

Potencial implicancia terapéutica de la expresión desregulada de YAP en los carcinomas de células escamosas cutáneos caninos

Sanz Ressel BL^{1,2,*}, **Massone AR**³, **Barbeito CG**^{1,2}

¹Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada (LHYEDEC), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

²Facultad de Ciencias Veterinarias, CONICET, UNLP, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

³Laboratorio de Patología Especial Veterinaria Dr. Bernardo Epstein, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

***Autor de contacto:**

Sanz Ressel Berenice Liyare, Doctora en Ciencias Veterinarias, Medica Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, 60 y 118 s/n, CP 1900, La Plata, Buenos Aires, Argentina. Tel.:+54 221 4236663. E-mail: lsanzressel@fcv.unlp.edu.ar

Resumen

El carcinoma de células escamosas cutáneo (CCEC) es uno de los tumores malignos más frecuentes de la piel de los caninos. El estudio de las moléculas de señalización desreguladas durante el proceso de carcinogénesis epidérmica puede ayudar a identificar objetivos moleculares adecuados para el desarrollo de nuevas terapias para pacientes caninos. La evidencia reciente sugiere que la expresión desregulada de YAP, el principal efector de la vía de señalización Hippo, está involucrada en el desarrollo y la progresión de los CCEC en humanos. En el presente estudio se describe el patrón de expresión inmunohistoquímico de YAP en muestras caninas de epidermis normal (n=15), epidermis preneoplásica (n=10) y CCEC (n=140), utilizando micromatrices de tejidos. Los resultados demuestran que YAP tiene una expresión baja en la epidermis canina normal, mientras que su expresión aumenta durante el proceso de carcinogénesis epidérmica. Esta evidencia emergente sugiere que la activación en forma persistente de YAP puede representar uno de los eventos clave durante la progresión de los CCEC al desregular las funciones celulares en las que está implicada la vía de señalización Hippo. Estos hallazgos proporcionan información valiosa que señala a la proteína YAP como un potencial objetivo terapéutico.

Introducción y objetivos:

El carcinoma de células escamosas cutáneo (CCEC) es uno de los tumores malignos más frecuentes de la piel de los caninos^{1,2}. El estudio de las moléculas de señalización desreguladas durante el proceso de carcinogénesis epidérmica puede ayudar a identificar objetivos moleculares adecuados para el desarrollo de nuevas terapias para pacientes caninos. La evidencia reciente sugiere que la expresión desregulada de YAP, el principal efector de la vía de señalización Hippo, está involucrada en el desarrollo y la progresión de los CCEC en humanos^{3,4}. Por otra parte, para realizar un aporte de relevancia clínica en oncología es necesario que las moléculas sean evaluadas en un gran número de muestras tumorales de diferentes pacientes en condiciones idénticas y estandarizadas, para lo cual puede utilizarse la técnica de micromatrices de tejidos incluidos en parafina (MMT). En el presente estudio se describe el patrón de expresión inmunohistoquímico de YAP en muestras caninas de epidermis normal (EN), epidermis preneoplásica (EP) y CCEC, utilizando MMT.

Materiales y Métodos:

Se recuperaron los bloques de tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina correspondientes a EN (n=17), EP (n=12) y CCEC (n=150) caninos de los archivos del Laboratorio de Patología Especial Veterinaria, FCV, UNLP (periodo 2006-2014). Sobre cada una de las secciones coloreadas con hematoxilina y eosina (H-E), correspondiente a cada muestra, se realizó la marcación de las áreas de tejido de interés para la posterior construcción de las MMT utilizando un marcador indeleble bajo observación microscópica. El método utilizado en la construcción de las MMT fue el descrito por Hewitt (2004)⁵, utilizando un arrayer de tejido semiautomático (TM Arrayer TM, Pathology Devices, Inc.) y un diámetro de núcleo de 1 mm. Una vez finalizadas las MMT, se obtuvieron secciones de 5 µm que fueron coloreadas con H-E para evaluar la calidad de las MMT; solo 2/17 de los núcleos de EN, 2/12 de los núcleos de EP y 10/150 de los núcleos de CCEC debieron ser excluidos análisis posteriores debido a su daño o pérdida durante el procesamiento. Posteriormente, se obtuvieron nuevas secciones de 5 µm para IHC, la cual se realizó utilizando un anticuerpo primario contra YAP (YAP, rabbit polyclonal antibody, diluido 1:200; Cell Signaling Technologies). Para el revelado se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado, el complejo de avidina-biotina y como cromógeno 3,3'-diaminobenzidina. Todas las secciones se escanearon a 40x usando el Aperio CS ScanScope (Leica Biosystems Imaging Inc.) y se cuantificaron usando los algoritmos de análisis de imágenes disponibles en el software ImageScope (Leica Biosystems Imaging Inc.). Las diferencias en la reactividad inmunohistoquímica entre los diferentes grupos se analizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis para poblaciones no gaussianas (ANOVA no paramétrico) seguida de la prueba posterior de Dunn (software Statgraphics, con un valor de P < 0,05 y una confianza del 95%).

Resultados

En la EN se observó un número bajo de células epidérmicas positivas para YAP con una expresión limitada al citoplasma de unas pocas células del estrato granuloso. En 10/10 (100%) de las muestras de EP y 114/140 (81.42%) de las muestras de CCEC se observó un elevado número de células epidérmicas positivas para YAP. La inmunotinción de YAP mostró una expresión citoplasmática y ocasionalmente nuclear localizada en los estratos de células basales y espinosas tanto en la EP como en los CCEC. Además, en los CCEC se observó que la expresión de YAP fue más notable a lo largo de los bordes invasivos de la neoplasia. En concordancia con el hecho de que YAP mostró una mayor reactividad a favor de EP y CCEC, la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en el porcentaje de células positivas para YAP entre las muestras de EN y EP (P < 0.0001), así como también entre EN y CCEC (<0.0001).

Discusión y conclusiones

Los resultados demuestran que la activación en forma persistente de YAP es un evento frecuente durante la progresión de los CCEC en caninos. En este contexto, la expresión desregulada de YAP puede representar uno de los eventos clave durante la carcinogénesis epidérmica al desregular las funciones celulares en las que está implicada la vía de señalización Hippo, similar a lo previamente informado en humanos^{3,4}. Estos hallazgos proporcionan información valiosa que señala a la proteína YAP como un potencial objetivo terapéutico, por lo que la investigación dirigida a modular esta vía de señalización para el beneficio terapéutico de los pacientes con CSCC caninos puede progresar de manera razonada⁶.

Bibliografía

1. Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. Skin Diseases of the Dog and Cat Clinical and Histopathologic Diagnosis. 2nd ed. Blackwell Science Ltd; 2005.
2. Goldschmidt MH, Goldschmidt KH. Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In: Meuten DJ, editor. Tumors in Domestic Animals [Internet]. 5th ed. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. p. 88–141.

3. Jia J, Li C, Luo S, Liu-Smith F, Yang J, Wang X, et al. Yes-Associated Protein Contributes to the Development of Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma via Activation of RAS. *J Invest Dermatol.* 2016;136(6):1267–77.
4. 14. Zhang H, Pasolli HA, Fuchs E. Yes-associated protein (YAP) transcriptional coactivator functions in balancing growth and differentiation in skin. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(6):2270–5.
5. Hewitt SM. Design, construction, and use of tissue microarrays. In: *Methods in Molecular Biology.* New Jersey: Humana Press; 2004. p. 61–72.
6. Santucci M, Vignudelli T, Ferrari S, Mor M, Scalvini L, Bolognesi ML, et al. The Hippo Pathway and YAP/TAZ-TEAD Protein-Protein Interaction as Targets for Regenerative Medicine and Cancer Treatment. *J Med Chem.* 2015;58(12):4857–73.