple, una activació transitòria promou proliferació, mentre que una activació sostinguda indueix diferenciació<sup>2</sup>. A més, és important destacar que l'activació d'ERK1/2 també està implicada en la inducció de senescència i respostes apoptòtiques en cèl·lules primàries, el que reforçaria la existència d'una xarxa complexa de respostes que sorgeixen d'aquesta senyal<sup>3,4</sup>.

Una alteració en la regulació de la senyal que impliqui una activació constitutiva d'aquestes vies pot desencadenar el creixement cel·lular descontrolat, amb la corresponent transformació oncogènica i progressió tumoral<sup>5</sup>. Pel que fa al càncer cutani no melanoma, ERK1/2 es troba activat al carcinoma escatós, però no al carcinoma basocel·lular (CBC), com s'estudia als treballs de Rittié et al<sup>6</sup> i Neill et al<sup>7</sup>. Aquests, mostren que l'activitat ERK1/2 és predominantment

negativa a la massa tumoral dels CBC, encara que hi ha un cert grau heterogeni de senyal. De forma interessant, aquests autors també mencionen que en CBC, fosfoERK1/2 (pERK1/2) és present a l'epidermis adjacent.

Contràriament, s'ha suggerit que el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR) actua de forma sinèrgica amb GLI1 amb l'objectiu d'activar la senyal Ras/Raf/MEK/ERK1/2 per induir el creixement del CBC<sup>8</sup>. Com hem comentat anteriorment, l'acumulació del factor de transcripció GLI1 a través de l'activació de la via hedgehog (Hh) és una troballa freqüent al CBC<sup>9</sup>, considerant-se que un 50-70% dels casos de CBC esporàdic sorgeixen per alteracions d'aquesta senyal<sup>10</sup>. A més, a través de l'ús de models de ratolí, s'ha descrit que durant la formació del CBC, el PDGF $\alpha$  (activat per GLI1) indueix l'activació d'ERK1/2, sota condicions de senyal constant de la via Hh<sup>11</sup>. Per tant, aquestes dades són contradictòries amb el fet de que la senyal ERK a la massa tumoral sigui predominantment negativa, ja que esperaríem que tots aquests estímuls desencadenessin una activació d'aquesta.

Amb aquestes dades, hem trobat interessant profunditzar en l'estudi del paper d'ERK1/2 en la formació del CBC. Hem mesurat directament l'activitat d'ERK1/2 per immunoblot en divuit mostres de CBC i set mostres de pell sana. Els resultats són que sis (35%) dels CBCs mostren diferent grau d'activació ERK1/2. Comparant les dades moleculars, cel·lulars i histològiques, podem confirmar que l'activació ERK1/2 és principalment negativa a la massa tumoral però positiva als fibroblasts estromals, afectant les seves propietats proliferatives.

## **Mètodes**

### Pacients i preparació de les mostres

Per realitzar els experiments amb immunohistoquímica i immunoblot vàrem obtenir divuit mostres consecutives de CBC a partir de divuit pacients citats per exèresi d'aquest tumor a la secció de dermatologia de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida. El teixit va ser obtingut amb el consentiment de cadascú dels pacients i el projecte va ser aprovat pel comitè ètic de l'hospital. Aquests pacients van ser triats de forma aleatòria sense discriminació d'edat, sexe, localització de la lesió o subtipus tumoral. La mitja de l'edat dels pacients fou de 75.5 anys (+/-9.9). El nombre d'homes i de dones va ser de tretze (72%) i cinc (28%) respectivament. El patró histològic dels CBC comprenia dos morfeiformes (11%), quatre micronodulars (22%), tres de patró mixt (16.5%), set nodulars (39.5%) i dos superficials (11%). El patró mixt es considera una combinació de dos tipus diferents: nodular i micronodular. Les mostres de pell normal van ser obtingudes del teixit restant de pacients intervinguts per altres causes. Per recollir el teixit en fresc es va realitzar una biòpsia amb un punx de 4 mil·límetres immediatament després d'extirpar el tumor i es va congelar en nitrogen líquid. La resta de la peça quirúrgica va ser fixada en formol i inclosa en parafina per realitzar la tinció amb hematoxilina-eosina i l'anàlisi immunohistoquímic. En el cas dels cultius cel·lulars, les mostres de teixit tumoral van ser obtingudes mitjançant el curetatge de tres CBCs nodulars de tres pacients consecutius triats a l'atzar, sense cap altra discriminació, i dipositades en medi de cultiu M106 fins el seu processament immediat.

### Extret de proteïnes

Per obtenir l'extret de proteïnes, es va tallar la part apical de la peça extreta mitjançant el punx (epidermis + dermis), rebutjant la resta (hipodermis). La mostra es va afegir a 70 µl de *lysis buffer* ( urea 1M, SDS 1%, 100 mM de Tris-HCl pH 6.8) juntament amb una cullerada de *glass beads* (425-600 micres, Sigma). La barreja va ser escalfada a 95°C durant 2 minuts. Després, es va disgregar amb el sistema FastPrep FP120 (BIO101) durant 60 segons, dues vegades, a força 5. Un cop recuperat l'extret s'afegeix 2x Laemmli buffer. Per comprovar que l'extret resultant és vàlid, es va avaluar la quantitat de proteïna de cada mostra mesurant els nivells d'actina

### Immunoblot

Les mostres de proteïna es van posar en SDS-PAGE, transferir a membranes PVDF (Millipore) i analitzar per immunoblot. Els anticossos secundaris corresponents es van detectar fent servir substrat quimioluminiscent HRP Immobilion Western (Millipore). La quimioluminiscència emesa pels *western blot* va ser captada amb l'ajuda de la càmera CCD (Lumimager, Roche). La quantificació de les bandes es va realitzar amb el software d'anàlisi de gels del Lumimager. Els resultats van ser expressats com a valors relatius. Els anticossos primaris foren: vimentina (*monoclonal clone C4*, Millipore), phospho-44/42 MAPK (*rabbit polyclonal*, New England BioLabs cat.9101S) i pan ERK1/2 (*mouse monoclonal*, Upstate).

### Immunohistoquímica

Els blocs de mostra fixada van ser tallats amb un gruix de 3 µm i assecats durant 1 hora a 65°C abans de ser desparafinitats en xilè, rehidratats a través d'una sèrie de banys en etanol a diferents graus i rentats amb PBS (*phosphate-buffered saline*). La recuperació d'epítops es realitzà al Mòdul de Pre-Tractament PT-LINK (DAKO) a 95°C durant 20 minuts en buffer 50x Tris/EDTA a pH de 9. Abans de la tinció dels talls, la peroxidasa endògena va ser bloquejada. Els anticossos usats foren: Erk1/2 phospho-44/42 MAP Kinase (*rabbit polyclonal*, New England BioLabs cat.9101S), pan ERK1/2 (Transduction Laboratories cat. E17120), ki67 (MIB1 *mouse monoclonal*, DAKO), i vimentina (*rabbit monoclonal*, DAKO). Després de la incubació, la reacció va ser visualitzada amb l'EnVision FLEX Detection Kit (Dako, Glostrup, Denmark), fent servir com a substrat el cromogen diaminobenzidina. També es van testar controls positius i negatius. Es va obtenir una puntuació histològica (*histoscore*) de cada mostra, amb un rang de 0 (sense immunoreactivitat) fins a 300 (màxima immunoreactivitat), segons l'aplicació de la següent fórmula:  $histoscore = 1x \text{ (tinció lleugera)} + 2x \text{ (tinció moderada)} + 3x \text{ (tinció forta)}$ .

### Cultiu cel·lular

El teixit va ser tractat amb tripsina 0.25% a 37°C durant 15 minuts i disgregat amb la pipeta (moviments d'*up and down*) múltiples vegades per tal de separar els fibroblasts. Després d'eliminar el material residual de la biòpsia, els fibroblasts van ser recollits per centrifugació i plantats en plaques de quatre

pous. El medi de cultiu utilitzat va ser l'M106 al qual es va afegir sèrum amb suplementes de creixement (Gibco-Invitrogen) i es van incubar a 37°C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Els fibroblasts van ser cultivats durant tres dies abans de l'experiment i emmagatzemats en nitrogen líquid després del segon passatge. Els fibroblasts humans sans van ser obtinguts a GIBCO (Cat. N° C-013-5C) i cultivats en les mateixes condicions que els tumorals.

#### Immunofluorescència

Les cèl·lules van ser rentades en PBS i fixades amb paraformaldehid al 4% durant 15 minuts a temperatura ambient. Per permeabilitzar-les, s'utilitzà metanol durant 2 minuts a 0°C i es van bloquejar amb BSA 3%. L'anticòs policlonal de conill contra Ki67 (sc-15402) es va combinar amb cabra anti-conill Alexa488 (Molecular Probes) en PBS i BSA 0.5%. Els nuclis es van tenyir amb Hoechst (Sigma). Vam obtenir les imatges mitjançant un objectiu de 40X al microscopi invertit Olympus IX71.

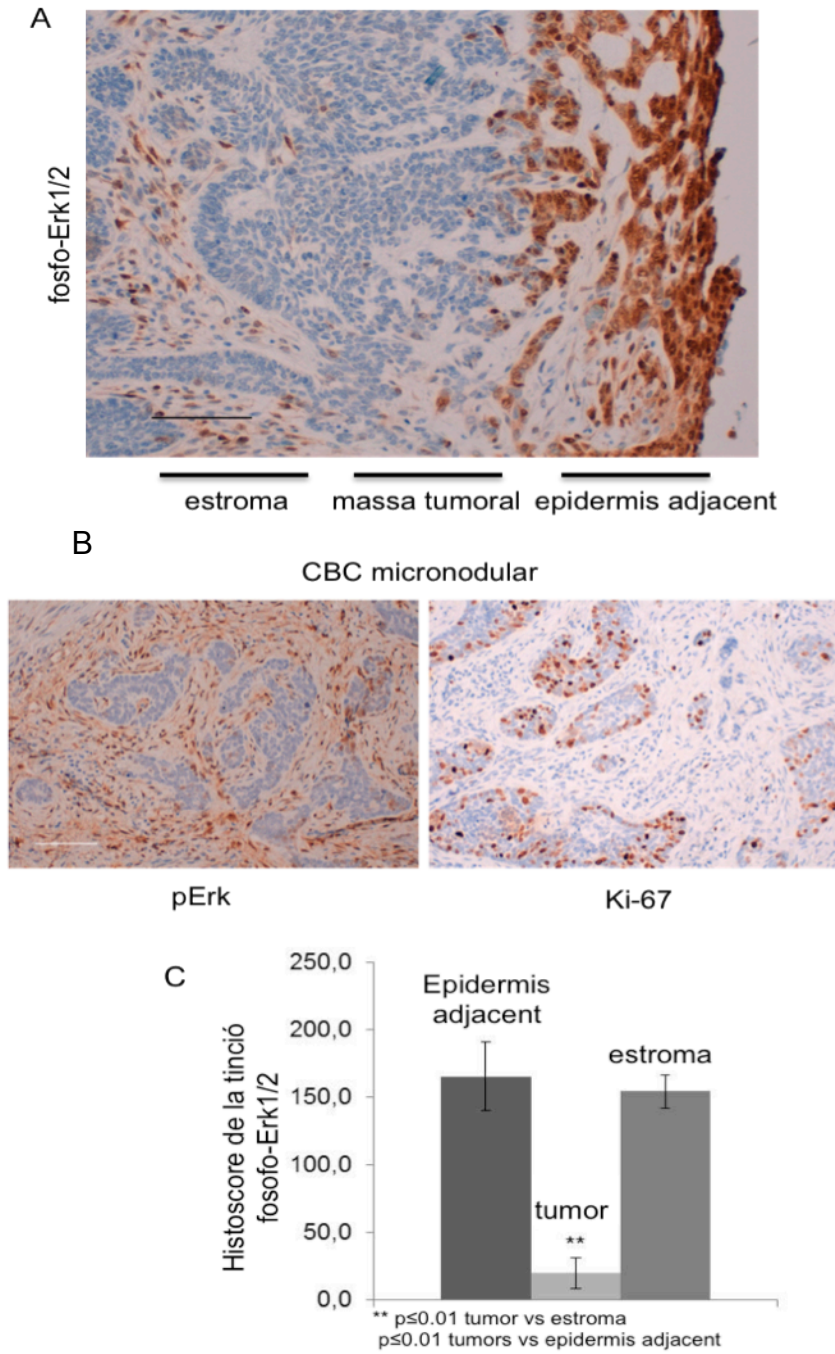
#### Anàlisi estadístic

Les dades s'expressen en mitja +/- error estàndard de la mitja (SEM). Les comparacions entre grups es van realitzar fent servir una variància igual (a la figura 1C) i test de t-student per a dues mostres sota una hipòtesi de dues cues (figura 2B). A les figures, la barra de error indica el SEM, i si és significatiu s'indica amb asteriscs.

## Resultats

### L'acumulació d'ERK1/2 fosforilat estava present a l'estroma dels CBCs

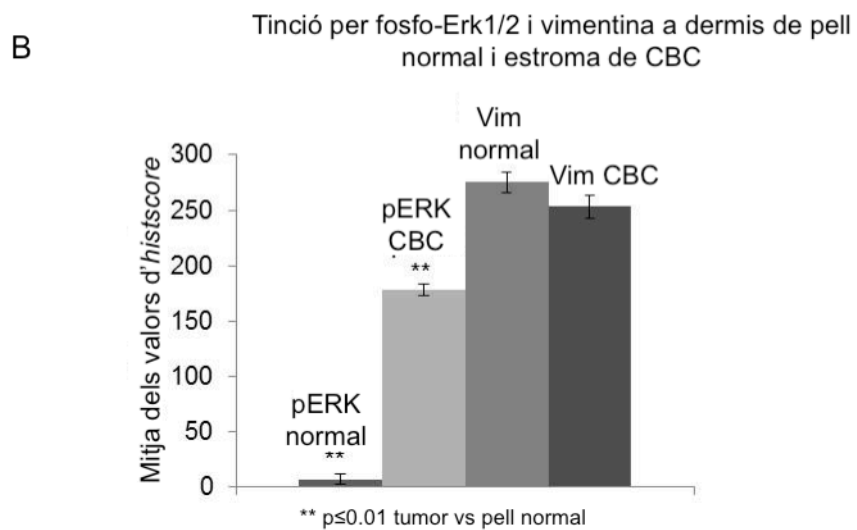
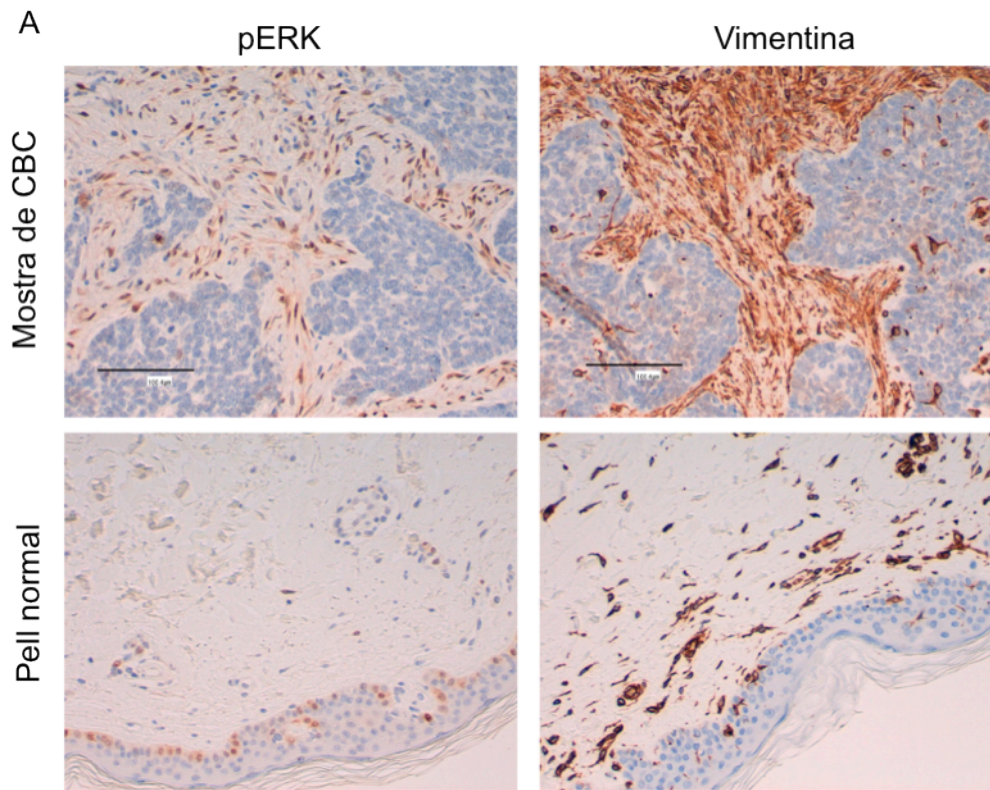
Per estudiar l'activació d'ERK1/2 vam avaluar la fosforilació per immunohistoquímica en divuit mostres de CBC. Les figures 1A i 1B mostren la tinció per pERK1/2 a dues mostres representatives. L'activitat ERK1/2 era predominantment negativa a la massa tumoral (17/18) mentre que en algunes mostres (8/18), s'observava una forta tinció pERK1/2 a l'epidermis adjacent a la massa tumoral<sup>6</sup> (figura 1A). Només en un cas, un CBC superficial, semblava haver-hi una tinció homogènia per pERK1/2 a la massa tumoral (dades no mostrades). D'acord amb resultats previs, aquests resultats indiquen que la fosforilació d'ERK1/2 pot estar pobrament present a la massa tumoral<sup>6,7</sup>. Malgrat això, hem observat que la majoria de les mostres (14/18) tenien tinció per a pERK1/2 a l'estroma, al voltant del tumor (figura 1A i 1B). L'anàlisi d'aquestes imatges indica que la mitja d'*histoscore* (mitja + SEM) per tinció de pERK1/2 resulta positiva a l'epidermis adjacent ( $165.6 \pm 25.7$ ) i a l'estroma ( $154.3 \pm 12.4$ ) i negativa a la massa tumoral ( $20.3 \pm 11.5$ ;  $p \leq 0.01$ ) (figura 1C). Per tant, les nostres dades suggereixen que l'activitat ERK1/2 al CBC presenta un patró espacial específic amb cèl·lules ERK1/2 positives distribuïdes al voltant de la massa tumoral, la qual no mostra tinció.



**Figura 1** Tinció per fosfo-ERK1/2 i Ki-67 a CBCs esporàdics. (A) Mostra representativa de CBC micronodular. Augment 100X (la barra equival a 200µm) (B) Mostra representativa de CBC morfeiforme. Augment 200X (la barra equival a 100 µm) (C) Quantificació de la tinció per fosfo-Erk1/2. Es mostren els valors de la mitja d'*histoscore* (mitja±SEM) per l'epidermis adjacent (n=8), massa tumoral (n=18) i estroma (n=14).



En moltes neoplàsies, s'ha descrit que els fibroblasts "activats" són reclutats al voltant del tumor. Així, l'increment de l'activitat ERK1/2 a l'estroma del CBC podria ser explicat per una acumulació de fibroblasts al voltant de la massa tumoral o bé per una possible activació específica d'aquests. Amb l'objectiu d'indagar sobre aquestes possibilitats, hem comparat CBCs i pell sana, de forma paral·lela, avaluant la tinció de pERK1/2 mitjançant un mètode semiquantitatiu (*l'histoscore*, veure mètodes), que considera el percentatge i la intensitat de la tinció. Per controlar en nombre total de fibroblasts, hem comparat la tinció per vimentina a les mateixes mostres. A la figura 2A es pot veure una imatge representativa de CBC i pell normal tenyides per pERK1/2 i vimentina. La senyal de pERK1/2 per cèl·lula estava clarament incrementada a l'estroma del CBC i no a la dermis normal (figura 2B). La diferència obtinguda amb *l'histoscore* entre les mostres de CBC ( $178.3 \pm 1.7$ ) i la pell normal ( $7 \pm 1.5$ ) va ser significativa ( $p \leq 0.01$ ) (figura 2B). En canvi, no es van observar diferències en la tinció de vimentina per cèl·lula entre la pell normal i el tumor, tot i que la senyal per vimentina es concentrava al voltant de la massa tumoral, indicant un increment de fibroblasts (figura 2). Per tant, amb les dades obtingudes, es pot suggerir que els fibroblasts de l'estroma del CBC mostren activació.

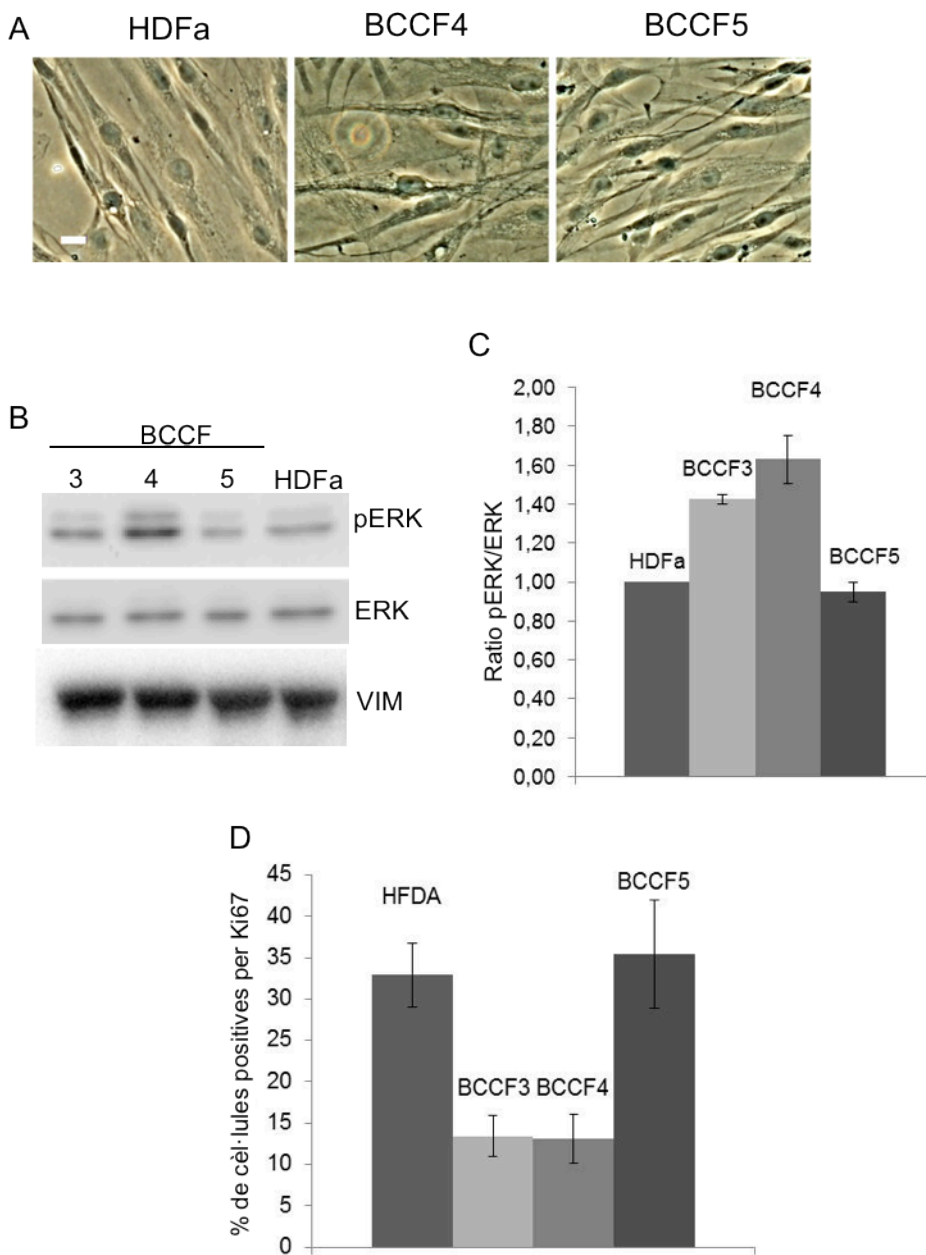


**Figura 2** (A) Immunotinció de pERK1/2 i vimentina en un CBC mixt i a pell normal. Augment 200X (la barra representa 100 μm) (B) Quantificació de la tinció per pERK1/2 i vimentina. Es mostra els valors d'*histoscore* (mitja ± SEM) per l'estroma dels CBCs (n=3) i la dermis normal (n=3).

Aïllament i anàlisi de fibroblasts dèrmics procedents de l'estroma dels CBCs

Els fibroblasts aïllats del teixit tumoral mantenen el seu fenotip activat quan són cultivats *in vitro*<sup>16</sup>. Aquesta característica és deguda a un bucle autocrí d'auto-perpetuació, de manera que no hi ha interrupció de la noxa inicial. Nosaltres hem analitzat si els fibroblasts estromals de CBC mantenen les alteracions de la senyal ERK1/2 quan són cultivats. Per aïllar els fibroblasts dèrmics vàrem obtenir tres mostres de CBC nodular a través de curetatge (veure mètodes). Els fibroblasts de les mostres de CBC (CBCF) van ser cultivats en medi definit M106 al qual es va afegir sèrum amb suplementes de creixement (veure mètodes). La morfologia de les cèl·lules que van créixer sota aquestes condicions fou similar entre les tres mostres de CBCF i comparable amb els fibroblasts normals (figura 3A). Aquestes, mostraven una forma bipolar i expressaven vimentina (figura 3B). Per analitzar l'activació d'ERK1/2, vàrem obtenir un extret de proteïnes totals de cada cultiu després de tres passatges. També, amb l'objectiu de mesurar proliferació, vam determinar per immunofluorescència la tinció nuclear de Ki67. La decisió de analitzar-los després de tres passatges va ser per evitar l'acumulació de alteracions degudes a un cultiu continuu<sup>12</sup>. En comparació amb els fibroblasts normals, dos dels tres CBCF mostraven un increment de l'activitat ERK1/2 (figura 3C). De manera important, les mateixes mostres exhibien una lenta proliferació (figura 3D). És ben conegut que la supraregulació d'ERK produeix una atenuació en la proliferació en fibroblasts primaris<sup>3</sup>, i concordant amb això, hem vist que no hi ha correlació entre el patró de tinció de pERK i Ki67 a l'estroma del CBC (figura 1B). El marcatge per Ki67 estava present a la massa tumoral,

que era predominantment negativa per pERK, i de forma inversa, l'estroma mostrava nivells molt baixos de Ki67 i elevats de pERK. Per tant, les nostres dades suggereixen que una activació anormal d'ERK als fibroblasts dèrmics de l'estroma del CBC produeix una disminució en la proliferació d'aquests.



**Figura 3.** Activitat ERK1/2 i proliferació de fibroblasts dèrmics aïllats de mostres de CBCs esporàdics i pell normal. (A) Fibroblasts dèrmics aïllats de biòpsies de CBC i plantats en plaques de cultiu. La barra són 10 $\mu$ m. (B) Immunoblot per detectar pERK1/2 i ERK1/2 total a mostres de fibroblasts dèrmics de pell normal i tumoral. Les mostres expressen nivells similars de vimentina. (C) Quantificació de la proporció entre pERK1/2 i ERK1/2 total de les mostres de B. Es mostren els valors de mitja  $\pm$  SEM de tres experiments independents. (D) Proliferació de

fibroblasts dèrmics al mateix experiment. S'ensenya la mitja  $\pm$  SEM del percentatge de nuclis positius per Ki67.

## Discussió

En aquest treball hem observat que pErk està característicament present a l'estroma dels CBCs. Hem confirmat que l'activitat d'ERK1/2 està absent a la massa tumoral, com prèviament s'havia descrit per Rittié *et al*<sup>6</sup> i Neill *et al*<sup>7</sup>. A més, ens ha estat possible detectar activació d'ERK1/2 i atenuació de la proliferació als fibroblasts aïllats de l'estroma dels CBCs.

La nostra hipòtesi és que hi ha una regulació dual de l'activitat ERK1/2 durant la formació del CBC; d'una banda, aquesta activitat està reprimida a la massa tumoral per promoure el creixement de la neoplàsia, i d'altra banda està induïda als fibroblasts de la dermis atenuant la proliferació estromal, fet que afavoreix la progressió del carcinoma.

D'acord amb aquesta idea, la inducció de la via Ras/Raf/MEK/ERK1/2 en cèl·lules normals té un paper clau contra la transformació oncogènica promovent l'aturada de la proliferació<sup>3</sup>. S'ha suggerit que la via ERK1/2 pot actuar a través d'un bucle de retroalimentació negativa, bloquejant l'activitat Ras<sup>3</sup>. També s'ha proposat (per Neill *et al*<sup>7</sup>) que l'activitat ERK està reprimida a la massa tumoral del CBC a causa de l'estimulació per part de Gli1. L'activació de la via hedgehog i la consegüent acumulació de Gli1 s'observa a un percentatge important de CBCs<sup>9</sup>. Així, plantejem un escenari on Gli1 inhibeix l'activació d'ERK1/2 i com a resultat s'obté una infra regulació del *feed-back*

negatiu contra Ras, permetent el creixement de la massa tumoral per altres vies dependents d'aquesta proteïna.

D'una forma oposada, l'activitat ERK1/2 pot estar induïda als fibroblasts dèrmics per un mecanisme desconegut.

En casos concrets, la tinció per pERK estava present principalment a la banda epidèrmica de cadascuna de les masses tumorals. Sota el nostre punt de vista, aquesta característica pot representar un mecanisme repressiu<sup>6</sup>, ja que en models embriològics i altres patologies s'ha demostrat que l'activació d'ERK està espacial i temporalment regulada (induïda o reprimida) visualitzant-se en forma de gradients en la tinció immunohistoquímica<sup>13-16</sup>. El possible mecanisme repressiu podria estar relacionat amb les interaccions epitel·li-estroma, que són essencials en el desenvolupament de molts càncers<sup>17</sup>.

En diversos tipus de neoplàsies, els fibroblasts aïllats de l'estroma peritumoral mostren una elevada secreció de proteïnes de matriu extracel·lular i factors de creixement, a més de presentar canvis morfològics i elevades taxes de proliferació<sup>18-20</sup>. Aquests fibroblasts "activats" (o CAFs, de l'anglès *cancer associated fibroblasts*) tenen un paper fonamental a l'hora de definir la invasió tumoral i la capacitat de metastatitzar<sup>18</sup>. Aquests CAFs adopten canvis morfològics després de cultius perllongats (encara que no desenvolupen un fenotip de malignitat) i promouen alteracions en l'expressió de múltiples marcadors en queratinòcits normals<sup>21</sup>. Els nostres experiments suggereixen l'existència de fibroblasts "activats" a l'estroma del CBC però és important tenir en compte que els cultius perllongats també poden induir per sí sols alteracions

que farien que les cèl·lules obtingudes recordessin a les *stem cells*<sup>12</sup> pel que fa a morfologia i expressió de marcadors. Els nostres resultats, fent servir cultius amb pocs passatges, ens ensenyen que hi ha activació d'Erk1/2 als fibroblasts del CBC. També, el marcatge per vimentina ens indica la presència d'un elevat nombre de fibroblasts al voltant de la massa tumoral. No obstant, els nostres fibroblasts aïllats de tumor, disminueixen la seva proliferació després d'un breu cultiu i no incrementaven l'expressió de vimentina. La sobreexpressió dels nivells de vimentina ha sigut detectada de forma específica als CBCs agressius, indicant que les mostres utilitzades al nostre treball corresponen a formes no agressives<sup>22</sup>. La nostra idea és que els fibroblasts dèrmics de l'estroma dels CBCs poden ser diferents respecte els fibroblasts normals com va suggerir Lacina *et al*<sup>21</sup>. ja que difereixen en l'activitat ERK1/2. Malgrat això, no podem correlacionar l'increment de la fosforilació d'ERK1/2 amb l'activació dels fibroblasts, ja que aquesta activitat produeix una disminució en la proliferació dels cultius. Creiem que són necessaris més estudis sobre els fibroblasts i les cèl·lules vasculares i inflamatòries per dilucidar la funció de l'estroma en la formació del CBC.



## **Bibliografia**

1. Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* 2012;66:105-43.
2. Campbell JS, Wenderoth MP, Hauschka SD, Krebs EG. Differential activation of mitogen-activated protein kinase in response to basic fibroblast growth factor in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:870-4.
3. Courtois-Cox S, Genter Williams SM, Reczek EE et al. A negative feedback signaling network underlies oncogene-induced senescence. *Cancer Cell.* 2006;10:459-72.
4. Zhu J, Woods D, McMahon M, Bishop JM. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev.* 1998;12:2997-3007.
5. Schubbert S, Bollag G, Shannon K. Deregulated Ras signaling in developmental disorders: new tricks for an old dog. *Curr Opin Genet Dev.* 2007;17:15-22.
6. Rittié L, Kansra S, Stoll SW et al. Differential ErbB1 signaling in squamous cell versus basal cell carcinoma of the skin. *Am J Pathol.* 2007;170:2089-99.

7. Neill GW, Harrison WJ, Ikram MS et al. GLI1 repression of ERK activity correlates with colony formation and impaired migration in human epidermal keratinocytes. *Carcinogenesis*. 2008;29:738-46.
8. Schnidar H, Eberl M, Klingler S et al. Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with hedgehog/GLI in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK/JUN pathway. *Cancer Res*. 2009;69:1284-92.
9. de Zwaan SE, Haass NK. Genetics of basal cell carcinoma. *Australas J Dermatol*. 2010;51:81-92; quiz 93-4.
10. Reifemberger J, Wolter M, Knobbe CB et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 2005;152:43-51.
11. Xie J, Aszterbaum M, Zhang X et al. A role of PDGFRalpha in basal cell carcinoma proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:9255-9.
12. Szabó P, Kolář M, Dvořánková B et al. Mouse 3T3 fibroblasts under the influence of fibroblasts isolated from stroma of human basal cell carcinoma acquire properties of multipotent stem cells. *Biol Cell*. 2011;103:233-48.
13. Whelan JT, Hollis SE, Cha DS et al. Post-transcriptional regulation of the Ras-ERK/MAPK signaling pathway. *J Cell Physiol*. 2012;227:1235-41.

14. Baba HA, Stypmann J, Grabellus F et al. Dynamic regulation of MEK/Erks and Akt/GSK-3beta in human end-stage heart failure after left ventricular mechanical support: myocardial mechanotransduction-sensitivity as a possible molecular mechanism. *Cardiovasc Res.* 2003;59:390-9.
15. Corson LB, Yamanaka Y, Lai KM, Rossant J. Spatial and temporal patterns of ERK signaling during mouse embryogenesis. *Development.* 2003;130:4527-37.
16. Omori S, Hida M, Ishikura K et al. Expression of mitogen-activated protein kinase family in rat renal development. *Kidney Int.* 2000;58:27-37.
17. Sellheyer K, Krahl D. Does the peritumoral stroma of basal cell carcinoma recapitulate the follicular connective tissue sheath? *J Cutan Pathol.* 2011;38:551-9.
18. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:392-401.
19. Lynch CC, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation.* 2002;70:561-73.
20. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature.* 2004;432:332-7.

21. Lacina L, Smetana K Jr, Dvoránková B et al. Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes. *Br J Dermatol.* 2007;156:819-

22. De Rosa G, Barra E, Guarino M, et al. Fibronectin, laminin, type IV collagen distribution, and myofibroblastic stromal reaction in aggressive and nonaggressive basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol.* 1994;16:258-67.

**DISCUSSIÓ**

## 1. Posta a punt de l'obtenció de cultius de cèl·lules tumorals de CBC

El fet de necessitar mostres directes de pacients a l'hora de realitzar experiments amb CBCs comporta una sèrie d'avantatges (com la variabilitat entre tumors, important per estudiar les diferències entre ells), però també genera inconvenients. Els aspectes negatius d'aquest sistema de recollida de mostres són: l'accessibilitat a pacients afectats d'aquesta neoplàsia (fet no controlable per qui fa la recerca, en molts casos), les possibles alteracions produïdes durant la manipulació de les mostres o el seu transport, així com l'escassa quantitat de teixit que es pot obtenir de cada pacient, que limita molt la realització d'experiments amb cadascun dels tumors.

Per evitar aquests inconvenients, seria interessant poder accedir a alguna línia tumoral específica o bé realitzar un cultiu amb les mostres obtingudes que permetés, per exemple, disposar de més quantitat de teixit neoplàsic o conservar aquells tumor amb determinades característiques.

La dificultat d'obtenir aquests tipus de cultius s'objectiva per la manca de línies comercialitzades de CBC humà i per la pobra quantitat d'articles publicats respecte aquest tema.

Malgrat aquestes dificultats "a priori", un dels nostres objectius ha estat intentar posar a punt un mètode de cultiu de cèl·lules tumorals. Amb aquest propòsit, ens hem basat en la tècnica utilitzada per Grandó *et al*<sup>83</sup>, que sembla ser l'únic treball publicat que aconsegueix aïllar cèl·lules de CBC humà i mantenir-les a llarg termini. A l'igual que Grandó<sup>83</sup>, hem fet servir DKFSM (*Defined keratinocyte-serum free medium*) i afegint sèrum fetal boví, hem obtingut unes cèl·lules allargades que s'organitzaven formant un teixit compacte, molt diferent

morfològicament a les cèl·lules basaloides que esperariem observar. El fet d'incorporar aquest tipus de sèrum al medi per queratinòcits implica que el substrat resultant és molt similar a l'emprat per cultivar fibroblasts. Per tant, en aquest punt podem discutir si aquestes cèl·lules es tracten realment de cèl·lules epitelials tumorals o bé si són d'estirp mesenquimal. El mateix treball respon a aquesta qüestió, ja que al caracteritzar aquestes cèl·lules resulten positives per citoqueratina 5, que es considera marcador de CBC<sup>84</sup>, confirmant l'èxit del cultiu i descartant que siguin fibroblasts. En aquest punt, ens podem interrogar sobre el perquè de la morfologia alterada d'aquestes cèl·lules. Una possible explicació seria que, òbviament, les condicions a la placa de cultiu són molt diferents a les condicions *in vivo* de la neoplàsia i per tant les cèl·lules que creixen poden ser fenotípicament diferents a quan estan formant part de teixit. Una altra hipòtesi a discutir és que aquestes cèl·lules tumorals estiguessin adquirint característiques de mesènquima i perden la morfologia epitelial. Això ens explicaria que tot i mantenint marcadors de queratinòcits, la morfologia sigui similar a fibroblasts. La transició epiteli – mesènquima encara no és coneguda al CBC, però a causa de la seva importància en altres neoplàsies epitelials i les troballes establertes per Grandó<sup>83</sup>, no podem tancar la porta a que estiguem davant d'aquest fet.

Tot i seguir el mateix protocol, nosaltres no vàrem obtenir els mateixos resultats, ja que les cèl·lules plantades en idèntiques condicions adquirien també morfologia polaritzada, però no mostraven immunofluorescència positiva per citoqueratina 5 a més d'expressar vimentina de forma molt clara (característic de fibroblasts). Així doncs, ens trobem davant de cèl·lules diferents a les obtingudes al treball de referència. La qüestió és, són fibroblasts

o no? Com que inicialment els cultius els vàrem realitzar directament amb mostres obtingudes amb punx, es podria considerar la contaminació dels cultius amb fibroblasts de la dermis. Per evitar aquesta possible contaminació, els cultius successius els vam fer amb teixit obtingut mitjançant curetatge, que en principi no hauria de contenir cèl·lules dèrmiques, però els resultats van ser idèntics. Així doncs, no es pot excloure la idea que siguin fibroblasts però tampoc podem descartar que es tractin de cèl·lules de transició epiteli – mesènquima en una fase diferent a la identificada per Grandó<sup>83</sup> (ja que les nostres cèl·lules expressen marcadors diferents).

Amb un abordatge diferent, obtinguérem un èxit relatiu. Vam plantar les cèl·lules en medi de queratinòcits DKFSM (*Defined keratinocyte-serum free medium*) enriquit amb factors de creixement, sense sèrum fetal boví. Realitzant aquesta modificació, vam aconseguir cèl·lules tumorals amb morfologia de queratinòcits, però malauradament, aquestes començaven a queratinitzar en un curt període de temps, limitant llur supervivència a uns pocs dies.

Amb la intenció de buscar una causa que ens expliqués aquesta baixa supervivència, vam avaluar possibles alteracions en la proliferació d'aquestes cèl·lules. Per valorar l'activitat proliferativa de les mostres tumorals vam mesurar la incorporació de BrdU als nuclis a les 24 i 48 hores (abans de que fracassessin), partint de la idea que el CBC és un tumor de creixement lent (justificat per la seva pobra capacitat invasiva). Sorprenentment, vam observar que el percentatge de cèl·lules que incorporaven BrdU era d'aproximadament 2:1 respecte les mostres control de pell sana. Amb aquestes xifres, d'una banda veiem que paradoxalment existeixen moltes cèl·lules amb capacitat proliferativa tot i que el tumor és de creixement lent, i d'altra banda ens podem



preguntar per què no sobreviuen si tenen una capacitat proliferativa el doble del normal. La resposta segurament rau, un altre cop, en que les condicions *in vitro* no serien les ideals pel manteniment a llarg termini d'aquest tipus cel·lular.

Per tant, com ja esperàvem a causa del buit d'informació que hi ha respecte aquest tema, no hem pogut consolidar l'objectiu marcat d'establir un mètode de cultiu de CBC a llarg termini, malgrat basar-nos en tècniques que presumptament han donat resultat a alguns autors i fins i tot afegint-hi modificacions.

Es necessiten més estudis per tal d'esbrinar quines són les condicions que impedeixen el creixement *in vitro* del CBC. Potser les alteracions en les concentracions de calci o la inhibició d'algun factor implicat en la senyalització cel·lular tumoral en circumstàncies artificials explicarien aquest fet.

## **2. Importància de la via Sonic hedgehog en la formació dels CBCs esporàdics.**

El paper que té la via Sonic hedgehog (Shh) en la formació del CBC va ser ben establert mitjançant l'estudi de pacients amb la síndrome de Gorlin-Goltz (veure introducció). Per tal d'identificar la fisiopatologia d'aquesta neoplàsia, es va agafar com a model els CBCs d'aquests pacients i a través de l'anàlisi molecular es detectaren alteracions de Shh en el 100% dels casos. Les modificacions de la via que promouen la formació del CBC es tradueixen en una sobre-expressió d'aquesta, i en el cas de la síndrome de Gorlin-Goltz es deu a la pèrdua de funció inhibidora del receptor de membrana PTCH. Aquest fet, però, no es pot extrapolar als tumors dels pacients que no presenten aquest

trastorn congènit. Quan s'ha analitzat la repercussió de Shh en casos de CBC esporàdic, s'ha determinat que l'alteració de la via continua sent un factor molt important, però no explica la totalitat dels casos. Hi ha molta variabilitat en les xifres, però s'ha establert que la via Shh presenta hiperactivació en el 40-60% dels casos (per mutació de PTCH entre un 20% i un 40% i de SMO en un 10-20%)<sup>4,49,71,85</sup>. Com que l'activitat d'aquesta via s'evidencia per l'acumulació de la proteïna Gli1<sup>86</sup>, la gran majoria de treballs (si no tots) destinats a analitzar alteracions a Shh en CBC esporàdic es basen en la detecció de mRNA d'aquesta proteïna o bé realitzen immunofluorescència per tal de determinar llur expressió<sup>87,88,89</sup>. Nosaltres hem volgut comprovar la implicació de Shh a través una tècnica no utilitzada abans, com és la detecció dels nivells de proteïna Gli1 mitjançant immunoblot. Els resultats del nostre treball concorden amb les dades anteriorment descrites en diferents estudis. Analitzant la presència de la proteïna Gli1 a les nostres mostres de CBC vàrem detectar l'activitat d'aquesta via en el 55% dels casos. Aquestes dades ens fan plantejar dues preguntes: als CBC on no detectem nivells de Gli1; existeixen altres vies independents, no conegudes a dia d'avui, que condueixin a la formació del tumor? O bé hi ha elements comuns en tots aquests CBCs, com podria ser l'afectació de vies per sota de Shh (i per tant, regulades per aquesta), que s'alteressin directament restant Shh indemne?

Per respondre a aquest objectiu, proposat a l'inici del treball, vam decidir estudiar dues vies regulades per Gli1 amb el propòsit de determinar si existien alteracions, malgrat la integritat de Shh: la via Wnt/b-catenina i la via de les MAP quinases.

Via wnt/ $\beta$ -catenina:

La via Wnt és una de les que estan sota control de Shh<sup>89</sup>. L'activació d'aquesta comporta que  $\beta$ -catenina es deslocalitzi de la membrana citoplasmàtica i s'estabilitzi, obtenint com a resultat final l'acumulació citoplasmàtica i nuclear d'aquesta proteïna, que actuarà com a factor de transcripció<sup>74</sup>. Així, per detectar l'activació de Wnt, s'ha d'avaluar la l'acumulació i la localització de  $\beta$ -catenina.

Seguint aquest raonament, a les mostres de CBC amb activació de Shh hauríem de detectar acumulació de  $\beta$ -catenina nuclear com a conseqüència de l'expressió de Wnt. Són molts els estudis que analitzen la relació entre el CBC i la  $\beta$ -catenina, establint una clara associació entre l'expressió de Wnt i el desenvolupament del tumor<sup>76,90,91,92</sup>.

Al nostre treball hem determinat els nivells de  $\beta$ -catenina per immunoblot, el que suposa una novetat respecte als estudis publicats (on la majoria utilitzen detecció de mRNA o descripció immunohistoquímica). Els resultats obtinguts reforcen la importància del paper de  $\beta$ -catenina en el CBC esporàdic, ja que al 53% de les mostres detectem nivells elevats d'aquesta proteïna.

Malgrat haver comprovat la importància de  $\beta$ -catenina en la carcinogènesi del CBC, no podem concloure, com s'ha especulat en humans<sup>76,92</sup> i demostrat en ratolí<sup>93</sup>, que aquesta estigui controlada per l'activitat Shh en la seva totalitat. De les nostres dades podem extreure diverses conclusions:

- No es pot afirmar, de forma rotunda, la idea suggerida al principi d'aquest punt de que l'activació de Shh implica acumulació de  $\beta$ -catenina. Hem observat tres

mostres que expressen Gli1 i no acumulen  $\beta$ -catenina. Això demostra que l'activació de la via Wnt no és un pas imprescindible en la carcinogènesi del CBC secundari a l'alteració de la via Shh. Per tant, deu haver-hi determinades circumstàncies on Shh no influeixi sobre Wnt .

- D'altra banda, el fet de trobar mostres amb acumulació citoplasmàtica i nuclear de  $\beta$ -catenina en absència de senyal Gli1 suggereix que:

- Podrien existir altres vies implicades, independents de Shh, regulant Wnt.
- El tumor podria ser induït per mutacions en diferents elements d'aquesta via (per exemple APC, GSK3 $\beta$  o la mateixa  $\beta$ -catenina), com s'observa en altres neoplàsies epitelials<sup>74</sup>, pendent de demostrar a dia d'avui al CBC. Alterant-se aquestes, es desenvoluparia un CBC sense la participació de Shh. Les principals alteracions que es podrien esperar serien una inactivació de GSK3 $\beta$ , una pèrdua de funció d'APC i modificacions a l'estructura de  $\beta$ -catenina que no permetessin el reconeixement per part de GSK3 $\beta$ <sup>92</sup>.

El coneixement d'aquestes dades ens obre un ventall d'alternatives pel que fa al tractament del CBC. Avui en dia ja existeixen fàrmacs destinats a inhibir Shh, però em vist en aquest treball que en molts casos la via està indemne. Així, es podrien dissenyar nous fàrmacs contra les demés vies alterades independents de Shh (de moment em descrit Wnt, però segurament n'hi hauria més) i amb un simple anàlisi molecular podríem detectar l'alteració concreta de cada pacient i establir un tractament personalitzat en el cas que estigués indicat.

A banda de l'associació entre  $\beta$ -catenina i Shh, un altre aspecte a destacar d'aquests estudis és la presumpta relació que s'ha descrit entre aquesta proteïna i la capacitat invasiva de la neoplàsia<sup>76,90</sup>. La base d'aquest raonament rau en que  $\beta$ -catenina té un paper fonamental en la interacció cèl·lula-cèl·lula formant part del citoesquelet<sup>94,95</sup> i en teixit epitelial la trobem ancorada a la membrana cel·lular. Com que s'ha demostrat que en CBC la localització de  $\beta$ -catenina és predominantment citoplasmàtica i nuclear, es pot deduir que la proteïna perd llur funció estructural en el tumor. Partint d'aquesta idea, és raonable pensar que les cèl·lules de CBC amb alteració de  $\beta$ -catenina tenen més capacitat de migració, i per tant, d'invasió.

Així, les nou mostres on hem trobat acumulació d'aquesta proteïna s'haurien de correspondre amb tumors invasius. A l'hora de comprovar aquesta hipòtesi, veiem que els CBCs amb presència de  $\beta$ -catenina es tracten de subtipus nodular (7) i superficial (2), que no destacarien precisament per llurs característiques invasives. Per tant, els nostres resultats no coincideixen amb la teoria que associa  $\beta$ -catenina i agressivitat tumoral, si bé és cert que es podrien realitzar molts més talls de cada mostra i buscar en profunditat la presència de cèl·lules basaloides tumorals.

#### Via de les MAP cinases (ERK)

Aquesta via té un paper fonamental en la proliferació cel·lular de múltiples càncers i això fa que sigui constant objecte d'estudi a l'hora de caracteritzar les neoplàsies. En el nostre objectiu d'analitzar molecularment el CBC vam decidir estudiar el que es sabia d'aquesta via i avaluar què podíem aportar.

Existeix una gran controvèrsia en el paper que té la via ERK en la formació de CBC de ratolí i d'ésser humà. Mentre que en model animal s'ha determinat la importància d'aquesta via, estimulada per Shh<sup>82</sup>, en treballs en humans no s'ha detectat activitat ERK a la massa tumoral malgrat l'expressió de Gli<sup>96,97</sup>. Davant d'aquesta contradicció, vàrem decidir analitzar la presència d'ERK a les nostres mostres tumorals mitjançant immunohistoquímica.

Amb aquesta tècnica hem comprovat que a la massa tumoral hi ha una activitat proliferativa homogènia (determinada mitjançant ciclina D1) mentre que la senyal ERK és predominantment negativa a gairebé totes les mostres. Neill *et al.*<sup>97</sup>, al seu treball, troben resultats idèntics i especulen que l'activitat de Gli produeix un efecte inhibitori d'ERK a les cèl·lules tumorals. Tanmateix, hem trobat mostres negatives tant per Gli com per ERK, els que ens indicaria que Gli no seria l'únic factor present en la carcinogènesi del CBC capaç de reprimir ERK. Un altre aspecte que hem identificat, coincidint amb els resultats de Rittié *et al.*<sup>96</sup>, és que hi ha un gradient d'activitat ERK en algunes mostres, existint aquesta activitat a les zones més properes a l'epidermis i desapareixent en profunditat. Aquesta idea està en consonància amb el possible efecte inhibitori de Gli sobre ERK.

També cal destacar que en una de les mostres vàrem observar expressió homogènia d'ERK a tota la massa tumoral (també Neill *et al.*<sup>97</sup> descriuen aquest fet al seu estudi), com a excepció a la resta dels experiments. El perquè d'aquesta troballa roman encara desconegut, però podríem atribuir-ho a que l'activitat d'ERK podria estar activada o reprimida segons la intensitat i duració de l'estímul desencadenant, depenent de la fase evolutiva en la que es trobi el tumor. Així l'activitat ERK variaria durant la carcinogènesi expressant-se només

en moments molt puntuals, detectats en baixos percentatges quan es realitzen els treballs.

Com a novetat, vàrem objectivar que l'activitat ERK sí és important a l'estroma tumoral. Aquesta característica es discutirà en un altre apartat més endavant.

### Sox9

Continuant amb l'anàlisi d'elements que podrien comportar la formació de CBCs sense alterar Shh vàrem intentar comprendre el paper de Sox9. Aquesta proteïna actua com a factor de transcripció al final de la via Shh<sup>98</sup> - i potser també de Wnt/ $\beta$ -catenina<sup>99</sup> -. Hi ha un treball, el de Vidal et al. on s'ha demostrat l'activació de Sox9 als casos de CBC esporàdic<sup>98</sup>, observant presència d'aquesta proteïna a la totalitat de CBCs analitzats (n=9). La nostra reflexió consisteix en que a l'activació de Sox9 es pot arribar a través de diferents estímuls, no només de Shh. A favor d'aquesta hipòtesi està el fet de que la desregulació de Shh correspon a un 50-60% dels CBCs, i per això deduïm que Sox9 no hauria d'expressar-se a totes les mostres d'un estudi (com afirma Vidal *et al.*<sup>98</sup>) si depengués exclusivament d'aquesta via (sinó que ho hauria de fer en un percentatge similar).

Al nostre treball no hem pogut analitzar la presència de Sox9 ja que hem tingut problemes amb el marcatge de l'anticòs. Aquest objectiu resta pendent per a treballs futurs.

Altres elements possiblement implicats en la formació del CBC.

Com que l'afectació de la via Shh i la via Wnt, segons les nostres dades, no expliquen la totalitat dels casos de CBC, es pot especular en l'existència d'altres elements alterats que desembocarien en la formació d'aquesta neoplàsia.

L'alteració dels nivells de p53 (que actua com a supressor de tumors) és la més freqüent en les neoplàsies humanes<sup>100</sup>. El càncer cutani, per tant, no n'és una excepció i les mutacions de p53 són molt importants i han estat àmpliament estudiades en el desenvolupament del melanoma i del carcinoma escatós<sup>49</sup>. En aquests tumors, les mutacions porten la signatura de la radiació ultraviolada en aproximadament un 75% dels casos (canvis de citosina per timina o de dues citosines per dues timines<sup>4</sup>). Malgrat que s'ha vist en ratolí la presència de CBC sense alteracions de p53<sup>101</sup> (només induint Shh), es calcula que aquesta proteïna està afectada en un 50% dels casos en humans de raça caucàsica<sup>69,102</sup> i en un 33% a la població asiàtica<sup>103</sup>. La rellevància que en té, però, està encara per demostrar.

S'han intentat relacionar les alteracions de p53 i de la via Shh com a factors correlatius, però actualment no s'ha confirmat cap tipus d'associació entre aquestes. Encara que s'ha especulat que una deleció de p53 incrementaria l'expressió de Smo<sup>63</sup>, aquesta idea no s'ha demostrat de forma veraç a dia d'avui. A més, la relació temporal entre l'adquisició de la desregulació a la via Shh i l'alteració de p53 roman encara incerta. Als experiments de Ling et al.<sup>100</sup> es troben mostres on existeixen de forma simultània alteracions a p53 i Shh, altres on només hi ha alteracions de p53 (s'han identificat múltiples mutacions, i



en un mateix al·lel es poden trobar 2 o 3 alhora) i altres on la pertorbació afecta exclusivament a la via.

Són diversos els factors que evidencien que la disfunció de p53 no és un pas imprescindible en l'origen del tumor:

- Les mutacions a p53 en pacients amb la síndrome de Gorlin-Goltz són menys freqüents que als CBCs esporàdics i de tipus diferent, ja que majoritàriament no mostren les empremtes de la radiació ultraviolada (potser perquè els pacients s'exposen menys al sol pel risc que comporta)<sup>100</sup>.
- A la síndrome de Li-Fraumeni, on característicament hi ha aberracions de p53 no s'ha demostrat una major incidència de CBC<sup>69</sup>.
- El fet de no necessitar alteracions a p53, pas primerenc en la carcinogènesi, ens explicaria perquè no hi ha lesions precursors de CBC, al contrari que al melanoma i al carcinoma escatós.

Amb aquestes afirmacions, malgrat la controvèrsia que suscita aquest tema avui en dia, seria raonable assumir que les alteracions de p53 serien un esdeveniment secundari que no es requereix per la gènesi de la neoplàsia. Llavors, per què es troben taxes de p53 alterat entre el 30 i el 50% dels casos? L'explicació podria radicar en que aquesta alteració és molt habitual als queratinòcits humans. L'exposició solar que es va patint al llarg del temps fa que també trobem mutacions a p53 tant als queratinòcits sans peritumorals com als de persones sense patologia cutània (fins en un 70%)<sup>100</sup>. Això ens condueix a pensar que aquests tipus d'alteracions són extremadament freqüents en la població i és un fet usual trobar-les al analitzar mostres cutànies (per tant, també de CBC).

Malgrat que no s'objectivi un paper important en la patogènia del CBC, darrerament s'especula que les alteracions de p53 podrien traduir-se en una major agressivitat tumoral<sup>69</sup>, característica que avui en dia està per ratificar.

Un altre element a considerar en la formació del CBC és la proteïna Yap1<sup>104</sup>. A l'epiteli, Yap1 està associada a la membrana citoplasmàtica, formant un complex juntament amb  $\alpha$ E-catenina i  $\beta$ -catenina, garantint la unió cèl·lula-cèl·lula. Quan es perd aquesta adhesió cel·lular, Yap1 es transloca al nucli i es comporta com a factor de transcripció. D'aquesta manera, Yap1 regula la proliferació cel·lular mitjançant la inhibició per contacte. El fet que  $\alpha$ E-catenina estigui segrestant Yap1 li atorga un paper de supressor de tumors<sup>104</sup>.

En estudis de proliferació cel·lular (d'*stem cells* epidèrmiques) s'ha observat que Yap1 es localitza a la membrana quan forma epiteli i al citoplasma/nucli en cèl·lules disgregades<sup>105</sup>. No hi ha estudis realitzats sobre la importància de Yap1 en CBC (i la via Hippo, que la regula); però en canvi sí s'ha descrit que té un paper important en la carcinogènesi del carcinoma escatós (i fora de la pell s'ha identificat al carcinoma hepàtic, de mama i colorrectal)<sup>106</sup>. Mitjançant immunohistoquímica, nosaltres hem pogut observar la presència de Yap1 al nucli de les cèl·lules tumorals de CBC, el que indicaria que actua de forma sinèrgica amb  $\beta$ -catenina en la migració a nucli i la transcripció genètica també en el CBC (figura 14, veure apèndix).

Podem concloure que alteracions en la via Hippo podrien portar al desenvolupament del CBC. A més, com que aquesta via és activa a les *stem cells*, ens orientaria a pensar que aquestes serien l'origen cel·lular de la neoplàsia, aportant una dada més per intentar aclarir la controvèrsia que

existeix al voltant d'aquest tema. Aquestes idees ens obren un camp d'investigació per continuar estudiant la implicació d'altres factors encara no identificats en la formació del CBC.

### **3. La proliferació tumoral no és atribuïble a un únic patró característic de senyalització en tots els CBCs.**

Per l'estudi de la proliferació cel·lular, es poden mesurar els nivells de tres proteïnes diferents, que actuen en diverses fases del cicle cel·lular:

- Ki67 és bon marcador de cèl·lules amb capacitat proliferativa, però la seva detecció no implica que la cèl·lula s'estigui replicant en aquell moment. De fet, a dia d'avui encara no se sap quina és la seva funció concreta.
- Ciclina D1 és l'encarregada de forforilar a pRB, implicat en la proliferació, i destaca per ser un bon marcador de cèl·lules tumorals. No obstant, es considera poc específica ja que al nucli fa altres funcions a part de la replicativa.
- pRB fosforilat sí que identifica les cèl·lules que es troben en replicació, ja que és el marcador de la transició de la fase G1 (interval 1) a la fase S (de síntesi), motiu pel qual considerem que és el més adequat per detectar activitat proliferativa real.

Al nostre treball vàrem decidir estudiar la relació entre la proliferació del tumor i la detecció de  $\beta$ -catenina. S'havia comprovat anteriorment, a través de la detecció de Ki67, que les mostres que acumulen  $\beta$ -catenina nuclear són més

proliferatives que les que no ho fan<sup>76</sup>. Però ja hem comentat que Ki67 només marca les cèl·lules amb capacitat proliferativa, independentment de si ho estan fent o no. Als nostres experiments hem vist que tots els CBCs expressen ciclina D1 i Ki67, indistintament de l'activitat Gli i/o  $\beta$ -catenina. Per tant, l'estudi de Saldanha *et al.*<sup>76</sup>, realment indica que al CBC existeixen moltes cèl·lules amb capacitat proliferativa, establint una primera idea sobre aquesta possible relació, però no demostra que siguin cèl·lules en replicació.

Nosaltres, amb la intenció d'estudiar aquesta associació d'una forma més específica, hem fet servir la detecció de pRB fosforilat per comprovar la importància de  $\beta$ -catenina en la proliferació tumoral. El resultat fou que totes les mostres amb acumulació de  $\beta$ -catenina expressen elevades taxes pRB fosforilat, i per tant, es troben proliferant. D'aquesta manera podem considerar  $\beta$ -catenina com un marcador d'activitat i creixement tumoral.

Com hem comentat prèviament, les mostres amb acumulació de  $\beta$ -catenina es relacionen de forma evident amb una major proliferació, mentre que la via ERK no té cap tipus de significació, ja que és inactiva gairebé totes les mostres proliferatives. Tanmateix, els nostres experiments revelen que també hi ha CBCs sense activitat d'aquestes dues vies però amb marcada activitat ciclina D1. D'aquí es pot desprendre que hi ha altres mecanismes paral·lels que poden regular aquesta activitat en absència de les senyals que esperaríem trobar com a estímul.

D'altra banda, tampoc hem vist relació directa entre l'activació de Shh (sense passar per Wnt) i proliferació cel·lular tumoral, ja que moltes mostres que no expressen Gli (ni  $\beta$ -catenina) tenen elevada activitat de ciclina D1.

#### 4. Relació entre els aspectes clínics i els marcadors moleculars

Són diversos els treballs sobre CBC destinats a trobar explicacions que justifiquin llurs característiques clíniques i a establir patrons d'associació entre alteracions moleculars i determinats subtipus.

S'ha descrit una possible relació entre el subtipus i l'origen cel·lular del tumor. La teoria seria que els CBC sorgits de les *stem cells* del fol·licle pilós serien de subtipus nodular, mentre que si l'estímul recau sobre l'epidermis interfol·licular o sobre zones de pell sense pèl, es desenvoluparien tumors superficials<sup>64</sup>. Revisant els nostres pacients, veiem que els CBCs de tipus nodular es corresponen amb localitzacions facials (i un a cames, que és regió pilosa), que estaria d'acord amb la idea anterior. Malauradament, però, un dels dos superficials també era situat a la cara, circumstància que no esperaríem trobar (l'altre, en canvi, era de pell de l'esquena).

Yang *et al.*<sup>93</sup>, per altra banda, especulen que els CBCs superficials estarien originats per alteracions de la via Wnt. Ho justifiquen dient que a les etapes inicials, els CBCs superficials són morfològicament molt similars a la matriu germinal del fol·licle pilós (on la via Wnt té un paper fonamental) i expressarien marcadors comuns, com queratina 17 i Sox9. Aquest raonament comportaria una important acumulació de  $\beta$ -catenina als CBCs superficials. Certament els nostres CBCs superficials mostren *scores* elevats de  $\beta$ -catenina, però també ho fan la majoria de nodulars i mixts, per lo que no podem corroborar que Wnt desenvolupi predominantment CBCs superficials.

Tampoc hem observat relació entre la via Shh i el subtipus tumoral. Hem detectat expressió de Gli1 a mostres de cadascun dels subtipus i també hem

vist que a tots els tipus hi ha mostres sense expressió de Gli1, pel que no es repeteix cap patró característic de comportament. És cert, però, que el nombre de mostres és baix en determinats casos (sobretot en superficials i morfeiformes) i això ens impedeix treure conclusions significatives.

Tampoc no hem trobat cap tipus de relació entre l'expressió de marcadors i l'edat o el gènere del pacient.

Si agafem com a referència altres càncers cutanis, com el melanoma, veiem que hi ha una clara associació entre el tipus de mutació que afecta el melanòcit (determinat pel patró d'exposició solar) i el subtipus tumoral. Així, aquelles formes sense dany solar crònic o bé a causa d'exposició intermitent (nodulars i d'extensió superficial, respectivament) presenten mutacions de BRAF o NRAS, mentre que els melanomes sobre pell amb dany solar crònic (lentigen maligne – melanoma), els acrals i els de mucoses mostren amplifícacions de CDK4, ciclina D1 i/o c-kit. Per tant, no seria una idea descabellada aplicar un patró de comportament similar en el CBC. Davant el buit d'informació i la manca d'estudis en profunditat sobre aquest tema, també podríem hipotetitzar amb l'existència d'una sèrie de mutacions característiques en determinats punts de les vies de transducció de senyal que determinarien el subtipus d'aquests tumors, segons el grau d'exposició solar. Per exemple, una exposició crònica al sol propiciaria la formació de tumors nodulars (ja que són els que predominen a la cara) i exposicions més intermitents generarien el tipus superficial (que és més freqüent al tronc). Un altre punt seria que les diferents mutacions configuressin un tipus determinat de neoplàsia depenent de la cèl·lula afectada (si incideixen sobre *stem cells* del fol·licle pilós originarien uns subtipus i si ho fan sobre pell fol·licular uns altres). Així podríem establir que les formes

clínicas/histològiques de CBC serien genèticament diferent les unes de les altres.

Com a conclusió podem dir que a hores d'ara manca molta informació al respecte de la relació entre clínica i biologia molecular. Al nostre estudi no hem trobat relació entre l'expressió de determinades proteïnes i la formació de patrons característics de CBCs, ni relacions amb edat, sexe o localització del tumor. Un punt a reforçar seria augmentar la mostra per intentar trobar algun vincle concret. Deixem la porta oberta a possibles hipòtesis i de cara al futur seria interessant l'estudi d'altres marcadors i altres proteïnes per veure l'associació dels diferents CBCs amb un diferent origen cel·lular o unes mutacions concretes.

## **5. Paper de l'estroma en el CBC.**

Com hem comentat anteriorment, a través de la immunohistoquímica vam observar una intensa activitat ERK als fibroblasts peritumorals, fet que ens indica que l'entorn del carcinoma és un element fonamental en la formació i la progressió de la neoplàsia.

Per tal de comprovar el paper de l'estroma, vam caracteritzar aquestes cèl·lules mitjançant cultiu. Els resultats obtinguts reflectien una clara manca de proliferació d'aquests fibroblasts, en comparació amb estroma de dermis sana.

Per tant, aquesta activitat ERK no es tradueix en proliferació, sinó que "l'activació" de l'estroma té un altre significat. Però, quina funció pot tenir ERK si no és la proliferació cel·lular?. Per respondre aquesta pregunta hem de

conèixer la composició de l'estroma al CBC i tenir en compte la importància que té l'ambient en el manteniment i progressió de les neoplàsies. Es creu que el tumor és capaç de secretar una sèrie de substàncies que atraurien els fibroblasts al seu voltant i els "activarien" (com VEGF i TGF $\beta$ )<sup>107</sup>. Aquests fibroblasts activats s'anomenen CAFs (de l'anglès *cancer associated fibroblasts*) i serien els responsables de modificar els components de la matriu extracel·lular (MEC) per afavorir la progressió tumoral<sup>107</sup>. Amb aquest objectiu, secretarien una sèrie d'elements com proteases, reguladors de creixement i d'angiogènesi (PDGF, VEGF)<sup>108</sup>. I és en la secreció d'aquestes substàncies on podria tenir ERK el seu paper. Entre els elements secretats pels CAFs destaquen les metaloproteases de matriu (MMP), que degraden proteïnes estromals: les que més freqüentment es troben al CBC són MMP 1, 2, 8, 9 i 13. S'ha descrit la relació entre la via de les MAP quinases i la secreció de certes MMP (sobretot la 9) en el carcinoma escatós<sup>109,110</sup>. Al CBC s'especula que la via de les MAP quinases, a través de l'estímul de l'*epidermal growth factor*, també seria responsable de l'expressió de determinades MMP<sup>111</sup>. Per tant, a manca d'estudis més concloents, podem assumir que en el CBC la presència d'ERK a l'estroma pot funcionar com a senyal per la producció de determinades proteïnes. D'igual manera hi ha relació entre la presència de syndecan 1 (que s'encarregaria d'inhibir el creixement tumoral) i l'activació d'ERK a l'estroma de tumors epitelials<sup>112</sup>. L'alta concentració de syndecan 1 a l'estroma del CBC<sup>4</sup> també podria explicar els nivells elevats d'ERK.

Aquestes modificacions produïdes a la matriu extracel·lular permetrien la transició epiteli-mesènquima (TEM). La TEM és un procés pel qual les cèl·lules epitelials perden la unió de membrana, adquirint característiques de



mesènquima, com la mobilitat, que les permeten progressar i envair els teixits circumdants<sup>113</sup>. Aquest fenomen té un paper fonamental en molts carcinomes derivats d'epiteli<sup>114</sup> i és controlat per MMP, integrines i TGF $\beta$ <sup>107</sup>. Al CBC, però, encara no s'ha demostrat si la TEM és present i no hi ha estudis concloents sobre la seva importància.

Per tant, creiem que la presència de fibroblasts activats a l'estroma del tumor formaria un mecanisme de senyalització autocrí que comportaria la secreció de citokines, metaloproteases i altres elements que afavoreixen la progressió tumoral. Aquesta hipòtesi és interessant de cara a treballs futurs per tal de determinar la importància de la TEM al CBC i podria establir-se com una nova diana terapèutica.

# **CONCLUSIONS**

Respecte a les hipòtesis plantejades en aquest treball i com a resposta als objectius exposats, els nostres resultats ens porten a les següents conclusions:

1. Les cèl·lules tumorals de CBC presenten queratinització i mort cel·lular als pocs dies d'estar en cultiu per causes encara desconegudes.
2. Mitjançant la detecció dels nivells de Gli1 per immunoblot, hem determinat que la hiperactivació de la via Sonic hedgehog està present en aproximadament la meitat dels casos de CBC esporàdic.
3. Per detecció directa de proteïna hem determinat que  $\beta$ -catenina s'acumula en el 53% de les mostres estudiades.
4. L'acumulació de  $\beta$ -catenina pot ser independent de l'activació de Shh.
5. No podem relacionar la presència de  $\beta$ -catenina amb l'agressivitat tumoral amb els nostres resultats, malgrat que aquesta associació s'ha descrit en diversos treballs.
6. Hi ha una correlació entre l'activació de  $\beta$ -catenina i l'augment del nivell de proteïna pRB fosforilada que ens indica la capacitat de les cèl·lules tumorals d'entrar en el cicle proliferatiu.
7. L'activitat ERK no està induïda en la massa tumoral dels CBC humans, però s'observen en alguns casos zones amb alta activitat ERK en les cèl·lules basaloïdes adjacents a l'epidermis.
8. ERK presenta elevats nivells d'activació i fosforilació en l'estroma tumoral en un elevat percentatge de CBCs.

9. L'estroma tumoral i els fibroblasts amb elevats nivells d'activitat ERK presenten baixos nivells de proliferació, indicant que l'activació de la via ERK en aquests casos no està relacionada amb la capacitat proliferativa.

10. No hem trobat cap relació entre l'expressió de diferents proteïnes i el tipus de CBC, l'edat, el sexe del pacient ni la localització tumoral.

# **BIBLIOGRAFIA**

1. Jacob A. Observations respecting an ulcer of peculiar character, which attacks the eyelids and other parts of the face. *Dublin Hospital Rep Commun Med Surg* 1827;4:232–239.
2. Bath-Hextall FJ, Perkins W, Bong J, et al. Interventions for basal cell carcinoma of the skin. In: *The Cochrane Library*, Issue 1, 2007. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. Search date 2007.
3. Rubin AI, Chen EH, Ratner D: Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2005, 353:2262-2269.
4. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol*. 2006 Feb;19 Suppl 2:S127-47.
5. Wong CS, Strange RC, Lear JT: Basal cell carcinoma. *BMJ* 2003, 327:794-798.
6. Skellett AM, Hafiji J, Greenberg DC, Wright KA, Levell NJ. The incidence of basal cell carcinoma in the under-30s in the UK. *Clin Exp Dermatol*. 2012;37:227-9.
7. Hafner C, Hartmann A, Knuechel R, Dietmaier W, Landthaler M, Vogt T: Molecular genetic analysis excluded implantation metastasis of basal cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 2003,127:1221-1224.
8. Ionescu DN, Arida M, Jukic DM: Metastatic basal cell carcinoma:four case reports, review of literature, and immunohistochemical evaluation. *Arch Pathol Lab Med* 2006,130:45-51.
9. Roenigk RK, Ratz JL, Bailin PL, Wheeland RG. Trends in the presentation and treatment of basal cell carcinomas. *J Dermat Surg Oncol* 1986;12:860–865.

10. McCormack CJ, Kelly JW, Dorevitch AP. Differences in age and body site distribution of the histological subtypes of basal cell carcinoma: possible indicator of differing causes. *Arch Dermatol* 1997;133:593–596
11. Telfer NR, Colver GB, Bowers PW. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 1999;141:415–423.
12. Sanmartín V, Aguayo R, Baradad M, Casanova JM. [Oral acitretin and topical imiquimod as neoadjuvant treatment for giant basal cell carcinoma]. *Actas Dermosifiliogr.* 2012;103:149-52.
13. Sheridan AT, Dawber RP. Curettage, electro-surgery and skin cancer. *Australas J Dermatol* 2000;41:19–30.
14. Housman TS, Feldman SR, Williford PM, Fleischer Jr AB, Goldman ND, Acostamadiedo JM, et al. Skin cancer is among the most costly of all cancers to treat for the Medicare population. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48:425-9.
15. Morris S, Cox B, Bosanquet N. Cost of skin cancer in England. *Eur J Health Econ.* 2009;10:267-73.
16. Jung GW, Metelitsa AI, Dover DC, Salopek TG. Trends in incidence of nonmelanoma skin cancers in Alberta, Canada, 1988–2007. *Br J Dermatol* 2010; 163:146–54
17. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 2012;166:1069-80.
18. Doherty VR, Brewster DH, Jensen S, Gorman D. Trends in skin cancer incidence by socioeconomic position in Scotland, 1978-2004. *Br J Cancer.* 2010;102:1661-4.
19. Holme SA, Malinovszky K, Roberts DL. Changing trends in nonmelanoma skin cancer in South Wales, 1988–98. *Br J Dermatol* 2000;143:1224–9.

20. Hoey SEH, Devereux CEJ, Murray L et al. Skin cancer trends in Northern Ireland and consequences for provision of dermatology services. *Br J Dermatol* 2007;156:1301–7.
21. Carsin AE, Sharp L, Comber H. Geographical, urban/rural and socioeconomic variations in nonmelanoma skin cancer incidence: a population-based study in Ireland. *Br J Dermatol*. 2011;164:822-9.
22. Flohil SC, de Vries E, Neumann HA, Coebergh JW, Nijsten T. Incidence, prevalence and future trends of primary basal cell carcinoma in the Netherlands. *Acta Derm Venereol*. 2011;91:24-30.
23. Birch-Johansen F, Jensen A, Mortensen L, Olesen AB, Kjær SK. Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancer in Denmark 1978–2007: rapid incidence increase among young Danish women. *Int J Cancer* 2010;127:2190–8.
24. Boi S, Cristofolini M, Micciolo R, Polla E, Dalla Palma P. Epidemiology of skin tumors: data from the cutaneous cancer registry in Trentino, Italy. *J Cutan Med Surg* 2003; 7:300–5.
25. Levi F, Franceschi S, Te VC, Randimbison L, La Vecchia C. Trends of skin cancer in the Canton of Vaud, 1976–92. *Br J Cancer* 1995; 72:1047–53.
26. Stang A, Ziegler S, Büchner U, Ziegler B, Jöckel KH, Ziegler V. Malignant melanoma and nonmelanoma skin cancers in Northrhine-Westphalia, Germany: a patient- vs. diagnosis-based incidence approach. *Int J Dermatol*. 2007;46:564-70.
27. Lipozencic J, Celic D, Strnad M, Tončić RJ, Pasić A, Rados J, Znaor A. Skin cancers in Croatia, 2003– 2005: epidemiological study. *Coll Antropol* 2010; 34:865–9.



28. Hannuksela-Svahn A, Pukkala E, Karvonen J. Basal cell skin carcinoma and other nonmelanoma skin cancers in Finland from 1956 through 1995. *Arch Dermatol*. 1999;135:781-6.
29. Plesko I, Severi G, Obsitnikova A, Boyle P. Trends in the incidence of non-melanoma skin cancer in Slovakia, 1978–1995. *Neoplasma* 2000; 47:137–42.
30. Richmond-Sinclair NM, Pandeya N, Ware RS, Neale RE, Williams GM, van der Pols JC, Green AC. Incidence of basal cell carcinoma multiplicity and detailed anatomic distribution: longitudinal study of an Australian population. *J Invest Dermatol* 2009; 129:323–8.
31. Karagas MR, Greenberg ER, Spencer SK, Stukel TA, Mott LA. Increase in incidence rates of basal cell and squamous cell skin cancer in New Hampshire, USA. *Int J Cancer* 1999; 81:555–9.
32. Chuang TY, Popescu A, Su WPD, Chute CG. Basal cell carcinoma. A population-based incidence study in Rochester, Minnesota. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22:413–17.
33. Harris RB, Griffith K, Moon TE. Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancers in southeastern Arizona, 1985–1996. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45:528–36.
34. Demers AA, Nugent Z, Mihalciou C, Wiseman MC, Kliewer EV. Trends of nonmelanoma skin cancer from 1960 through 2000 in a Canadian population. *J Am Acad Dermatol*. 2005;53:320-8.
35. Rawashdeh MA, Matalka I. Basal cell carcinoma of the maxillofacial region: site distribution and incidence rates in Arab/Jordanians, 1991 to 2000. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62:145–9.

36. Sánchez G, Nova J, de la Hoz F. [Risk factors for basal cell carcinoma: a study from the national dermatology center of Colombia]. *Actas Dermosifiliogr*. 2012;103:294-300.
37. Revenga Arranz F, Paricio Rubio JF, Mar Vázquez Salvado M, del Villar Sordo V. Descriptive epidemiology of basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma in Soria (north-eastern Spain) 1998-2000: a hospital-based survey. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2004;18:137-41.
38. Buendia Eisman A, Rodríguez Sánchez M, Sánchez Pérez MJ et al. El cáncer de piel en la provincia de Granada. *Actas Dermosifiliogr* 2000; 91:435-41.
39. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Teppo L, Thomas DB, eds. *Cancer incidence in five continents*. Vol. VIII. N.155. Lyon: IARC Scientific Publications; 2002.
40. Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M, et al. *Cancer incidence in five continents*. Vol. IX. N.160. Lyon: IARC Scientific Publications; 2007.
41. Bielsa I, Soria X, Esteve M, Ferrándiz C; Skin Cancer Study Group of Barcelonès Nord. Population-based incidence of basal cell carcinoma in a Spanish Mediterranean area. *Br J Dermatol*. 2009;161:1341-6.
42. Vilar-Coromina N, Miró-Queralt J, Cano-Bautista A, Vilardell-Gil L, Torres Babié P, Marcos-Gragera R. [Non-melanoma skin cancer: incidence time trends analysis in Girona, Spain, 1994-2007]. *Med Clin (Barc)*. 2011;137:145-51.
43. Ortega Bravo, Marta. Prevalencia del CCNM y factores de riesgo asociados. Tesis doctoral. Lleida, 2003.
44. Rajpara S, Ormerod A. Basal cell carcinoma. *Clin Evid (Online)*. 2008 Mar 18;2008.

45. Zhang M, Qureshi AA, Geller AC, Frazier L, Hunter DJ, Han J. Use of tanning beds and incidence of skin cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30:1588-93
46. Ferrucci LM, Cartmel B, Molinaro AM, Leffell DJ, Bale AE, Mayne ST. Indoor tanning and risk of early-onset basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67:552-62
47. Schulman JM, Fisher DE. Indoor ultraviolet tanning and skin cancer: health risks and opportunities. *Curr Opin Oncol.* 2009;21:144-9.
48. Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:13765-70.
49. Lacour JP. Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms. *Br J Dermatol.* 2002;146 Suppl 61:17-9.
50. Paolini F, Carbone A, Benevolo M, Silipo V, Rollo F, Covello R, Piemonte P, Frascione P, Capizzi R, Catricalà C, Venuti A. Human Papillomaviruses, p16INK4a and Akt expression in basal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30:108.
51. Gilbody JS, Aitken J, Green A. What causes basal cell carcinoma to be the commonest cancer? *Aust J Public Health* 1994;18:218–221.
52. Schreiber MM, Moon TE, Fox SH, et al. The risk of developing subsequent nonmelanoma skin cancers. *J Am Acad Dermatol* 1990;23:1114–1118.
53. Hartevelt MM, Bavinck JN, Kootte AM, et al. Incidence of skin cancer after renal transplantation in The Netherlands. *Transplantation* 1990;49:506–509.
54. Amini S, Viera MH, Valins W, Berman B. Nonsurgical innovations in the treatment of nonmelanoma skin cancer. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2010;3:20-34.

55. Telfer NR, Colver GB, Morton CA; British Association of Dermatologists. Guidelines for the management of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2008;159:35-48.
56. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, Solomon JA, Yoo S, Arron ST, Friedlander PA, Marmur E, Rudin CM, Chang AL, Low JA, Mackey HM, Yauch RL, Graham RA, Reddy JC, Hauschild A. Efficacy and safety of vismodegib in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2012;366:2171-9.
57. Skvara H, Kalthoff F, Meingassner JG, Wolff-Winiski B, Aschauer H, Kelleher JF, Wu X, Pan S, Mickel L, Schuster C, Stary G, Jalili A, David OJ, Emotte C, Antunes AM, Rose K, Decker J, Carlson I, Gardner H, Stuetz A, Bertolino AP, Stingl G, De Rie MA. Topical treatment of Basal cell carcinomas in nevoid Basal cell carcinoma syndrome with a smoothed inhibitor. *J Invest Dermatol*. 2011;131:1735-44.
58. Lever WF. Pathogenesis of benign tumors of cutaneous appendages and of basal cell epithelioma. *Arch Derm Syphilol* 1948; 57:679–724.
59. Ackerman AB, Reddy VB, Soyer HP. Neoplasms with Follicular Differentiation. New York: Ardor Scribendi, 2001.
60. Zackheim HS. Origin of the human basal cell epithelioma. *J Invest Dermatol* 1963; 40:283–97.
61. Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y, Sotiropoulou PA, Blanpain C. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol*. 2010;12:299-305.
62. Kasper M, Jaks V, Are A, Bergström Å, Schwäger A, Svärd J, Teglund S, Barker N, Toftgård R. Wounding enhances epidermal tumorigenesis by recruiting hair follicle keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:4099-104.

63. Wang GY, Wang J, Mancianti ML, Epstein EH Jr. Basal cell carcinomas arise from hair follicle stem cells in *Ptch1(+/-)* mice. *Cancer Cell*. 2011;19:114-24.
64. Grachtchouk M, Pero J, Yang SH, Ermilov AN, Michael LE, Wang A, Wilbert D, Patel RM, Ferris J, Diener J, Allen M, Lim S, Syu LJ, Verhaegen M, Dlugosz AA. Basal cell carcinomas in mice arise from hair follicle stem cells and multiple epithelial progenitor populations. *J Clin Invest*. 2011;121:1768-81.
65. Watt FM, Jensen KB. Epidermal stem cell diversity and quiescence. *EMBO Mol Med*. 2009;1:260-7.
66. Jensen KB, Watt FM. Single-cell expression profiling of human epidermal stem and transit-amplifying cells: *Lrig1* is a regulator of stem cell quiescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:11958-63.
67. Estrach S, Legg J, Watt FM. Syntenin mediates Delta1-induced cohesiveness of epidermal stem cells in culture. *J Cell Sci*. 2007;120:2944-52.
68. Arwert EN, Hoste E, Watt FM. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:170-80.
69. Tilli CM, Van Steensel MA, Krekels GA, Neumann HA, Ramaekers FC. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2005;152:1108-24.
70. Donovan J. Review of the hair follicle origin hypothesis for basal cell carcinoma. *Dermatol Surg*. 2009;35:1311-23.
71. Wicking C, Smyth I, Bale A. The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene*. 1999;18:7844-51.
72. Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*. 2003;3:903-11.

73. Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:306-17.
74. Doglioni C, Piccinin S, Demontis S, Cangi MG, Pecciarini L, Chiarelli C, Armellin M, Vukosavljevic T, Boiocchi M, Maestro R. Alterations of beta-catenin pathway in non-melanoma skin tumors: loss of alpha-ABC nuclear reactivity correlates with the presence of beta-catenin gene mutation. *Am J Pathol.* 2003;163:2277-87.
75. Li X, Deng W, Nail CD, Bailey SK, Kraus MH, Ruppert JM, Lobo-Ruppert SM. Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene.* 2006;25:609-21.
76. Saldanha G, Ghura V, Potter L, Fletcher A. Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. *Br J Dermatol.* 2004;151:157-64.
77. Li X, Deng W, Lobo-Ruppert SM, Ruppert JM. Gli1 acts through Snail and E-cadherin to promote nuclear signaling by beta-catenin. *Oncogene.* 2007;26:4489-98.
78. Nakamura M, Tokura Y. Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *J Dermatol Sci.* 2011;61:7-13.
79. Jordan NV, Johnson GL, Abell AN. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell Cycle.* 2011;10:2865-73.
80. Campbell JS, Wenderoth MP, Hauschka SD, Krebs EG. Differential activation of mitogen-activated protein kinase in response to basic fibroblast growth factor in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:870-4.

81. Schnidar H, Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Kasper M, Hauser-Kronberger C, Regl G, Kroismayr R, Moriggl R, Sibia M, Aberger F. Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with hedgehog/GLI in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK/JUN pathway. *Cancer Res.* 2009;69:1284-92.
82. Xie J, Aszterbaum M, Zhang X et al. A role of PDGFRalpha in basal cell carcinoma proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:9255-9
83. Grando SA, Schofield OM, Skubitz AP, Kist DA, Zelickson BD, Zachary CB. Nodular basal cell carcinoma in vivo vs in vitro. Establishment of pure cell cultures, cytomorphologic characteristics, ultrastructure, immunophenotype, biosynthetic activities, and generation of antisera. *Arch Dermatol.* 1996;132:1185-93.
84. Alessi E, Venegoni L, Fanoni D, Berti E. Cytokeratin profile in basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol.* 2008;30:249-55.
85. Daya-Grosjean L, Couvé-Privat S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett.* 2005;225:181-92.
86. Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A. Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature* 1997;389:876-881.
87. Ghali L, Wong ST, Green J, Tidman N, Quinn AG. Gli1 protein is expressed in basal cell carcinomas, outer root sheath keratinocytes and a subpopulation of mesenchymal cells in normal human skin. *J Invest Dermatol* 1999;113:595-9.

88. Nilsson M, Undèn AB, Krause D, et al. Induction of basal cell carcinomas and trichoepitheliomas in mice overexpressing GLI-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3438-43.
89. Bonifas JM, Pennypacker S, Chuang PT, et al. Activation of expression of hedgehog target genes in basal cell carcinomas. *J Invest Dermatol* 2001;116:739-42.
90. El-Bahrawy M, El-Masry N, Alison M, Poulsom R, Fallowfield M. Expression of beta-catenin in basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2003;148:964-70.
91. Purreyron C, Reilly L, Proby C, Panteleyev A, Fleming C, McLean K, South AP, Foerster J. Wnt5a is strongly expressed at the leading edge in non-melanoma skin cancer, forming active gradients, while canonical Wnt signalling is repressed. *PLoS One*. 2012;7:e31827.
92. Yamazaki F, Aragane Y, Kawada A, Tezuka T. Immunohistochemical detection for nuclear beta-catenin in sporadic basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2001;145:771-7.
93. Yang SH, Andl T, Grachtchouk V, et al. Pathological responses to oncogenic Hedgehog signaling in skin are dependent on canonical Wnt/beta3-catenin signaling. *Nat Genet* 2008;40:1130-5.
94. Brembeck FH, Schwarz-Romond T, Bakkers J, Wilhelm S, Hammerschmidt M, Birchmeier W. Essential role of BCL9-2 in the switch between beta-catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev* 2004;18:2225-30.
95. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303:1483-7.



96. Rittié L, Kansra S, Stoll SW et al. Differential ErbB1 signaling in squamous cell versus basal cell carcinoma of the skin. *Am J Pathol.* 2007;170:2089-99.
97. Neill GW, Harrison WJ, Ikram MS et al. GLI1 repression of ERK activity correlates with colony formation and impaired migration in human epidermal keratinocytes. *Carcinogenesis.* 2008;29:738-46.
98. Vidal VP, Ortonne N, Schedl A. SOX9 expression is a general marker of basal cell carcinoma and adnexal-related neoplasms. *J Cutan Pathol.* 2008;35:373-9.
99. Shi G, Sohn KC, Li Z, Choi DK, Park YM, Kim JH, Fan YM, Nam YH, Kim S, Im M, Lee Y, Seo YJ, Kim CD, Lee JH. Expression and functional role of Sox9 in human epidermal keratinocytes. *PLoS One.* 2013;8:e54355.
100. Ling G, Ahmadian A, Persson A, Undén AB, Afink G, Williams C, Uhlén M, Toftgård R, Lundeberg J, Pontén F. PATCHED and p53 gene alterations in sporadic and hereditary basal cell cancer. *Oncogene.* 2001;20:7770-8.
101. Saldanha G, Fletcher A, Slater DN. Basal cell carcinoma: a dermatopathological and molecular biological update. *Br J Dermatol.* 2003;148:195-202.
102. Ziegler A, Leffell DJ, Kunala S, Sharma HW, Gailani M, Simon JA, Halperin AJ, Baden HP, Shapiro PE, Bale AE, et al. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:4216-20.
103. Kim M-Y, Park HJ, Baek S-C et al. Mutations of the p53 and PTCH gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias. *J Dermatol Sci* 2002; 29:1–9.
104. Silvis MR, Kreger BT, Lien WH, Klezovitch O, Rudakova GM, Camargo FD, Lantz DM, Seykora JT, Vasioukhin V.  $\alpha$ -catenin is a tumor suppressor that

controls cell accumulation by regulating the localization and activity of the transcriptional coactivator Yap1. *Sci Signal*. 2011;4:ra33.

105. Schlegelmilch K, Mohseni M, Kirak O, Pruszek J, Rodriguez JR, Zhou D, Kreger BT, Vasioukhin V, Avruch J, Brummelkamp TR, Camargo FD. Yap1 acts downstream of  $\alpha$ -catenin to control epidermal proliferation. *Cell*. 2011;144:782-95.

106. Rosenbluh J, Nijhawan D, Cox AG, Li X, Neal JT, Schafer EJ, Zack TI, Wang X, Tsherniak A, Schinzel AC, Shao DD, Schumacher SE, Weir BA, Vazquez F, Cowley GS, Root DE, Mesirov JP, Beroukhi R, Kuo CJ, Goessling W, Hahn WC.  $\beta$ -Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell*. 2012;151:1457-73.

107. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:392-401.

108. Micke P, Kappert K, Ohshima M, Sundquist C, Scheidl S, Lindahl P, Heldin CH, Botling J, Ponten F, Ostman A. In situ identification of genes regulated specifically in fibroblasts of human basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2007;127:1516-23.

109. Garavello W, Maggioni D, Nicolini G, Motta L, Tredici G, Gaini R. Association between metalloproteinases 2 and 9 activity and ERK1/2 phosphorylation status in head and neck cancers: an ex vivo study. *Oncol Rep*. 2010;24:1073-8.

110. O-charoenrat P, Wongkajornsilp A, Rhys-Evans PH, Eccles SA. Signaling pathways required for matrix metalloproteinase-9 induction by betacellulin in head-and-neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer*. 2004;111:174-83.

111. Monhian N, Jewett BS, Baker SR, Varani J. Matrix metalloproteinase expression in normal skin associated with basal cell carcinoma and in distal skin from the same patients. *Arch Facial Plast Surg*. 2005;7:238-43.

112. Szatmári T, Mundt F, Heidari-Hamedani G, Zong F, Ferolla E, Alexeyenko A, Hjerpe A, Dobra K. Novel genes and pathways modulated by syndecan-1: implications for the proliferation and cell-cycle regulation of malignant mesothelioma cells. *PLoS One*. 2012;7:e48091

113. Papanikolaou S, Bravou V, Gyftopoulos K, Nakas D, Repanti M, Papadaki H. ILK expression in human basal cell carcinoma correlates with epithelial-mesenchymal transition markers and tumour invasion. *Histopathology*. 2010;56:799-809.

114. Sellheyer K, Krahl D. Does the peritumoral stroma of basal cell carcinoma recapitulate the follicular connective tissue sheath? *J Cutan Pathol*. 2011;38:551-9.

**ANNEX**

## **BOWEN'S DISEASE ASSOCIATED WITH HUMAN PAPILLOMAVIRUS INFECTION OF THE NAIL BED**

### **Abstract**

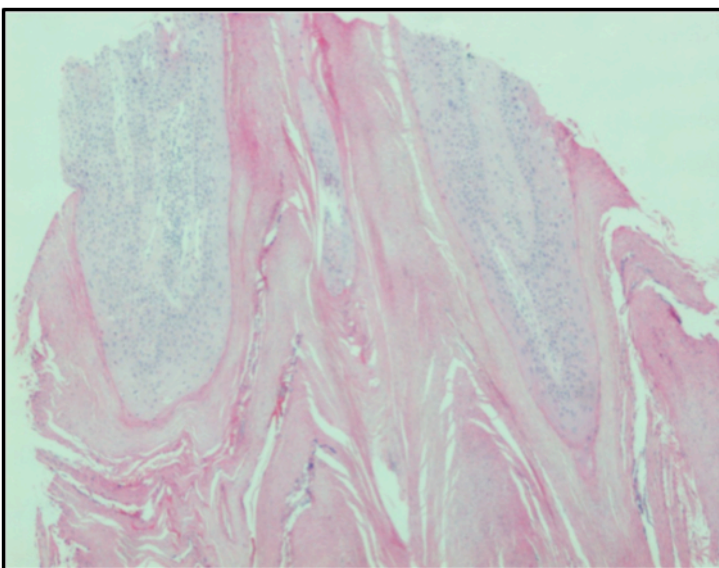
Bowen's disease of the nail unit is a rare disorder. An association with high-risk genital human papillomavirus (HPV) infection has, however, been described.

We report the case of a 54-year-old immunocompetent woman with a medical history of cervical squamous cell carcinoma (SCC), who suffered from multiple Bowen's diseases on her fingers. A search for HPV genome in the cervical and digital lesions revealed the presence of HPV 16 DNA.

These findings support the recommendation to perform histopathological analysis and make HPV DNA investigations in cases of persistent and/or relapsing verrucous nailbed tumours in order to identify patients with nail bed SCC and at risk of develop SCC in other nail beds and probably in other locations, such as the genital region.

## Case Report

A 54-year-old right-handed woman presented a few month history of progressive right thumbnail dystrophy. She had an asymptomatic hyperkeratotic plaque under her nail which had caused onycholysis and had extended to the nail folds. No other digits were involved and no signs of lymphadenopathy were detected. The lesion had been biopsied twice and diagnosed as a viral wart. There was no previous history of trauma or exposure to arsenic. The past medical history included ischemic heart disease, arterial hypertension, diabetes mellitus, and a hysterectomy thirteen years earlier because of a disease whose diagnosis the patient did not remember. A complete excision of the finger lesion was performed. The histopathological analysis showed a papillomatous and a highly hyperkeratotic lesion, with an epithelial architectural disorder, numerous dyskeratotic keratinocytes and large atypical cells with large nuclei in the upper layers of the epidermis (Fig. 1). No signs of koilocytosis or any other histopathological changes associated with HPV infection were observed. A diagnosis of digital Bowen disease was made.



**Figure 1:** Papillomatous and highly hyperkeratotic lesion, with epithelial architectural disorder, numerous dyskeratotic keratinocytes and atypical cells in the upper layers of the epidermis (x100, H-E)

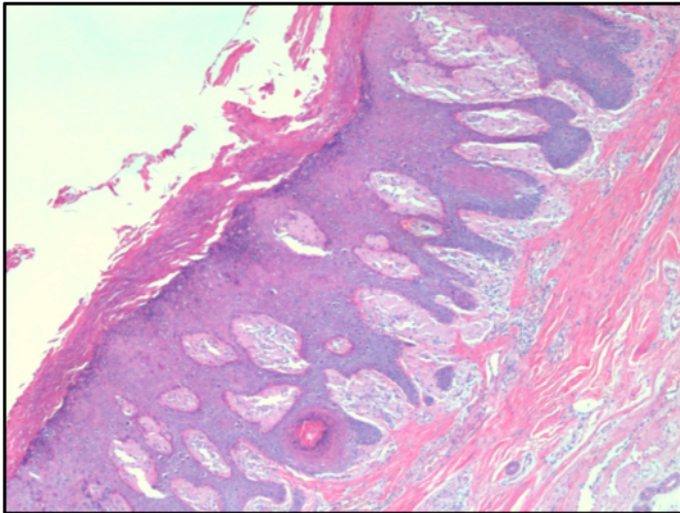
Two years later, the patient had a relapse affecting the same site (Fig. 2) which was also removed. At the same time, an HPV genotyping study of the original and relapsing lesions was performed that involved a polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. The lesions tested positivity for HPV 16 in both samples.

**Figure 2:** Relapse of a hyperkeratotic plaque in the nail bed two years after surgery



With these results, we consulted the pathological archives held by our institution and concluded that a cervical intraepithelial neoplasia was responsible for the hysterectomy that the patient had undergone thirteen years earlier.

Some months later, the patient presented a new lesion on the third finger of her left hand which exhibited the same clinical and histopathological features (Fig. 3) that are diagnostic of digital Bowen disease. On this occasion, the genotyping study was positive for HPV 16 and 6.



**Figure 3:** Papillomatous and hyperkeratotic lesion with atypical cells on the third finger of the left hand (x100, H-E)

## Discussion

Bowen's disease is an in situ SCC which is often found on areas of the skin that have been exposed to the sun. Most lesions, however, occur without any apparent cause.

When this tumour appears either at the nail bed or in periungual zone, it is often misdiagnosed as onychomycosis, a vulgar wart, nail dystrophy, paronychia, or pyogenic granuloma. In this specific location, pathogenesis has been related with ultraviolet radiation, other types of ionizing radiation, exposure to hydrocarbons, arsenic intake, and HPV infection<sup>1,5,7</sup>. Immunosuppression also plays an important role in the pathogenesis of Bowen's disease<sup>7,9</sup>.



Members of the *papovaviridae* family (which include HPV) infect the basal epithelial cells and exert cytopathic effects through their replication and alterations in the biology of epithelial progenitor cells<sup>2</sup> due to the expression of E6 and E7 genes<sup>3,4</sup>. It is well known that HPV are closely involved in the development of uterine cervical cancer. 118 HPV genotypes have been fully described and divided into groups according to their tissue tropism and oncogenic potential. This has permitted the classification of HPV into categories based on the anatomical site of the infection (cutaneous, mucosal or both) and its oncogenic potential (high or low)<sup>10</sup>. The high-risk group consists of HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 and 58, which are often detected in intraepithelial neoplasias and/or cases of invasive cancer. The low-risk group includes HPV types 6, 11, 42, 43 and 44, which are frequently found in benign neoplasms<sup>1</sup>.

The predominant HPV type identified in periungueal Bowen disease is HPV 16<sup>8,10,11,12</sup>. Alam *et al*<sup>8</sup> showed that HPV 16 was found in 89% of SCC of the nail bed in his personal studies and in 94% of cases of the reviewed literature. The most frequently detected of the remaining HPV types were 31 or 35<sup>8</sup>. The most common locations for tumours were: the index (42%) or middle (29%) finger, with the right hand being more affected than the left<sup>8</sup>.

Forslund *et al* recently reported that patients diagnosed with genital dysplasia and Bowen's disease of the fingers harboured the same HPV-16 strain in both lesions; this provided strong evidence for autoinoculation<sup>6</sup>. However, the development of SCC on the fingers in patients with histories of cervical

dysplasia seems to be extremely rare; it was seen in only 0.01% of the patients in Forslund's series (15 of 130,605 cases).

In summary, in this paper, we report a clinical case of a woman who developed two cases of Bowen's disease of the nail unit on two different fingers, one of which relapsed. *In situ* hybridization identified HPV 16 in both tumours. This genotype had also been found in an *in situ* cervical SCC that had been removed 13 years earlier. This led us to suspect possible viral transmission from the genital region to the fingers. To confirm this hypothesis, it would be necessary to perform other tests involving molecular techniques. These would have to include a polymerase chain reaction (PCR) to ensure that the HPV 16 isolated in both samples was the same.

Our findings, which were also supported by other studies<sup>6,8,10</sup>, lead us to recommend HPV investigation in all cases of SCC of the fingers and to recommend referring female patients to gynaecologist in order to rule out the possible presence of occult gynaecological malignancies.

## References

1. Shimizu A, Tamura A, Abe M, Moteji S, Nagai Y, Ishikawa O, *et al.* Detection of human papillomavirus type 56 in Bowen's disease involving the nail matrix. *Br J Dermatol.* 2008; 158:1273-9.
2. Guldbakke KK, Brodsky J, Liang M, Schanbacher CF. Human papillomavirus type 73 in primary and recurrent periungual squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg.* 2008; 34:407-13.
3. Majewski S, Jablonska S. Current views on the role of human papillomaviruses in cutaneous oncogenesis. *Int J Dermatol.* 2006; 45:192-6.
4. Majewski S, Jablonska S. Do epidermodysplasia verruciformis human papillomaviruses contribute to malignant and benign epidermal proliferations? *Arch Dermatol.* 2002; 138:649-54.
5. Pfister H, Ter Schegget J. Role of HPV in cutaneous premalignant and malignant tumors. *Clin Dermatol.* 1997; 15:335-47.
6. Forslund O, Nordin P, Hansson BG. Mucosal human papillomavirus types in squamous cell carcinomas of the uterine cervix and subsequently on fingers. *Br J Dermatol.* 2000; 142:1148-53.

7. Handisurya A, Rieger A, Bankier A, Koller A, Salat A, Stingl G, *et al.* Human papillomavirus type 26 infection causing multiple invasive squamous cell carcinomas of the fingernails in an AIDS patient under highly active antiretroviral therapy. *Br J Dermatol.* 2007; 157:788-94.
8. Alam M, Caldwell JB, Eliezri YD. Human papillomavirus-associated digital squamous cell carcinoma: literature review and report of 21 new cases. *J Am Acad Dermatol.* 2003; 48:385-93.
9. Mackintosh LJ, de Koning MN, Quint WG, Ter Schegget J, Morgan IM, Herd RM, *et al.* Presence of beta human papillomaviruses in nonmelanoma skin cancer from organ transplant recipients and immunocompetent patients in the West of Scotland. *Br J Dermatol.* 2009; 161:56-62.
10. McCown H, Thiers B, Cook J, Acker S. Global nail dystrophy associated with human papillomavirus type 57 infection. *Br J Dermatol.* 1999; 141:731-5.
11. Sau P, McMarlin SL, Sperling LC, Katz R. Bowen's disease of the nail bed and periungual area. A clinicopathologic analysis of seven cases. *Arch Dermatol.* 1994; 130:204-9.
12. Mitsuishi T, Sata T, Matsukura T, Iwasaki T, Kawashima M. The presence of mucosal human papillomavirus in Bowen's disease of the hands. *Cancer.* 1997;79:1911-7.

**SQUAMOUS CELL CARCINOMA DEVELOPING IN JADASSOHN'S  
SEBACEOUS NEVUS: A CASE REPORT AND REVIEW OF THE  
LITERATURE.**

**Abstract**

Nevus sebaceous is a congenital skin hamartoma, usually located on the head. During childhood, the lesion does not change, but, during puberty, becomes thicker and verrucous. During adult life, several benign and malignant neoplasms may develop. The most frequent malignant tumor is basal cell carcinoma which estimate incidence in nevus sebaceous is <2%. Other malignant tumors, such as squamous cell or adnexal carcinomas, are very uncommon but have been described in adults and even extremely rarely in children. We are reporting herein an unusual case of squamous cell carcinoma arising on a Jadassohn's sebaceous nevus in a 41 year old man. A review of the literature describing the presenting and evolutive clinical features of similar aggressive cases and the current guides for nevus sebaceous management is included. In summary, clinical behaviour of nevus sebaceous is currently considered as almost always benign in childhood and rarely malignant in adults, exceptionally aggressive. For that reason, surgical excision of Jadassohn's nevus at any age is more an aesthetic than a preventive treatment. Final decision must be taken on a case-by-case manner after considering advantages and disadvantages such as true perspectives of aesthetic improvement or morbidity of the excision itself, especially at paediatric age. Patients must be always informed about the rare possibility of malignant

transformation in order to early consult, diagnose and treat aggressive malignant tumors, as in the present case.

## **Introduction**

Nevus sebaceous (or Jadassohn's sebaceous nevus or organoid nevus) is a well known congenital skin hamartoma, involving ectoderm and mesoderm derived structures, which usually appears in the head and face area. During childhood, the lesion remains static, but, during puberty, grows and becomes more evident and verrucous. These changes revealed growth of pilosebaceous and apocrine elements probably due to the influence of androgens<sup>1,2</sup>.

Depending on location and size, nevus sebaceous causes only aesthetic problems. However, during adult life, several benign and malignant neoplasms may develop in around 15% of cases<sup>3</sup>. Among malignant tumors, the most common is basal cell carcinoma which estimate incidence in nevus sebaceous is less than 2%. Other malignant tumors are extremely rare<sup>4</sup>. To our knowledge, a total of only 12 squamous cell and 8 adnexal carcinomas have been described<sup>10,11,15-17,20-25</sup>.

We are reporting an unusual case of squamous cell carcinoma which appeared on a Jadassohn's sebaceous nevus in a 41 year old man. Its clinical and evolutive features are compared with those of previously published cases.

### Case report

In December 2002, a 41 year old man sought medical advice for a three month history of growing nodule on a congenital lesion of his face. Clinical examination revealed, on the inferior portion of his left cheek, a pink-yellowish verrucous plaque, 2 x 0.8 cm in size, with a centrally ulcerated and crusted eritematous nodule, 1 x 0.8 cm in size, arising on the external end of the plaque (figure 1). Enlarged regional lymph nodes were not detected. The patient had no history of cutaneous cancer, immunosuppression nor local trauma.

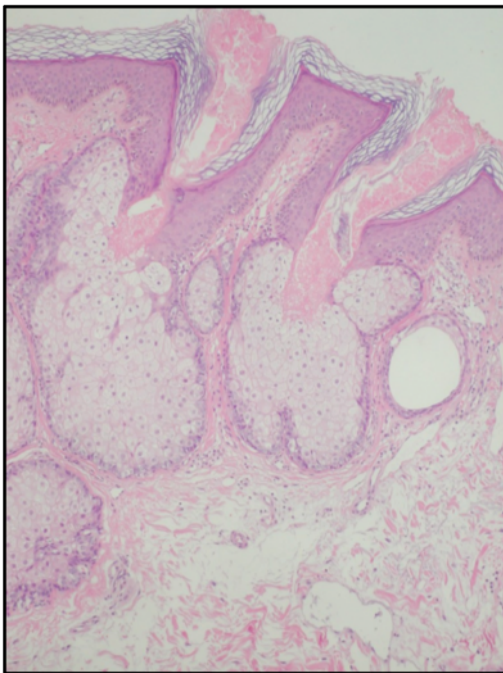


**Figure 1.** Clinical appearance of the lesion.

The lesion was completely excised with wide margins. Histopathological examination showed the presence of increased number of mature sebaceous glands and papillomatous hyperplasia of the epidermis (figure 2). A squamous cell carcinoma developed within the nevus sebaceous. The squamous carcinoma cells invaded the upper dermis without desmoplasia. There was a moderate infiltrate of lymphocytes between the carcinomatous cells (figures 3

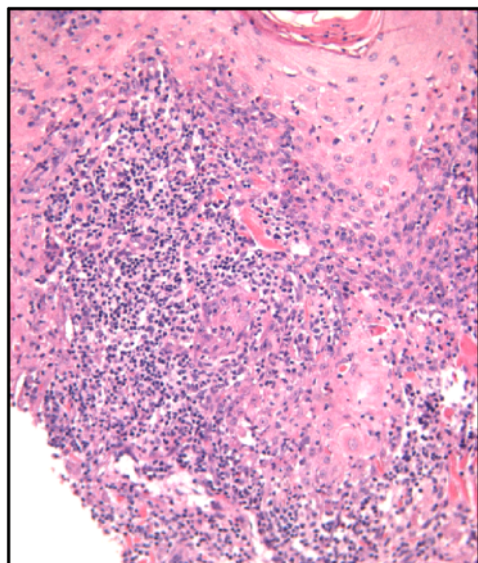
and 4). The lesion also showed mature apocrine glands located in the lower dermis.

The patient remains well, without clinical evidence of recurrence, after more than eight years of follow-up.

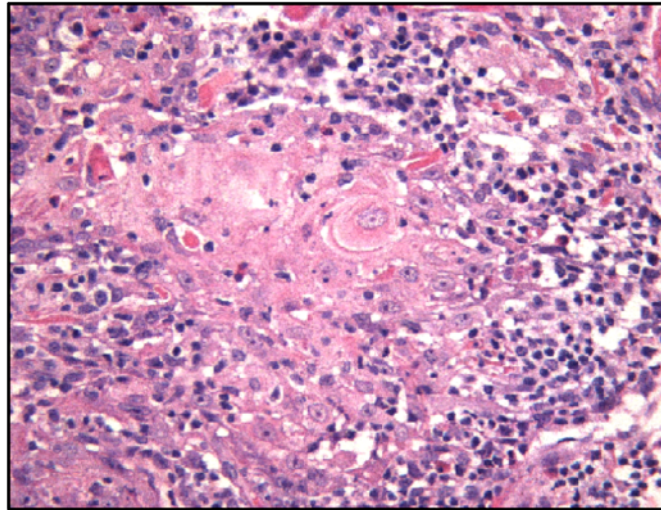


**Figure 2.** Hyperkeratosis and papillomatosis are present. Numerous sebaceous glands lie in the upper dermis (100X, H-E).

**Figure 3.** Squamous carcinoma cells infiltrating the upper dermis. A moderate infiltrate of lymphocytes surrounds the tumour nests (250X, H-E).







**Figure 4.** A close view of a nest of infiltrating tumor cells (400X, H-E).

## Discussion

Jadassohn's sebaceous nevus is an hamartomatous skin malformation present in 0.3% of newborns<sup>5</sup>. This tumor belongs to the group of the also called organoid nevi, that are congenital lesions derived from embryonic primary epithelial germ cells. Those cells differentiate generating localised epidermal hyperplasia and an excess of immature sebaceous structures and apocrine glands<sup>27</sup>. It is, in general, a solitary lesion situated on the head, usually on the scalp causing alopecia, or on the face. Clinically it appears as a pink-orange yellowish, linear or oval, slightly elevated plaque, of several cm in size, with a waxy aspect and soft velvety surface. During puberty, the lesion becomes thicker and verrucous. Histopathological characteristics of nevus sebaceous are epithelial hyperplasia and papillomatosis, ectopic apocrine glands and mature hypoplastic and/or very superficially located sebaceous glands. Apocrine and sebaceous changes appear at puberty<sup>1,2,4</sup>.

The most frequent complication of nevus sebaceous is the development of secondary benign and malignant epithelial neoplasms. As all published data are based in retrospective studies, it is difficult to establish the true global incidence of this event. In a large series of 596 cases recently reported by Cribier et al<sup>3</sup>, the global incidence of tumors arising on Jadassohn's nevus was 14.4%. Most of them were benign neoplasms (13.6%), whereas only 0.8% of patients developed a malignant tumor, all of them basal cell carcinomas. More recently, an incidence of just 0.8% microscopic intralesional basal cell carcinomas has been described in a series of 631 paediatric patients (age range 9.7–17.4 yrs) that underwent surgical excision even without obvious clinical change in the lesion<sup>31</sup>. It is impossible to know how many of those microscopic tumors will turn into clinically relevant basal cell carcinoma in adulthood. Other previous paediatric series did not report any case of basal cell carcinoma in<sup>3,19</sup>. In summary, the rate of basal cell carcinomas in the abovementioned recent series, published in the last 10 years, was much lower than the rate described in old studies. Indeed, the incidence of basal cell carcinoma on nevus sebaceous in the series published between 1962 and 1985 reached 6 to 50%<sup>6-11</sup>. Currently, however, most of these basaloid tumors are considered trichoblastomas<sup>12</sup>. Thus, the rate of true basal cell carcinoma developing on Jadassohn's nevus seems to be quite lower than previously thought, probably <2%<sup>31</sup>.

The most common type of benign neoplasms on sebaceous nevus is syringocystadenoma papilliferum, followed by trichoblastoma (previously misdiagnosed as basal cell carcinoma). Other types of benign neoplasms are

trichilemmomas, sebaceomas, keratoacanthomas, seborreic keratosis, syringomas, follicular poromas, nodular hidradenomas, apocrine cystadenomas, etc; even, non epithelial proliferations such as melanocytic nevi<sup>3,4,11-14</sup>.

Other malignant tumors than basal cell carcinoma, such as squamous cell or adnexal carcinomas, are extremely uncommon. As far as we know, only twenty cases have been reported besides our case. Nine of them have been published as case reports. Two were adnexal carcinomas<sup>21,22</sup>, and seven were squamous cell carcinomas<sup>15,16,20,23-25</sup> (table 1). The remainder cases were included in three retrospective series<sup>10,11,17</sup>. Other old references to possible squamous cell carcinomas on sebaceous nevus are not well documented or not convincing because of their clinical and histopathological features<sup>11</sup>. Two of the series described a single case of squamous cell carcinoma in a total group of 140 and 181 cases of Jadassohn's nevus, respectively<sup>10,11</sup> (table 1). We only found a large series of nine aggressive carcinomas on sebaceous nevus obtained from the review of 997 cases of the AFIP files<sup>17</sup>. Seven were classified as adnexal carcinomas and two as squamous cell carcinomas (table 1). Other series mentioned in the present manuscript<sup>1,3,13,14,18</sup> do not describe any case of squamous cell or adnexal carcinoma. From all the aggressive tumors reported, most initiated during adulthood (median 55 years old, range 35-77 years old) but three were seen in children (11 and 15 years old)<sup>20,25</sup>, two of them in the same patient<sup>25</sup>. Four of them were coincidental with the development of other benign and/or malignant neoplasms<sup>12,21-23</sup>. In six patients (30%) lymph node or visceral metastasis were reported<sup>15,17,22,23</sup>. All tumours that gave rise to

metastatic disease were larger than 2 cm. Metastasis was not described in any of both paediatric patients<sup>20,25</sup> (table 1).

Because of the possibility of development of malignant neoplasms, early excision of the lesion in childhood has been recommended for years<sup>5,14</sup>. However, in the last two decades, several authors introduced a change in this conception<sup>18</sup> because malignant tumors are only very rarely observed in children<sup>3,4,19,26</sup>. Moreover, as already mentioned, true malignant tumors are less common than previously thought, even in adulthood<sup>3,19</sup> and, if they developed, the vast majority are basal cell carcinomas that pose no danger to life if properly managed.

If treatment is decided, the classical therapeutical approach of this kind of lesion is surgical excision, with a minimum 2-3 mm margins, often combined with a graft to avoid dog-ear caused by primary close. The technique depends on the affected area and the age of the patient; the aims are to use minimum operative procedures and hiding scar in the hair when the nevus sebaceous arises on the scalp. In this area, before three months of life, a large excision can be performed because of the good laxity of the scalp. Tissue expansion is an alternative to excise lesions here<sup>28</sup>. Davison et al. got well results with rotation flap for the temporal region in adults<sup>29</sup>. Transposition or island flaps are also valid procedures for the temple zone, facilitated by the excellent blood supply of the superficial temporal artery system. Mohs surgery is another technique that can be used, but only one case has been reported<sup>30</sup>.

Ablation with CO<sub>2</sub> or erbium lasers can improve inoperable lesions<sup>32</sup> but scarring or pigmentary changes often result. Jadassohn's nevus can also respond to topical photodynamic therapy<sup>33</sup>. Beer et al. mention dermabrasion as other technique to use<sup>34</sup>. Medical literature lacks information about the results of other methods, probably employed in medical practice, like dermabrasion, cryosurgery or other resurfacing options. The main goal of these methods seems to eliminate the superficial component of the nevus to improve the cosmetic appearance of unsightly lesions. However, in our opinion, it is not known if these techniques avoid the possibility of malignant transformation of the remaining deep structures and, in case of nevus located on the scalp, they do not solve alopecia.

We support that, as a rule, Jadassohn's sebaceous nevus has to be regarded as a benign lesion that only sometimes suffers a malignant transformation, usually in adulthood and as a basal cell carcinoma. Only rarely, an aggressive tumor, such as a squamous cell or an adnexal carcinoma, may develop; even as an extremely rare exception during childhood (only 20 cases described, plus our case, three in children). For these reasons, surgical excision of nevus sebaceous is more an aesthetic issue than and a preventive treatment. When parents or the own patient ask for medical advice, they should know how exceptional are true lifethreatening tumors arising in sebaceous nevus. Aesthetic concern or anxiety due to cancerophobia must be weighed against the morbidity of the excision itself (bleeding, infection, scarring, general anesthesia) especially if surgical excision is considered at paediatric age. Obviously, if the hamartoma is not finally excised, patients must be properly informed about the

rare possibility of malignant transformation, in order to rapidly consult clinical changes and early diagnose and treat eventual aggressive malignant tumors, as in the case presented.

## Annex 2: SCC and Jadassohn's sebaceous nevus

**Table 1.** Clinical features of reported malignant tumours other than basal cell carcinoma arising of Jadassohn's nevus sebaceous

Type of tumor	Age	Sex	Size (cm)	Other simultaneous tumors	Metastases	Reference
Squamous cell carcinoma	55	Male	Not known	No	Lymph node	15
Squamous cell carcinoma	56	Female	Not known	No	No	11
Squamous cell carcinoma	68	Male	1.2	No	No	10
Adnexal carcinoma (apocrine)	77	Male	2 x 1.2	No	Lymph node (cervical)	17
Adnexal carcinoma (apocrine)	63	Female	1.5	No	No	
Adnexal carcinoma (apocrine)	68	Female	0.7	No	No	
Adnexal carcinoma (apocrine)	65	Male	7	No	Lymph node (cervical) and bone	
Adnexal carcinoma	50	Male	4	No	No	
Adnexal carcinoma	63	Male	1.5	No	No	
Adnexal carcinoma	75	Male	4 x 3	No	No	
Squamous cell carcinoma	42	Male	3	No	Lymph node, parotid, subcutaneous, lung	
Anaplastic squamous cell carcinoma	68	Male	7 x 5	No	No	
Squamous cell carcinoma	15	Female	6 x 3	No	No	
Adnexal carcinoma (sebaceous)	45	Female	7 x 4.5	- Basal cell carcinoma - Trichoblastoma - Trichoadenoma - Syringocystadenoma papilliferum	Not known	21
Squamous cell carcinoma	35	Male	3 x 1	- Basal cell carcinoma	No	16
Adnexal carcinoma (adenocarcinoma)	66	Female	Not Known	- Trichoblastoma - Syringofibroadenoma - sebaceous epithelioma	Lymph node (cervical)	22
Squamous cell carcinoma	55	Male	5 x 4	- Basal cell carcinoma	Lymph node (cervical)	23
Squamous cell carcinoma	41	Female	1.5 x 1.3	No	No	24
Two squamous cell carcinomas	11	Female	3 x 2	No	No	25
Squamous cell carcinoma	41	Male	1 x 0.8	No	No	Our case

## References

1. Serpas de López RME, Hernández-Pérez E. Jadassohn's sebaceous nevus. *J Dermatol Surg Oncol* 11: 68-72, 1985.
2. Alessi E, Sala F. Nevus sebaceous. A clinicopathologic study of its evolution. *Am J Dermatopathol* 8: 27-31, 1986.
3. Cribier B, Scrivener Y, Grosshans E. Tumors arising in nevus sebaceous: a study of 596 cases. *J Am Acad Dermatol* 42: 263-268, 2000.
4. Bourrat E, Rybojad M. Hamartome sébacé. *Ann Dermatol Venerol* 130: 1068-1071, 2003.
5. Stavrianeas NG, Katoulis AC, Stratigeas NP, et al. Development of multiple tumors in a sebaceous nevus of Jadassohn. *Dermatology* 195: 155-158, 1997.
6. Castelain PY, Spitalier JM. Epithelioma basocellulaire pigmenté sur naevus sebaceous de Jadassohn, chez un enfant de 13 ans. *Bull Soc Fr Derm Syph* 69: 436-437, 1962.



7. Michalovski R. Naevus sebacé de Jadassohn: un état précancéreux. *Dermatologica* 124: 326-332, 1962.

8. Mehregan AH, Pinkus H. Life history of organoid nevi. *Arch Dermatol* 91: 574-588, 1965.

9. Morioka S. The natural history of nevus sebaceous. *J Cutan Pathol* 12: 200-213, 1985.

10. Smolin Th, Hundeiker M. Prickle-cell and basal cell carcinoma in nevus sebaceous. *Z Hautkr* 61: 267-282, 1985.

11. Jones EW, Heyl T. Naevus sebaceus. A report of 140 cases with special regard to the development of secondary malignant tumours. *Br J Dermatol*. 1970 Feb;82:99-117.

12. Steffen C, Ackerman AB. Neoplasms with sebaceous differentiation. Lea & Febiger, Philadelphia: 89-144, 1994.

13. Bonvalet D, Barrandon Y, Foix Ch, Civatte J. Tumeurs annexielles bénignes de survenue tardive sur naevus verruco-sébacé (Jadassohn). A propos de 7 cas. *Ann Dermatol Venereol* 110: 337-342, 1983.

14. Weng Ch, Tsai Y, Chen T. Jadassohn's nevus sebaceous of the head and face. *Ann Plast Surg* 25: 100-102, 1990.

15. Schirren CG, Pfirsttinger H. Zur Entwicklung von Plattenepithelcarcinomen auf dem Boden des Naevus sebaceous (Jadassohn). *Hautartz* 14: 397-401, 1963.

16. Ball EAM, Hussain M, Moss ALH. Squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma arising in a naevus sebaceous of Jadassohn: case report and literature review. *Clin Exp Dermatol* 30: 259-260, 2005.

17. Domingo J, Helwig EB. Malignant neoplasms associated with nevus sebaceous of Jadassohn. *J Am Acad Dermatol* 1: 546-556, 1979.

18. Chun K, Vazquez M, Sanchez JL. Nevus sebaceus: clinical outcome and considerations for prophylactic excision. *Int J Dermatol*, 34: 538-541, 1995.

19. Santibanez-Gallerani A, Marshall D, Duarte A-M, et al. Should nevus sebaceous of Jadassohn in children be excised? A study of 757 cases, and literature review. *J Craniofac Surg* 14: 658-660, 2003.

20. Hidvegi NC, Kangesu L, Wolfe KQ. Squamous cell carcinoma complicating naevus sebaceous of Jadassohn in a child. *Br J Plast Surg*. 2003 Jan;56:50-2.

21. Miller CJ, Ioffreda MD, Billingsley EM. Sebaceous carcinoma, basal cell carcinoma, trichoadenoma, trichoblastoma, and syringocystadenoma papilliferum arising within a nevus sebaceus. *Dermatol Surg*. 2004 Dec;30:1546-9.

22. Kantrow SM, Ivan D, Williams MD, et al. Metastasizing adenocarcinoma and multiple neoplastic proliferations arising in a nevus sebaceus. *Am J Dermatopathol*. 2007 Oct;29:462-6.

23. Arshad AR, Azman WS, Kreetharan A. Solitary sebaceous nevus of Jadassohn complicated by squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *Head Neck*. 2008 Apr;30:544-8.

24. Duncan A, Wilson N, Leonard N. Squamous cell carcinoma developing in a naevus sebaceous of Jadassohn. *Am J Dermatopathol*. 2008 Jun;30:269-70.

25. Belhadjali H, Moussa A, Yahia S, et al. Simultaneous occurrence of two squamous cell carcinomas within a nevus sebaceous of Jadassohn in an 11-year-old girl. *Pediatr Dermatol*. 2009 Mar-Apr;26:236-7.

26. Turner CD, Shea CR, Rosoff PM. Basal cell carcinoma originating from a nevus sebaceus on the scalp of a 7-year-old boy. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2001 May;23:247-9.

27. Serpas de López RM, Hernández-Pérez E. Jadassohn's sebaceous nevus. *J Dermatol Surg Oncol*. 1985 Jan;11:68-72.

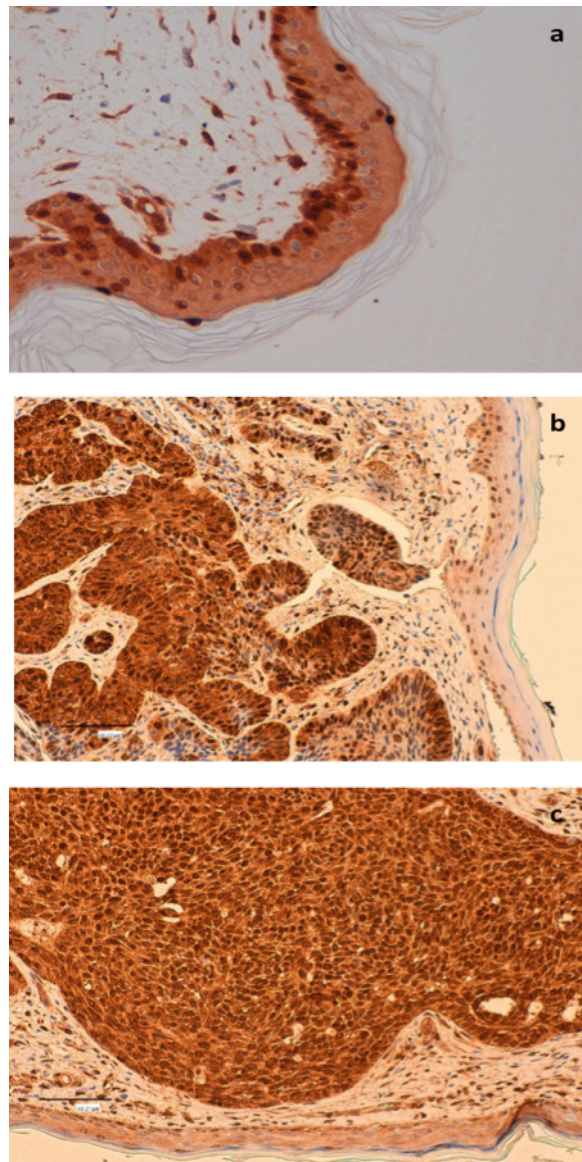
28. Picard A, Franchi G, Delbecque M, et al. Scalp surgery in children: principles and therapeutic aspects. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 2005 Dec;106:334-43.

29. Davison SP, Khachemoune A, Yu D, Kauffman LC. Nevus sebaceus of Jadassohn revisited with reconstruction options. *Int J Dermatol*. 2005 Feb;44:145-50.

30. Lane JE, Goodrich RG, Kent DE, et al. Use of Mohs micrographic surgery to treat basal cell carcinoma arising in a nevus sebaceous in an African American patient. *J Cutan Med Surg*. 2007 Jul-Aug;11:158-60.

31. Rosen H, Schmidt B, Lam HP, et al. Management of Nevus Sebaceous and the Risk of Basal Cell Carcinoma: An 18-Year Review. *Pediatr Dermatol.* 2009 Jul 20.
32. Ashinoff R. Linear nevus sebaceus of Jadassohn treated with the carbon dioxide laser. *Pediatr Dermatol.* 1993 Jun;10:189-91.
33. Thomas VD, Swanson NA, Lee KK. Benign epithelial tumors, hamartomas, and hyperplasias. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine.* Seventh edition. McGraw-Hill Companies, Inc. 2008. pages 1054-1068.
34. Beer GM, Widder W, Cierpka K, et al. Malignant tumors associated with nevus sebaceous: therapeutic consequences. *Aesthetic Plast Surg.* 1999 May-Jun;23:224-7.

# APÈNDIX



**Figura 14:** Immunohistoquímica per Yap1. (a): A l'epidermis normal, la proteïna es troba al nucli de les cèl·lules de la capa basal, l'única amb capacitat proliferativa, perdent llur expressió als estrats superiors. Imatge 40x. (b) i (c): Les imatges de dos carcinomes basocel·lulars diferents mostren acumulació de Yap1 al citoplasma i al nucli de pràcticament la totalitat de les cèl·lules basaloides, indicant que podria desenvolupar un paper important en la formació i proliferació tumoral, similar al de  $\beta$ -catenina. Les barres equivalen a 40  $\mu$ m.