



Universitat de Lleida

# Estudio genético y análisis del microambiente tumoral del melanoma lentiginoso acral. Identificación de biomarcadores de aplicación clínica

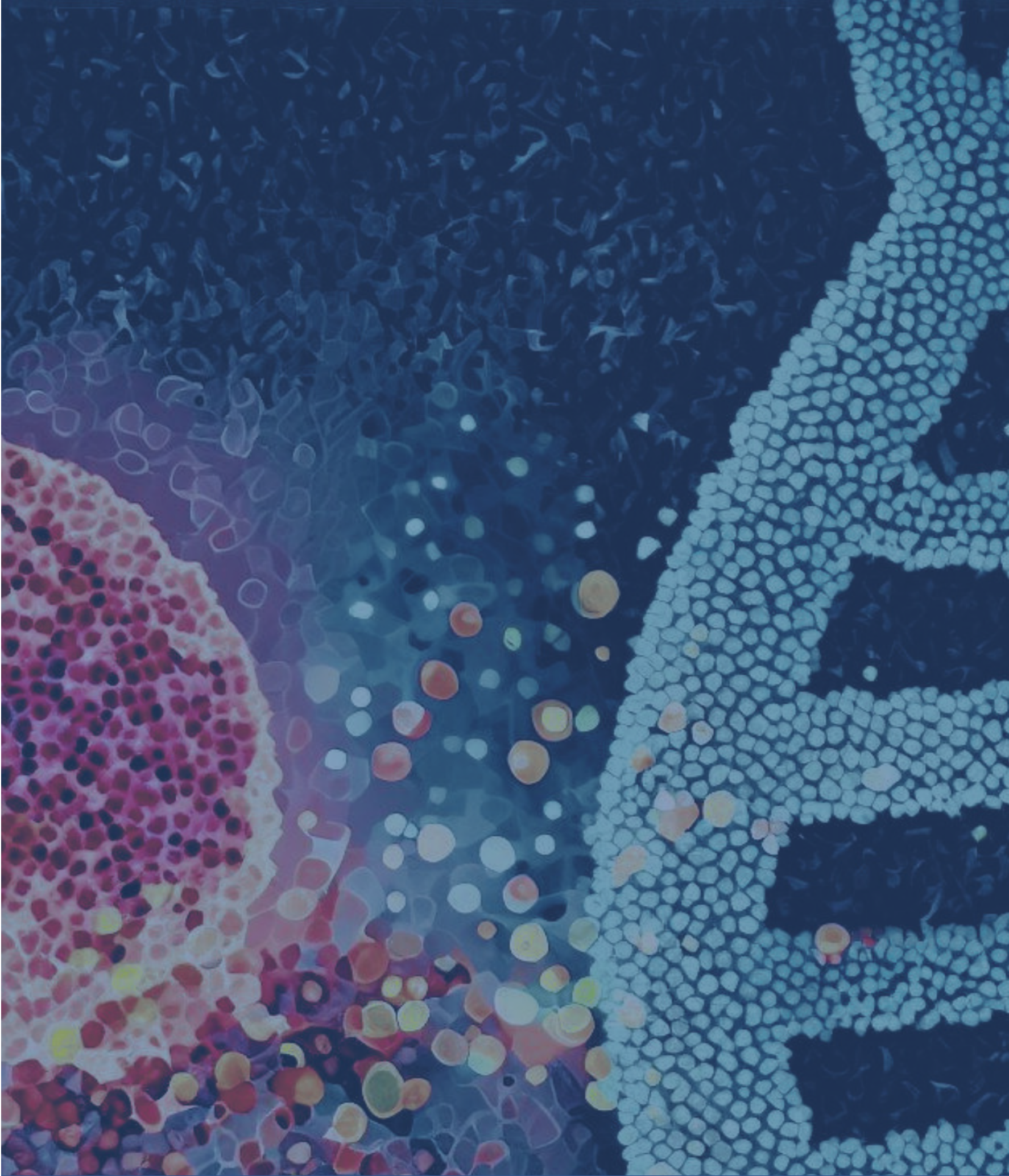
Inés de la Rosa Zurera

<http://hdl.handle.net/10803/689197>

**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.

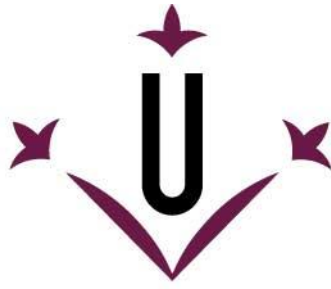


ESTUDIO GENÉTICO Y ANÁLISIS DEL MICROAMBIENTE TUMORAL DEL MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL.  
IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE APLICACIÓN CLÍNICA

TESIS DOCTORAL | 2023

ESTUDIO GENÉTICO Y ANÁLISIS DEL  
MICROAMBIENTE TUMORAL DEL MELANOMA  
LENTIGINOSO ACRAL.  
IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE  
APLICACIÓN CLÍNICA

INÉS DE LA ROSA ZURERA



**Universitat de Lleida**

## **TESIS DOCTORAL**

# **Estudio genético y análisis del microambiente tumoral del melanoma lentiginoso acral. Identificación de biomarcadores de aplicación clínica.**

Inés de la Rosa Zurera

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universitat de  
Lleida

Programa de Doctorado en Salud

Director/a

Dra. Rosa Maria Martí Laborda

Dra. Anna Macià Armengol

Tutor/a

Dra. Anna Macià Armengol

2023



---

**RESUMEN. RESUM.  
ABSTRACT**

---



## RESUMEN

---

El melanoma lentiginoso acral (MLA) es una variante poco común dentro de los melanomas cutáneos (MCs), que se diagnostica en zonas acrales, concretamente en las palmas de las manos, las plantas de los pies y las uñas. Este tumor se asocia a mal pronóstico por su diagnóstico en estadios avanzados, y su escasa respuesta a los tratamientos actuales. Además, de presentar una etiología independiente de la exposición solar, esta variante de MC tiene un perfil genético característico respecto al resto, ya que se caracteriza por presentar un alto número de variaciones en el número de copias (*Copy number variations*, CNVs), y un número reducido de mutaciones puntuales, a diferencia de la mayoría de MCs. Sus particularidades y su baja incidencia, lo han llevado a ser un tumor poco estudiado, con una etiopatogenia y biología, en gran medida, desconocidas. Por ello, son necesarios más estudios para comprender mejor su patogénesis, identificar biomarcadores y desarrollar terapias específicas y personalizadas más efectivas que las actuales. Estudios recientes en oncología han consensuado que el microambiente tumoral (TME, *Tumor Microenvironment*) tiene un papel fundamental en tumores agresivos como el MLA, promoviendo la progresión tumoral, la angiogénesis y el desarrollo de metástasis, mediante la interacción constante entre las propias células tumorales y todos los componentes del TME.

En la primera parte del presente trabajo, hemos estudiado el perfil genético del MLA mediante el análisis de las CNVs en una cohorte de pacientes, en relación a las características clinicopatológicas y al pronóstico de los mismos. Los resultados obtenidos indican que los pacientes con un elevado número de CNVs se asocian a un peor pronóstico. Asimismo, se encontró una asociación entre mal pronóstico y la presencia de amplificación en el gen *CDK4* en el tumor. Posteriormente, encontramos que la amplificación en *CDK4* se asocia con una mayor expresión del mismo, lo cual nos sirvió para generar un modelo *in vitro* de sobreexpresión de *CDK4*, mediante el que observamos un incremento en la migración, invasión y proliferación de las células con la sobreexpresión de dicha quinasa. Por otro lado, estudiamos el secretoma de las líneas celulares de MLA según su perfil genético, encontrando que las líneas con un elevado número de CNVs presentaron un perfil secretor protumoral, proangiogénico y relacionado con mayor polarización de macrófagos asociados al tumor (TAMs, *Tumor-associated macrophages*) hacia fenotipo protumoral M2. Al trasladar estos resultados *in vitro* a la cohorte de pacientes, observamos un incremento de estos macrófagos en el frente invasivo respecto al cuerpo del tumor en pacientes con elevado número de CNVs y, detectamos la quimioquina PARC incrementada en plasma de pacientes de MLA, en comparación con pacientes con MCs no acrales. En la segunda parte de este trabajo, realizamos un análisis de marcadores inmunohistoquímicos en las biopsias de pacientes de MLA con el objetivo de detectar biomarcadores de aplicación clínica, observando que los pacientes con una expresión baja de ALDH1 se asocian a un alto número de CNVs, a presencia de amplificaciones en *CDK4*, y todo ello se correlaciona con características clinicopatológicas de peor pronóstico, menor supervivencia y mayor frecuencia de recaídas. En definitiva, nuestro estudio presenta información novedosa, y de relevancia pronóstica, abriendo una puerta a tratamientos personalizados enfocados a la modulación del TME, y al uso del secretoma como herramienta diagnóstica y de monitorización del curso de la enfermedad en pacientes con MLA.





## RESUM

---

El melanoma lentiginós acral (MLA) és una variant poc comuna dins dels melanomes cutanis (MCs), que es diagnostica en zones acrals, concretament als palmells de les mans, les plantes dels peus i les ungles. Aquest tumor s'associa a un mal pronòstic pel seu diagnòstic en estadis avançats i la seva escassa resposta als tractaments actuals. A més a més, aquesta variant de MC presenta un perfil genètic característic en relació amb la resta, ja que es caracteritza per tenir un nombre elevat de variacions en el nombre de còpies (Copy number variations, CNVs) i un nombre reduït de mutacions puntuals, a diferència de la majoria de MCs. Les seves particularitats i la seva baixa incidència han fet que sigui un tumor poc estudiat, amb una etiopatogènia i biologia, en gran part, desconegudes. Per això, són necessaris més estudis per comprendre millor la seva patogènesi, identificar biomarcadors i desenvolupar teràpies específiques i personalitzades més efectives que les actuals. Estudis recents en oncologia han acordat que el microambient tumoral (TME, Tumor Microenvironment) juga un paper fonamental en tumors agressius com el MLA, promovent la progressió tumoral, l'angiogènesi i el desenvolupament de metàstasi mitjançant la interacció constant entre les pròpies cèl·lules tumorals i tots els components del TME.

En la primera part d'aquest treball, hem estudiat el perfil genètic del MLA mitjançant l'anàlisi de les CNVs en una cohort de pacients, en relació amb les característiques clinicopatològiques i el pronòstic dels mateixos. Els resultats van indicar que els pacients amb un nombre elevat de CNVs s'associen a un pitjor pronòstic. A més a més, s'ha trobat una associació entre un mal pronòstic i la presència d'amplificació en el gen *CDK4* en el tumor. Posteriorment, vam descobrir que l'amplificació en *CDK4* s'associa amb una major expressió del mateix, el que ens va servir per generar un model in vitro de sobreexpressió de *CDK4*, mitjançant el qual vam observar un increment en la migració, invasió i proliferació de les cèl·lules amb sobreexpressió d'aquesta quinasa. D'altra banda, vam decidir estudiar el secretoma de les línies cel·lulars de MLA segons el perfil genètic, trobant que les línies amb un nombre elevat de CNVs van presentar un perfil secretor protumoral, proangiogènic i relacionat amb una major polarització de macròfags associats al tumor (TAMs, Tumor-associated macrophages) cap al fenotip protumoral M2. En traslladar aquests resultats in vitro a la cohort de pacients, vam observar un augment d'aquests macròfags al front invasiu respecte al cos del tumor en pacients amb un nombre elevat de CNVs, i vam detectar un increment de la quimiocina PARC en el plasma de pacients de MLA en comparació amb pacients amb MCs no acrals.

En la segona part d'aquest treball, vam realitzar una anàlisi de marcadors immunohistoquímics en les biòpsies de pacients de MLA amb l'objectiu de detectar biomarcadors d'aplicació clínica, observant que els pacients amb una expressió baixa d'ALDH1 s'associen a un nombre elevat de CNVs, a la presència d'amplificacions en *CDK4* i tot això es correlaciona amb característiques clinicopatològiques de pitjor pronòstic, menor supervivència i major freqüència de recaigudes.

En definitiva, el nostre estudi presenta informació nova i de rellevància pronòstica, obrint una porta a tractaments personalitzats enfocats a la modulació del TME i a l'ús del secretoma com a eina diagnòstica i de monitorització del curs de la malaltia en pacients amb MLA.



## ABSTRACT

---

Acral lentiginous melanoma (ALM) is a rare subtype of cutaneous melanoma (CM) diagnosed in acral areas, specifically on the palms, soles, and nails beds. This tumor is associated with a poor prognosis due to its advanced stage diagnosis and limited response to current treatments. In addition to being unrelated to sun exposure, ALM has a distinctive genetic profile compared to other CMs, characterized by a high number of copy number variations (CNVs) and a low number of point mutations, unlike the majority of CMs. Due to its genetic peculiarities and low incidence, ALM remains understudied. Therefore, further research is necessary to better understand its pathogenesis, identify biomarkers, and develop more effective specific and personalized therapies. Recent oncology studies have shown that the tumor microenvironment (TME) plays a fundamental role in aggressive tumors such as ALM, promoting tumor progression, angiogenesis, and metastasis through the constant interaction between tumor cells and TME components.

In the first part of this study, we analyzed CNVs in a cohort of ALM patients to investigate the genetic profile in relation to clinicopathological characteristics and prognosis. The results revealed that patients with a high number of CNVs had a worse prognosis. Additionally, we observed an association between poor prognosis and *CDK4* gene amplification in the tumor. Furthermore, *CDK4* amplification was found to be associated with increased CDK4 expression. To further explore this, we created an *in vitro* model of CDK4 overexpression and observed increased migration, invasion, and proliferation of cells with high expression levels of this kinase. Subsequently, we investigated the secretome of ALM cell lines according to their genetic profile and found that cell lines with a high CNVs showed a protumoral and proangiogenic secretory profile, related to a greater M2 polarization phenotype of tumor-associated macrophages (TAMs). Translating these *in vitro* findings to the patient cohort, we observed an increase in M2-like TAMs at the invasive front compared to the tumor body in patients with a high CNVs. Additionally, we detected elevated levels of PARC chemokine in plasma of ALM patients compared to patients with non-acral CMs.

In the second part of this study, we conducted an analysis of immunohistochemical markers in biopsies from ALM patients to identify clinically applicable biomarkers. We found that patients with low ALDH1 expression were associated with a high number of CNVs and *CDK4* amplifications. These patients also exhibited a poor prognosis, lower survival rates, and a higher frequency of relapses.

In summary, our study provides novel and prognostically relevant information, opening avenues for personalized treatments focused on modulating the TME and using the secretome as a diagnostic tool to monitor disease progression in ALM patients.



---

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

---



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>I</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. EL MELANOMA CUTÁNEO</b> .....	<b>1</b>
1.1. ORIGEN DEL MELANOMA: LOS MELANOCITOS .....	1
1.2. DEL MELANOCITO AL MELANOMA METASTÁSICO .....	3
1.3. EPIDEMIOLOGÍA.....	6
1.4. DIAGNÓSTICO, ESTADIAJE Y TRATAMIENTO.....	16
1.5. CLASIFICACIÓN CLINICOPATOLÓGICA DEL MELANOMA CUTÁNEO .....	25
<b>2. EL MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL (MLA)</b> .....	<b>28</b>
2.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL MELANOMA ACRAL .....	28
2.2. ALTERACIONES GENÉTICAS.....	33
2.3. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO.....	36
<b>3. MICROAMBIENTE TUMORAL Y SECRETOMA</b> .....	<b>40</b>
3.1. ANTECEDENTES: DEFINICIÓN Y COMPONENTES .....	40
3.2. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO (SI).....	42
3.3. CÉLULAS DEL ESTROMA .....	49
<b>HIPÓTESIS Y</b> .....	<b>56</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>56</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>61</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>61</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>65</b>
<b>1. CONSTRUCCIÓN DE LA COHORTE DE MLA</b> .....	<b>67</b>
1.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y SELECCIÓN DE PACIENTES .....	67
1.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	67
1.3. RECOGIDA DE DATOS DE LOS PACIENTES DE LA COHORTE .....	68
<b>2. CULTIVOS CELULARES</b> .....	<b>69</b>
2.1. OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS HUMANAS DE MLA.....	69
2.2. PROCEDIMIENTOS BÁSICOS DE CULTIVOS CELULARES .....	69
2.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS CON SOBREENPRESIÓN DE CDK4 .....	71
<b>3. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS</b> .....	<b>74</b>
3.1. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DEL ADN.....	74
3.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DEL ARN .....	83
<b>4. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS</b> .....	<b>85</b>
4.1. Western Blot .....	85
4.2. Array de detección de citoquinas .....	88
4.3. ELISA DE DETECCIÓN DE PARC.....	92
<b>5. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO</b> .....	<b>93</b>
5.1. PROCEDIMIENTO.....	93
5.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA.....	94
<b>6. ENSAYOS IN VITRO CON LÍNEAS CELULARES DE MLA</b> .....	<b>97</b>
6.1. ENSAYO DE MIGRACIÓN WOUND HEALING .....	97
6.2. ENSAYO DE INVASIÓN DE TRANSWELL.....	98

6.3.	ENSAYO DE INCORPORACIÓN DE BROMODESOXIURIDINA.....	99
6.4.	ENSAYO DE DUPLICACIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR.....	99
6.5.	ENSAYO CLONOGÉNICO .....	100
6.6.	ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR .....	100
<b>7.</b>	<b>AISLAMIENTO, ESTIMULACIÓN Y FENOTIPAJE DE MONOCITOS HUMANOS.....</b>	<b>101</b>
7.1.	AISLAMIENTO DE MONOCITOS DE SANGRE DE DONANTES SANOS.....	101
7.2.	ESTIMULACIÓN IN VITRO DE MACRÓFAGOS UTILIZANDO MCS DE LÍNEAS CELULARES DE MLA.....	103
<b>8.</b>	<b>AISLAMIENTO Y ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES DE RATÓN .....</b>	<b>106</b>
8.1.	CONSIDERACIONES PREVIAS .....	106
8.2.	AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS DE RATÓN.....	107
8.3.	ESTIMULACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS DE RATÓN CON MCS DE LÍNEAS CELULARES DE MLA.....	108
<b>9.</b>	<b>ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y ESTADÍSTICO .....</b>	<b>109</b>
9.1.	ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE CONJUNTOS DE GENES (GSEA).....	109
9.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	109
<b>RESULTADOS .....</b>		<b>111</b>
<b>PRIMERA PARTE .....</b>		<b>112</b>
<b>ESTUDIO DEL PERFIL GENÉTICO, MICROAMBIENTE TUMORAL Y SECRETOMA DEL MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL .....</b>		<b>112</b>
<b>1.</b>	<b>ESTUDIO DEL PERFIL GENÉTICO DEL MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL .....</b>	<b>117</b>
1.1.	ESTUDIO DEL PERFIL GENÉTICO EN UNA COHORTE DE PACIENTES DE MLA.....	117
1.2.	ESTUDIO DEL PERFIL GENÉTICO EN LÍNEAS CELULARES DE MLA .....	142
<b>2.</b>	<b>ESTUDIO DEL SECRETOMA Y DEL MICROAMBIENTE TUMORAL EN EL MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL.....</b>	<b>151</b>
2.1.	ESTUDIO DEL SECRETOMA Y DEL TME EN LÍNEAS CELULARES DE MLA .....	151
2.2.	ESTUDIO DEL SECRETOMA Y DEL COMPONENTE INMUNITARIO DEL TME EN PACIENTES DE MLA .....	161
<b>SEGUNDA PARTE.....</b>		<b>170</b>
<b>ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE APLICACIÓN CLÍNICA EN MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL .....</b>		<b>170</b>
<b>1.</b>	<b>CORRELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE AMPLIFICACIONES Y LOS NIVELES DE EXPRESIÓN EN ONCOGENES EN LA COHORTE DE PACIENTES DE MLA.....</b>	<b>173</b>
<b>2.</b>	<b>ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE TRANSICIÓN DE EPITELIO- MESÉNQUIMA EN LA COHORTE DE PACIENTES DE MLA.....</b>	<b>174</b>
2.1.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EMT .....	175
2.2.	ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA ESPECÍFICA DE MLA Y LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EMT .....	177
2.3.	ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EMT EN FUNCIÓN DEL PERFIL GENÉTICO.....	178
<b>3.</b>	<b>ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ALDH1 COMO MARCADOR DE CÉLULA MADRE TUMORAL (CMT).....</b>	<b>179</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>		<b>190</b>
<b>PARTE 1: ESTUDIO DEL PERFIL GENÉTICO, MICROAMBIENTE TUMORAL Y SECRETOMA DEL MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL.....</b>		<b>193</b>



<b>PARTE 2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE APLICACIÓN CLÍNICA EN MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL.....</b>	<b>207</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>212</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>219</b>
<b>TABLAS ANEXAS .....</b>	<b>233</b>



---

# ÍNDICE DE FIGURAS

---



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Representación gráfica de la piel normal y sus componentes.....	1
<b>Figura 2.</b> Principales vías de señalización implicadas en el crecimiento, supervivencia y diferenciación de los melanocitos .....	2
<b>Figura 3.</b> Progresión del melanoma según la vía clásica o de Clark.....	6
<b>Figura 4.</b> Casos diagnosticados a nivel global por género.....	7
<b>Figura 5.</b> Tasas de incidencia global del melanoma ajustada por edad.....	8
<b>Figura 6.</b> Tasas de mortalidad global del melanoma ajustada por edad. ....	9
<b>Figura 7.</b> Esquema representativo de las perspectivas futuras de incidencia y mortalidad en melanoma.. ....	10
<b>Figura 8.</b> Función normal del gen <i>CDKN2A</i> en el ciclo celular.....	13
<b>Figura 9.</b> Esquema de los tipos de radiación uv y los tipos de daños al ADN. ....	16
<b>Figura 10.</b> Esquema de la escala de breslow y nivel de invasión de Clark. ....	18
<b>Figura 11.</b> Mecanismo de acción de los BRAFi y MEKi.....	22
<b>Figura 12.</b> Mecanismo de acción de los inhibidores de puntos de control del SI.....	24
<b>Figura 13.</b> Subtipos clínicos de melanoma cutáneo.....	26
<b>Figura 14.</b> Incidencia de MLA separada por rangos de edad y sexo. ....	29
<b>Figura 15.</b> Representación de la supervivencia del MLA a lo largo del tiempo. ....	30
<b>Figura 16.</b> Supervivencia acumulada del MLA a los 5 años según la raza.....	31
<b>Figura 17.</b> Mapa anatómico de melanomas acrales diagnosticados en el miembro inferior.....	33
<b>Figura 18.</b> Principales vías de señalización alteradas en MLA.....	34
<b>Figura 19.</b> Imágenes de MLA en diferentes localizaciones. ....	37
<b>Figura 20.</b> Imágenes histopatológicas de MLA a diferentes aumentos. ....	38
<b>Figura 21.</b> Componentes del microambiente tumoral.....	41
<b>Figura 22.</b> Papel del sistema inmunitario en el TME.....	43
<b>Figura 23.</b> Polarización de los macrófagos. ....	45
<b>Figura 24.</b> Papel de los M2-like TAMs en la progresión tumoral y su secretoma.....	47
<b>Figura 25.</b> Origen y activación de los CAFs.....	51
<b>Figura 26.</b> Funciones de los CAFs. ....	53
<b>Figura 27.</b> Estados funcionales de los CAFs.....	54
<b>Figura 28.</b> Esquema de cuadrantes de una cámara de Neubauer .....	71
<b>Figura 29.</b> Mapa del vector pLOC.....	72
<b>Figura 30.</b> Flujo de trabajo realizado para la extracción de ADN de biopsias incluidas en parafina. ....	75

<b>Figura 31.</b> Esquema del paso de desnaturalización e hibridación del ADN genómico de la muestra y los oligonucleótidos (LPO y RPO) de la sonda de la técnica MLPA. ....	78
<b>Figura 32.</b> Esquema de la reacción de ligación entre los dos oligonucleótidos que componen la sonda.....	78
<b>Figura 33.</b> Esquema del proceso de amplificación de las sondas mediante una PCR múltiple. ..	79
<b>Figura 34.</b> Electroferograma obtenido de la electroforesis capilar de los fragmentos .....	80
<b>Figura 35.</b> Representación esquemática de la comparación entre un electroferograma de una muestra de referencia y de una muestra de interés con deleciones. ....	80
<b>Figura 36.</b> Representación de los gráficos de proporciones obtenidos mediante Coffalyser.Net en una muestra de referencia (arriba) y en una muestra de interés (abajo).....	82
<b>Figura 37.</b> Esquema del flujo de trabajo realizado para el análisis del secretoma mediante un array de citoquinas. ....	90
<b>Figura 38.</b> Esquema del flujo de trabajo seguido para la realización de la técnica ELISA.....	93
<b>Figura 39.</b> Ejemplo representativo de la función Positive Cell Detection en QuPath.....	96
<b>Figura 40.</b> Esquema representativo del fundamento de la técnica de Wound Healing. ....	97
<b>Figura 41.</b> Esquema del sistema de doble cámara utilizado para el ensayo de invasión de Transwell.....	98
<b>Figura 42.</b> Distribución de las fases del ciclo celular obtenida tras el análisis del mismo mediante citometría de flujo.....	101
<b>Figura 43.</b> Flujo de trabajo de los principales pasos del aislamiento de monocitos a partir de sangre de donantes sanos.. ....	103
<b>Figura 44.</b> Flujo de trabajo de la estimulación de los monocitos con MCs de líneas de MLA y fenotipaje mediante citometría de flujo.....	106
<b>Figura 45.</b> Esquema del flujo de trabajo para el aislamiento de células estromales de ratón.. ....	108
<b>Figura 46.</b> Representación gráfica de los grupos de profesiones más representativos dentro de la cohorte de pacientes de MLA. ....	124
<b>Figura 47.</b> Representación gráfica de los pacientes agrupados según su exposición a químicos o a traumatismos según la profesión ejercida.....	124
<b>Figura 48.</b> Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a la exposición de químicos o traumatismos.....	126
<b>Figura 49.</b> Gráfica del número de oncogenes alterados (amplificaciones y/o deleciones) por paciente de MLA tras el análisis de la dosis génica mediante MLPA. ....	127
<b>Figura 50.</b> Heatmap de las CNVs detectadas por paciente en los oncogenes analizados mediante MLPA.....	128

<b>Figura 51.</b> Gráfica representativa del número de copias detectado de cada oncogén estudiado en las biopsias de MLA mediante MLPA.....	129
<b>Figura 52.</b> Análisis de la correlación entre las características intrínsecas de los pacientes de MLA respecto al total de CNVs por paciente. ....	130
<b>Figura 53.</b> Análisis de la correlación entre sexo y el total de CNVs respecto a la exposición a químicos o a traumatismos en función de la profesión.. ....	131
<b>Figura 54.</b> Análisis de la correlación entre las características del tumor respecto al total de CNVs por paciente. ....	132
<b>Figura 55.</b> Análisis de la correlación entre el riesgo asociado al estadio AJCC respecto al total de CNVs por paciente.....	133
<b>Figura 56.</b> Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto al total de CNVs por paciente. ....	134
<b>Figura 57.</b> Gráficas representativas de las correlaciones significativas entre las variables clinicopatológicas y los genes <i>CCND1</i> y <i>MYC</i> .....	135
<b>Figura 58.</b> Gráficas representativas de las correlaciones entre la variable riesgo y la supervivencia libre de enfermedad respecto al gen <i>EGFR</i> .. ....	136
<b>Figura 59.</b> Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto al gen <i>MDM2</i> .....	137
<b>Figura 60.</b> Gráficas representativas de las correlaciones entre las variables clinicopatológicas significativas respecto al gen <i>CDK4</i> .....	138
<b>Figura 61.</b> Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto al gen <i>CDK4</i> . ....	139
<b>Figura 62.</b> Análisis de la correlación entre el total de CNVs por paciente y la presencia o ausencia de amplificación del gen <i>CDK4</i> .....	139
<b>Figura 63.</b> Matriz de correlación entre los oncogenes con mayor número de amplificaciones. ....	140
<b>Figura 64.</b> Gráfica representativa de la relación entre la presencia de amplificación en el gen <i>MDM2</i> y en <i>CDK4</i> .....	141
<b>Figura 65.</b> Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a la combinación de la amplificación de <i>MDM2</i> y <i>CDK4</i> . ....	142
<b>Figura 66.</b> Gráfica del número de oncogenes alterados (amplificaciones y/o deleciones) por línea celular de MLA tras el análisis de la dosis génica mediante MLPA.....	143
<b>Figura 67.</b> Heatmap de las CNVs detectadas por línea celular en los oncogenes analizados mediante MLPA. ....	144

<b>Figura 68.</b> Gráfica representativa del número de copias detectado de cada oncogén estudiado en las líneas celulares de MLA mediante MLPA. ....	145
<b>Figura 69.</b> Análisis de la expresión de CDK4 respecto a la presencia de amplificación del mismo en el tumor.....	147
<b>Figura 70.</b> Análisis de la expresión de CDK4 en la línea celular M28 Control y M28 CDK4 O/E. ....	147
<b>Figura 71.</b> Análisis de la migración e invasión del modelo in vitro de MLA según la expresión de CDK4.....	148
<b>Figura 72.</b> Análisis de la proliferación del modelo in vitro de MLA según la expresión de CDK4. ....	149
<b>Figura 73.</b> Análisis del perfil del ciclo celular en el modelo in vitro de MLA según la expresión de CDK4.....	150
<b>Figura 74.</b> Representación del perfil de secreción de los factores solubles significativos según el total de CNVs.....	152
<b>Figura 75.</b> Representación gráfica de la variación del perfil de secreción según el total de CNVs. Gráfica del log <sub>2</sub> fold-change de las líneas M28 (CNVs <sup>High</sup> ) respecto a las WM4235 (CNVs <sup>Low</sup> )...	154
<b>Figura 76.</b> Representación del perfil de secreción según su papel en el TME. Heatmaps de los valores de secreción normalizados (Z-score) de la línea celular M28 (CNVs <sup>High</sup> ) y WM4235 (CNVs <sup>Low</sup> ) según el papel protumoral (A) o (B) antitumoral en el TME, de los factores solubles analizados.....	155
<b>Figura 77.</b> Análisis específico de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA) del perfil de secreción según el total de CNVs.....	156
<b>Figura 78.</b> Representación del perfil de secreción de factores proangiogénicos y de polarización de TAMs.. ....	157
<b>Figura 79.</b> Análisis de la polarización de macrófagos mediante FACS según el tratamiento con MCs de las líneas de MLA según el total de CNVs.. ....	159
<b>Figura 80.</b> Análisis de la expresión de marcadores de activación y fenotipo de CAFs mediante la estimulación de fibroblastos con MCs de las líneas de MLA según el total de CNVs.....	160
<b>Figura 81.</b> Análisis de la población de M2-like TAMs en el cuerpo del tumor y el frente invasivo en biopsias de pacientes de MLA según el total de CNVs. ....	162
<b>Figura 82.</b> Análisis de la población de M2-like TAMs en el cuerpo del tumor y el frente invasivo en biopsias de pacientes de MLA según la amplificación de CDK4.. ....	163
<b>Figura 83.</b> Análisis cuantitativo de la secreción de PARC en plasma de pacientes de MLA respecto a pacientes con otros MCs diferentes de MLA.. ....	164



<b>Figura 84.</b> Análisis cuantitativo de la secreción de PARC en plasma de pacientes previa cirugía del MLA primario apareados con plasma de los mismos pacientes 6 meses después de la cirugía..	165
<b>Figura 85.</b> Análisis del infiltrado linfocitario en H&E de biopsias de pacientes de MLA.....	166
<b>Figura 86.</b> Análisis del porcentaje de infiltrado en función de las características clinicopatológicas de los pacientes.....	166
<b>Figura 87.</b> Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto al porcentaje de infiltrado. ....	167
<b>Figura 88.</b> Análisis del porcentaje de infiltrado respecto al total de CNVs y a la presencia de amplificación en <i>CDK4</i> . ....	168
<b>Figura 89.</b> Análisis de la expresión de EGFR respecto a la presencia de amplificación en el tumor. ....	173
<b>Figura 90.</b> Análisis de la expresión de Ciclina D1 respecto a la presencia de amplificación en el tumor.. ....	174
<b>Figura 91.</b> Análisis de la expresión del marcador epitelial E-cadherina.....	175
<b>Figura 92.</b> Análisis de la expresión del marcador epitelial N-cadherina. ....	176
<b>Figura 93.</b> Correlación entre los valores de expresión de los marcadores de EMT. ....	176
<b>Figura 94.</b> Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a la expresión de E-cadherina. ....	177
<b>Figura 95.</b> Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a la expresión de N-cadherina. ....	178
<b>Figura 96.</b> Análisis de la expresión de marcadores de EMT en función del perfil genético.....	179
<b>Figura 97.</b> Análisis de la expresión del marcador de CMT ALDH1.....	180
<b>Figura 98.</b> Análisis de la correlación entre las características clinicopatológicas respecto a los niveles de expresión de ALDH1.....	181
<b>Figura 99.</b> Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a la expresión de ALDH1. ....	182
<b>Figura 100.</b> Análisis de la expresión de ALDH1 en función del perfil genético. ....	183
<b>Figura 101.</b> Análisis de la correlación entre las características clinicopatológicas respecto a los niveles de expresión agrupados de ALDH1 y del total de CNVs.....	184
<b>Figura 102.</b> Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a los niveles de expresión agrupados de ALDH1 y del total de CNVs expresión de ALDH1 y del <i>total de CNVs</i> . ....	185
<b>Figura 103.</b> Análisis de la correlación entre las características clinicopatológicas respecto a los niveles de expresión agrupados de ALDH1 y la presencia de amplificación en <i>CDK4</i> .....	186

**Figura 104.** Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a los niveles de expresión agrupados de ALDH1 y la presencia de amplificación en *CDK4*.....187

**Figura 105.** Análisis de la expresión de ALDH1 en las líneas celulares de MLA en función del total de CNVs y la sobreexpresión de *CDK4*. ..... 188





---

# ÍNDICE DE TABLAS

---



## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Resumen general de los genes implicados en la susceptibilidad genética al melanoma cutáneo. ....	14
<b>Tabla 2.</b> Clasificación TNM de la AJCC para el melanoma cutáneo (8ª edición). ....	19
<b>Tabla 3.</b> Sistema de estadificación TNM del AJCC para el melanoma (8ª edición). ....	20
<b>Tabla 4.</b> Clasificación del melanoma según la OMS publicada en 2018. ....	27
<b>Tabla 5.</b> Identificación, tipo de cultivo y procedencia de las células de MLA utilizadas en el estudio. ....	69
<b>Tabla 6.</b> Genes estudiados a través de la técnica MLPA. ....	77
<b>Tabla 7.</b> Sondas utilizadas para el análisis de expresión mediante RT-qPCR. ....	84
<b>Tabla 8.</b> Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la técnica del Western Blot. ....	88
<b>Tabla 9.</b> Citoquinas evaluadas en el array de citoquinas Human Cytokine Array G5-8. ....	89
<b>Tabla 10.</b> Anticuerpos primarios utilizados para el análisis inmunohistoquímico. ....	94
<b>Tabla 11.</b> Estímulos utilizados como control positivo para la polarización de los macrófagos in vitro. ....	104
<b>Tabla 12.</b> Anticuerpos utilizados para el análisis del fenotipo de los macrófagos mediante citometría de flujo. ....	105
<b>Tabla 13.</b> Características clinicopatológicas de los pacientes de la cohorte de MLA del HUAV diagnosticados y seguidos durante el periodo de 2008-2021. ....	119
<b>Tabla 14.</b> Análisis de la supervivencia específica de MLA en función de las características demográficas y patológicas del tumor. ....	120
<b>Tabla 15.</b> Análisis de la supervivencia específica de MLA en función del riesgo. Representación porcentual de los pacientes que sobreviven tras 1 y 3 años de seguimiento. ....	121
<b>Tabla 16.</b> Análisis de la supervivencia libre de enfermedad en función de las características demográficas y patológicas del tumor. ....	122
<b>Tabla 17.</b> Análisis de la supervivencia libre de enfermedad en función del riesgo. Representación porcentual de los pacientes que se mantienen sin recaer tras 1 y 3 años de seguimiento. ....	123
<b>Tabla 18.</b> Análisis de la asociación entre las características clinicopatológicas en función de la exposición a químicos o a traumatismos según la profesión de los pacientes de la cohorte...	125
<b>Tabla 19.</b> Resumen de las variables clinicopatológicas, de supervivencia específica de MLA y de supervivencia libre de enfermedad significativas en relación a la presencia/ausencia de amplificación en los genes con mayor porcentaje de amplificación. ....	135





---

# ÍNDICE DE TABLAS ANEXAS

---



<b>Tabla Anexa 1.</b> Análisis de contingencia de la presencia de amplificaciones de los genes con mayor número de amplificaciones detectadas mediante MLPA, en relación a las características clinicopatológicas de la cohorte de pacientes de MLA.) .....	235
<b>Tabla Anexa 2.</b> Análisis de la supervivencia específica de MLA en función de la presencia de amplificación en los genes con mayor número de amplificaciones detectadas mediante MLPA. ...	236
<b>Tabla Anexa 3.</b> Análisis de la supervivencia libre de enfermedad en función de la presencia de amplificación en los genes con mayor número de amplificaciones detectadas mediante MLPA. ...	237
<b>Tabla Anexa 4.</b> Análisis de los factores solubles detectados mediante el array de citoquinas en función del total de CNVs. ....	238
<b>Tabla Anexa 5.</b> Análisis de los factores solubles detectados mediante el array de citoquinas en función del total de CNVs. ....	239
<b>Tabla Anexa 6.</b> Características clinicopatológicas de la cohorte de pacientes de MLA de los que obtuvimos plasma sanguíneo. ....	241
<b>Tabla Anexa 7.</b> Tipo de tumor primario y estadio AJCC de la cohorte de pacientes del Hospital Clínic (Barcelona) de la que obtuvimos plasma sanguíneo.....	242



---

# ABREVIATURAS

---



## A

---

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	ADN complementario <i>American Joint Committee on</i> <i>Cancer</i>
<b>AJCC</b>	<i>Cancer</i> Familia de enzimas aldehído
<b>ALDHs</b>	deshidrogenasas
<b>AMP</b>	Amplificación en el gen

## B

---

<b>BAP1</b>	Proteína 1 asociada a BRCA1
<b>BFGF</b>	Factor de crecimiento básico de fibroblastos
<b>BRAF<sup>i</sup></b>	Inhibidores de BRAF
<b>BRAF<sup>V600E</sup></b>	Mutación V600E en el gen BRAF
<b>BrdU</b>	5-Bromodesoxiuridina
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina

## C

---

<b>CAF</b>	Fibroblasto asociado al tumor
<b>CCL</b>	Ligando de quimioquina con motivo C-C
<b>CCND1</b>	Gen de la ciclina D1
<b>CCND2</b>	Gen de la ciclina D2
<b>CCR</b>	Receptor de quimioquina con motivo C-C
<b>CD</b>	Cluster de diferenciación
<b>CDK</b>	Kinasa dependiente de ciclina
<b>CDK4</b>	Kinasa dependiente de ciclina 4
<b>CDK4 O/E</b>	Sobreexpresión de CDK4
<b>CDKN2A</b>	Gen del inhibidor de kinasa dependiente de ciclina 2A
<b>CMT</b>	Célula madre tumoral
<b>CNV</b>	Variación en el número de copias

**CNVs<sup>High</sup>** Alto número de variaciones en el número de copias

**CNVs<sup>Low</sup>** Bajo número de variaciones en el número de copias

**CSD** Daño solar acumulativo

**CSF-1** Factor estimulante de colonias tipo 1

**CTLA-4** Proteína asociada a linfocito citotóxico 4

**CTLs** Linfocitos T citotóxicos

**CXCL** Ligando de quimioquina con motivo C-X-C

## D

---

**DAB** Diaminobenzimida

**DMEM** Medio Eagle modificado de Dulbecco

**DMSO** Dimetilsulfóxido

**DS** Desviación estándar

## E

---

**Ecad** E-cadherina

**ECM** Matriz extracelular

**EGF** Factor de crecimiento epitelial

**EGFR** Receptor del factor de crecimiento epitelial

**EMT** Transición epitelio-mesénquima

**EndMT** Transición endotelio-mesénquima

**ERK** Kinasas reguladas por señales extracelulares

## F

---

**FAMMM** Melanoma familiar con lunares atípicos múltiples

## II ABREVIATURAS

<b>FAP</b>	Proteína de activación de fibroblastos
<b>FBS</b>	Suero Fetal Bovino
<b>FC</b>	Fold-change
<b>FDA</b>	Food and Drugs Administration
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FSP1</b>	Proteína específica de fibroblastos 1

### G

---

<b>GDF15</b>	Factor de diferenciación de crecimiento 15
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GO_BP</b>	Ontología de genes de procesos biológicos
<b>GSEA</b>	Análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes

### H

---

<b>H-score</b>	Histoscore
<b>HE</b>	Hematoxilina y Eosina
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano

### I

---

<b>MHC-I</b>	Moléculas de histocompatibilidad tipo I
--------------	---

<b>IARC</b>	Agencia Internacional de Investigación en Cáncer
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>iCAF</b>	CAF inflamatorio
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IHC</b>	Inmunohistoquímica
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>Indels</b>	Inserciones/deleciones
<b>IQR</b>	Rango intercuartílico

### L

---

<b>LB</b>	Buffer de carga
<b>LIF</b>	Factor inhibidor de leucemia
<b>LMM</b>	Melanoma sobre léntigo maligno
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido

### M

---

<b>M1-like</b>	Macrófagos asociados al tumor tipo M1
<b>TAMs</b>	
<b>M2-like</b>	Macrófagos asociados al tumor tipo M2
<b>TAMs</b>	
<b>MA</b>	Melanoma acral
<b>MAPK</b>	Kinasas activadas por mitógenos
<b>Mb</b>	Megabase
<b>MC</b>	Medio condicionado
<b>MC</b>	Melanoma cutáneo
<b>MC1R</b>	receptor de melanocortina 1
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos
<b>MDSCs</b>	Células mieloides supresoras
<b>MEKi</b>	Inhibidores de MEK
<b>MES</b>	Melanoma de extensión superficial
<b>MIS</b>	Melanoma In situ



<b>MITF</b>	Factor de transcripción asociado con microftalmia
<b>MLA</b>	Melanoma lentiginoso acral
<b>MLPA</b>	Amplificación de sondas múltiples dependientes de ligación
<b>MMP</b>	Metaloproteinasa
<b>MN</b>	Melanoma Nodular
<b>MSC</b>	Célula madre mesenquimal
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
<b>MyoCAF</b>	CAF miofibroblástico

## N

---

<b>Ncad</b>	N-cadherina
<b>NK</b>	Células asesinas naturales
<b>Non-CSD</b>	no asociado con el daño solar acumulativo

## O

---

<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura

## P

---

<b>PBMCs</b>	Células mononucleares de sangre periférica
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PD1</b>	Proteína de muerte programada
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PDGFR</b>	Receptor de PDGF
<b>PEI</b>	Polietilamina
<b>PFA</b>	Paraformaldehído
<b>pLOC</b>	Precision LentiORF
<b>POT1</b>	Protector de telómeros 1

## R

---

<b>Rb</b>	Proteína del retinoblastoma
<b>RFP</b>	Proteína rojo fluorescente
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPMI</b>	Medio Roswell Park Memorial Institute
<b>RT-qPCR</b>	PCR cuantitativa a tiempo real

## S

---

<b>scRNA-seq</b>	RNA-seq de una única célula
<b>SDF-1</b>	Factor derivado de estroma 1
<b>SI</b>	Sistema inmune
<b>SNV</b>	Variaciones de un nucleótido

## IV | ABREVIATURAS

### T

---

<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TAM</b>	Macrófago asociado al tumor
<b>TCR</b>	Receptor de célula T
<b>TERT</b>	Telomerasa transcriptasa inversa
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante $\beta$
<b>Th</b>	Linfocito T helper o colaborador
<b>TILs</b>	Linfocitos infiltrantes en el tumor
<b>TME</b>	Microambiente tumoral
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>Treg</b>	Linfocito T regulador

### U

---

<b>UV</b>	Ultravioleta
-----------	--------------

### V

---

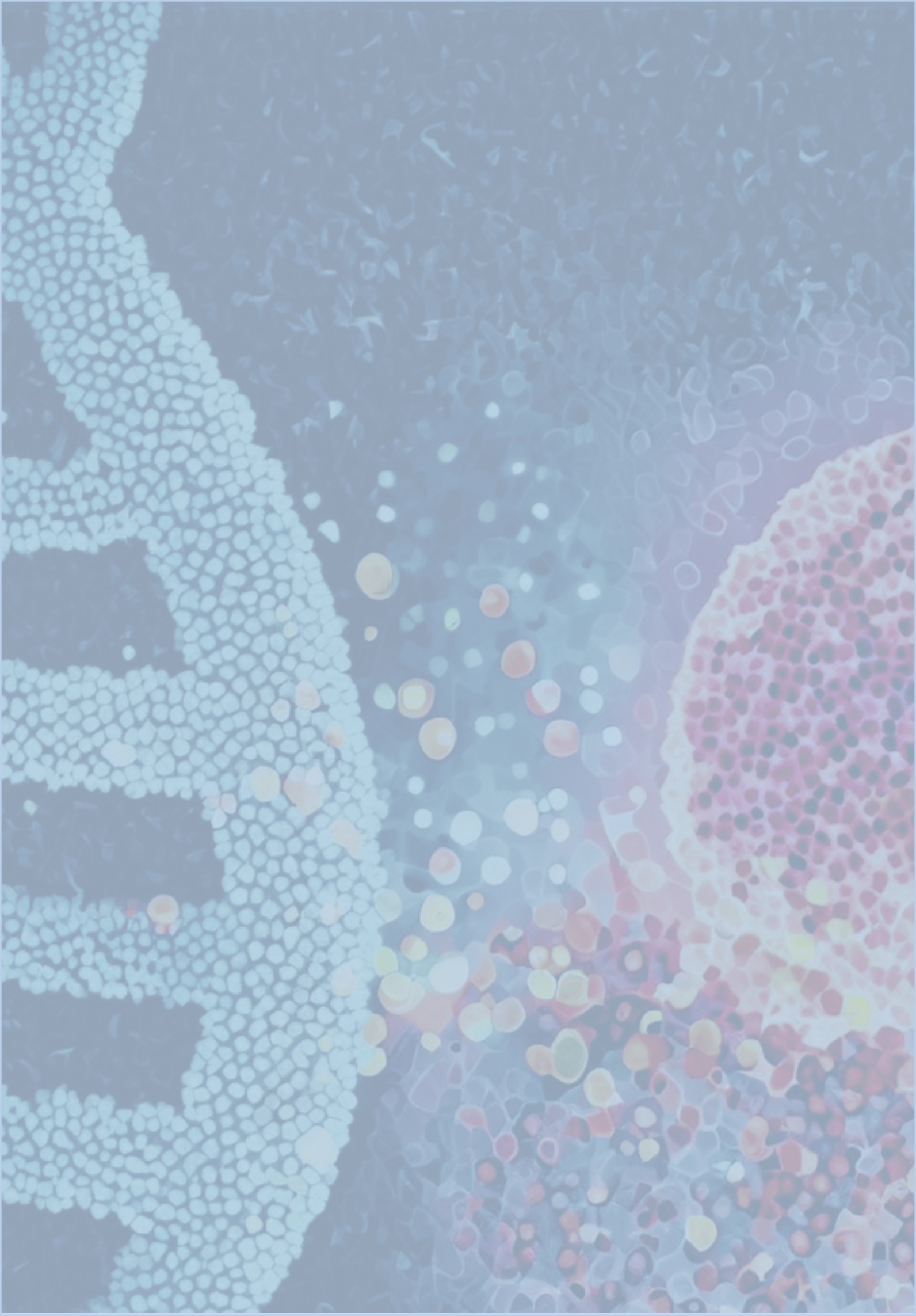
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>VISTA</b>	Supresor del dominio V de Ig de la activación de células T

### W

---

<b>WGS</b>	Secuenciación completa del genoma
<b>WT</b>	Silvestre





---

# INTRODUCCIÓN

---



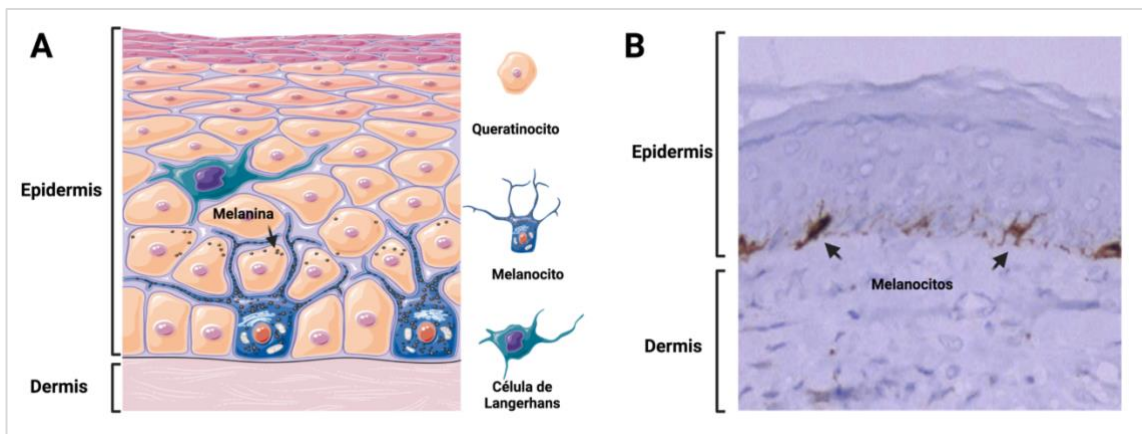
## 1. EL MELANOMA CUTÁNEO

### 1.1. ORIGEN DEL MELANOMA: LOS MELANOCITOS

El melanoma cutáneo (MC) es un tumor maligno que se origina a partir de los melanocitos de la piel. Los melanocitos son células con morfología dendrítica derivadas de la cresta neural. A partir de dicho tejido embrionario, los melanoblastos, las células precursoras de melanocitos, migran hacia diferentes tejidos de origen ectodérmico, principalmente a la capa basal de la epidermis y a los folículos pilosos, aunque también a otras localizaciones tales como a la úvea, a los epitelios mucosos y a las meninges<sup>1,2</sup>.

En la epidermis humana hay aproximadamente 1500 melanocitos por milímetro cuadrado, existiendo un total de alrededor de 3 billones de melanocitos cutáneos en la piel humana. Estas células representan una población minoritaria en la epidermis basal, siendo la relación melanocito-queratinocito de 1:10 en dicha capa<sup>3,4</sup>.

La principal función de los melanocitos es la síntesis de melanina, cuya síntesis ocurre en el interior de unas organelas citoplasmáticas llamadas melanosomas. Estas organelas son transportadas vía dendrítica desde la zona perinuclear hacia las dendritas de los melanocitos y son transferidas a los queratinocitos circundantes. Las dendritas de cada melanocito se encuentran asociadas con 30-40 queratinocitos, facilitando la transferencia de los melanosomas a dichas células. En el interior de los queratinocitos, los melanosomas se localizan finalmente en el área perinuclear para proteger al ADN de la radiación ultravioleta (UV) (Figura 1)<sup>4</sup>.

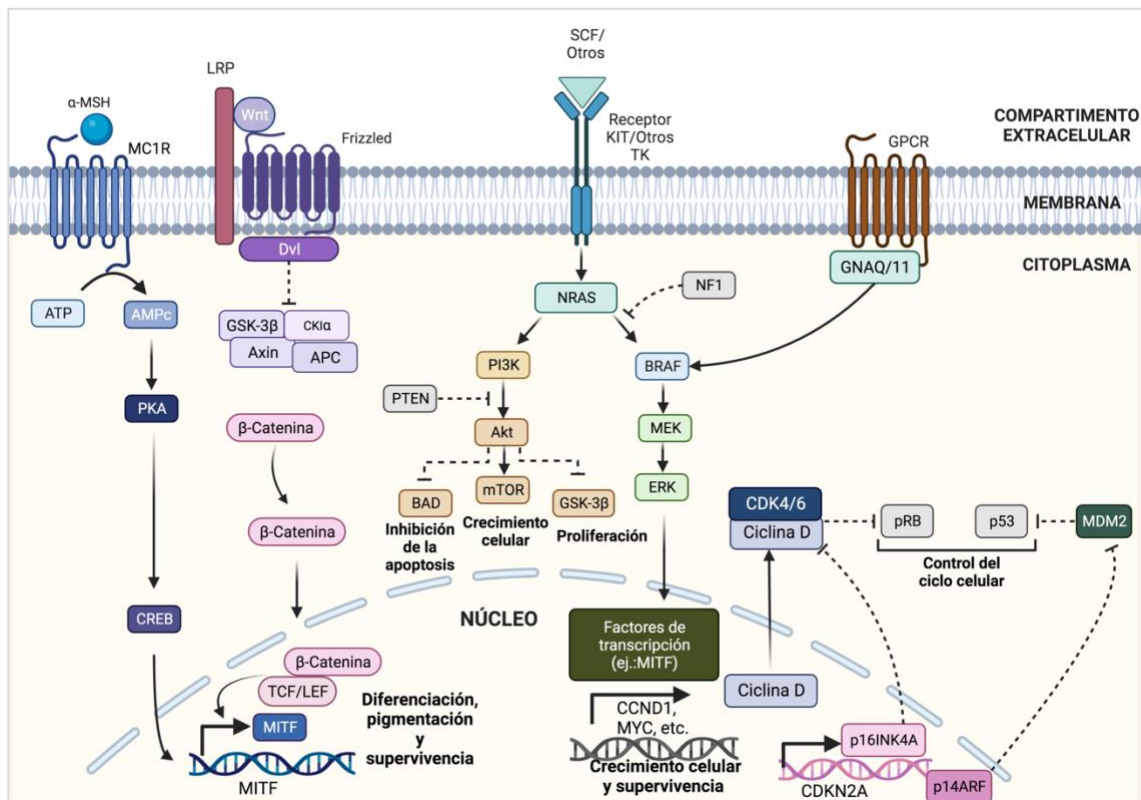


**Figura 1. Representación gráfica de la piel normal y sus componentes.** A) Representación esquemática de un corte transversal de la piel con los melanocitos localizados en la epidermis basal, transfiriendo melanina a los queratinocitos. Las células de Langerhans son células presentadoras de antígenos de la piel. (Adaptada de Servier Medical Art by Servier, licencia bajo Creative Commons Attribution 3.0 Unported License) B) Tinción inmunohistoquímica de los melanocitos de piel normal con Melan-A. (Adaptada de Ostrowski S et. Al 2021).

## 2 INTRODUCCIÓN

La síntesis de melanina o melanogénesis y la pigmentación de la piel están reguladas mediante pigmentación **constitutiva** y **adaptativa**. La pigmentación constitutiva representa la base de la pigmentación de la piel, la cual varía entre grupos étnicos, y según algunos polimorfismos genéticos clave en la señalización melanocítica o en la síntesis de melanina. Por otro lado, la pigmentación adaptativa es aquella mediada por la radiación UV, aunque también puede ser activada en algunos desórdenes de la pigmentación de la piel. La melanina tiene dos formas principales: la **eumelanina** (negro/marrón), que es el pigmento mayoritario y que da lugar a tonos de piel más oscuro, y la **feomelanina** (rojo/amarillo), que da lugar a tonalidades más claras. Ambos pigmentos tienen como precursor a la tirosina<sup>3,4</sup>.

La proliferación y diferenciación de los melanocitos requieren de diferentes vías de señalización que se interrelacionan entre sí, para que dichos procesos ocurran de forma adecuada (Figura 2).



**Figura 2.** Principales vías de señalización implicadas en el crecimiento, supervivencia y diferenciación de los melanocitos. Esquema representativo de la activación del receptor MC1R y la vía Wnt/  $\beta$ -catenina, ambas vías implicadas en la diferenciación, pigmentación y supervivencia de los melanocitos; y de las vías MAPK/ERK y PI3K/Akt implicadas en crecimiento celular y supervivencia. (Creado con BioRender.com).

La vía de señalización de proteínas kinasas activadas por mitógenos/kinasa regulada por señales extracelulares (MAPK/ERK, del inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular-Signal-Regulated Kinase*) es una vía esencial que promueve el crecimiento y supervivencia celular en



los melanocitos. La diferenciación es ampliamente controlada por el factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF, del inglés, *Microphthalmia-associated Transcription Factor*), diana de la vía MAPK/ERK entre otras, siendo un factor central para la supervivencia y proliferación del melanocito, así como para la producción de melanina. La vía de señalización WNT/  $\beta$ -catenina también es esencial para la diferenciación y supervivencia melanocítica. La regulación anormal de estas vías puede promover una proliferación descontrolada de los melanocitos, y en consecuencia una transformación maligna de los mismos<sup>1,5</sup>.

## 1.2. DEL MELANOCITO AL MELANOMA METASTÁSICO

El melanoma es el cáncer con mayor carga mutacional debido al daño inducido al ADN mediante la radiación UV y/o a los errores en la replicación del ADN. Todas estas mutaciones contribuyen al desarrollo del melanoma, aun así, hay ciertas mutaciones que son consideradas mutaciones ‘conductoras’ (del inglés, *driver mutation*), es decir, aumentan la probabilidad de que se inicie una transformación melanocítica, contribuyen al desarrollo inicial tumoral, progresión y su posterior diseminación (*Figura 3*)<sup>6</sup>.

El melanoma puede desarrollarse ‘de novo’ o a partir de *nevus* según la vía clásica o de Clark. Según la vía de Clark, en primer lugar, un melanocito normal adquiere una mutación iniciadora que promueve una hiperplasia melanocítica y el desarrollo de *nevus* (del latín *naevi*, ‘mancha en la piel’). Los **nevi melanocíticos** son proliferaciones senescentes benignas derivadas de melanocitos o de células madre de melanocitos. La mutación en el gen *BRAF*<sup>V600E</sup>, se encuentra en más del 90% de los *nevi* adquiridos, sin embargo, en los *nevi* congénitos, los cuales se presentan desde el nacimiento o en edad temprana, son predominantes las mutaciones en el gen *NRAS*, estando ambos genes implicados en la activación de la vía de señalización MAPK<sup>4,7</sup>. Estas lesiones presentan un bajo número de mutaciones y de alteraciones en el número de copias (CNVs, del inglés, *Copy Number Variations*) en comparación con los melanomas. Tras la adquisición de la mutación iniciadora, el melanocito sufrirá una proliferación limitada hasta formar un *nevus*, previa entrada a un estado de senescencia, en el que se produce una detención irreversible del ciclo celular. Sin embargo, varios estudios indican que algunos melanocitos conservan la capacidad de proliferación y podrían no ser estrictamente senescentes. Si bien es cierto que, aunque la mayoría de *nevus* melanocíticos no malignizan nunca, el melanoma puede aparecer de forma eventual (25-30% del total de melanomas) sobre un *nevus* melanocítico previo congénito o adquirido, mientras que la mayoría de melanomas lo harían ‘de novo’ sobre piel normal. Aunque el modelo de Clark para la progresión del melanoma explique únicamente

## 4 INTRODUCCIÓN

el desarrollo del mismo a partir de nevos melanocíticos benignos, es un modelo útil para analizar el papel de moléculas relevantes en la biología del melanoma<sup>8,9</sup>.

Según diversos estudios, se ha debatido la existencia de una categoría intermedia (o con cierta atipia) entre el *nevus* benigno y el melanoma propiamente dicho, conocida como **nevus displásico**, la cual tiene características histopatológicas entre benignas y malignas que se solapan entre sí, y que tienen ligeramente una mayor probabilidad que el *nevus* común de predisponer a la formación de un melanoma<sup>10</sup>. Los estudios clínicos sugieren que este tipo de lesión atípica ocurre en pacientes con síndrome de *nevus* displásico, en los cuales aparecen múltiples lesiones que están asociadas con el riesgo de melanoma hereditario, y que surgen *de novo* y no a partir de *nevus* melanocíticos preexistentes. Una de las principales mutaciones que se da en esta fase intermedia es la mutación en la telomerasa transcriptasa inversa (del inglés, *Telomerase Reverse Transcriptase, TERT*), la cual también se encuentra alterada en los melanomas esporádicos y cuya expresión aberrante da lugar a la inmortalidad de la célula a nivel replicativo<sup>2,3</sup>.

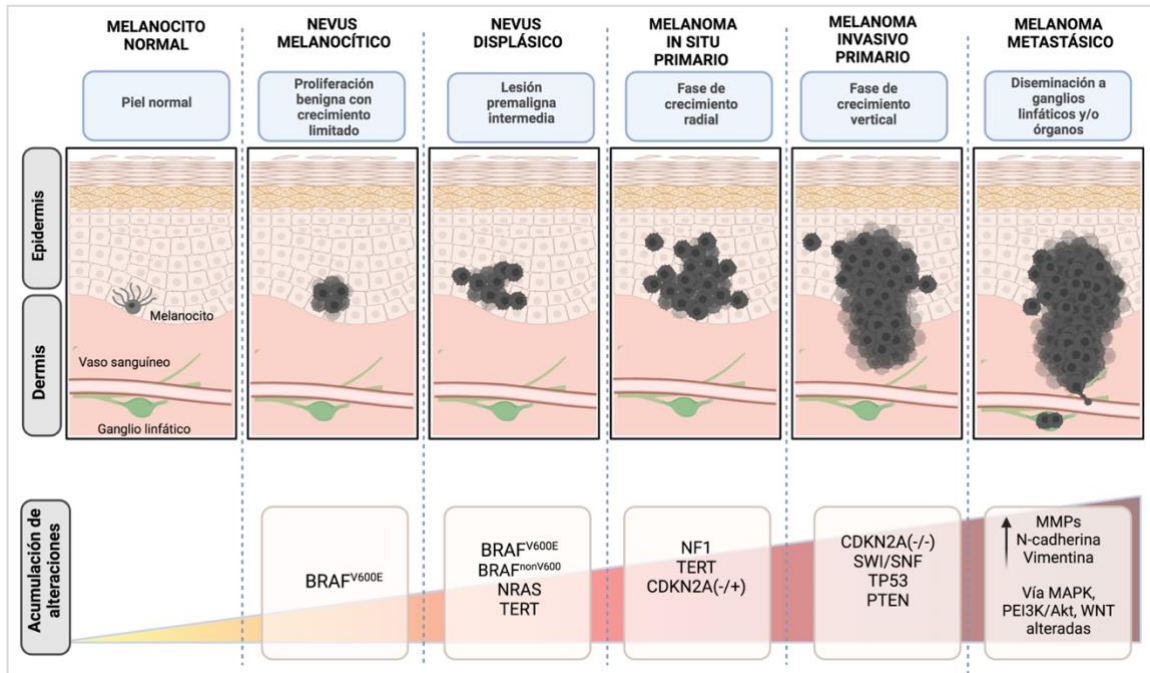
Por otra parte, en contraste con el síndrome de *nevus* displásico, este tipo de lesión puede aparecer de forma esporádica en individuos que tienen uno o un bajo número de *nevi* displásicos. En estos casos, existe una alta prevalencia de mutaciones *NRAS* y *BRAF<sup>nonV600E</sup>*, en comparación con la prevalencia de *BRAF<sup>V600E</sup>* de *nevus* benignos, lo cual sugiere que los *nevus* displásicos esporádicos pueden tener una trayectoria evolutiva paralela al *nevus* común<sup>11,12</sup>.

El **MC primario** pasa por diversas fases de crecimiento, una primera fase de crecimiento horizontal y una fase de crecimiento vertical, aunque puede variar según el subtipo clinicopatológico de melanoma. El concepto **melanoma *in situ*** (MIS) se refiere a una proliferación de melanocitos con núcleo de mayor tamaño, que crecen de forma irregular y de forma radial, es decir se extiende horizontalmente en la epidermis. En esta fase, se pueden distinguir dos patrones principales de crecimiento, los que presentan un patrón pagetoide o aquellos que presentan un patrón lentiginoso. El patrón pagetoide, en el que las células de melanoma se encuentran formando grupos en la epidermis, está asociado a mutaciones *BRAF<sup>V600E</sup>*, y ocurre en aquellos melanomas que se asocian a exposición solar intermitente. Por otro lado, en el patrón lentiginoso las células tumorales se disponen de forma aislada a lo largo de la epidermis basilar, y se encuentra asociado de forma inversa con la mutación *BRAF<sup>V600E</sup>*, dándose en melanomas asociados a la exposición solar crónica o en melanomas no asociados a radiación UV<sup>3</sup>.

En esta fase se da un incremento en el número de mutaciones puntuales, que se producen con una alta frecuencia en la vía de señalización MAPK, mayoritariamente en los genes *BRAF*, *NF1* y *NRAS*. Las mutaciones que afectan a esta vía suelen ser mutuamente excluyentes, exceptuando las mutaciones en el gen *NF1*, que pueden aparecer simultáneamente con otras mutaciones en la vía. Otras mutaciones frecuentes en el MIS son mutaciones promotoras en *TERT*, y alteraciones heterocigotas en el inhibidor de kinasa dependiente de ciclina 2A (del inglés, *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, *CDKN2A*), un supresor tumoral que regula el ciclo celular<sup>6,13</sup>.

Tras la progresiva acumulación de mutaciones en varias vías de señalización, las células pasan de tener un crecimiento radial a tener un crecimiento vertical, adquieren capacidad invasiva y traspasan la epidermis hacia el tejido subyacente, la dermis o submucosa, dando lugar a un **melanoma invasivo**. Esta fase se caracteriza por tener un alto número de mutaciones puntuales, y además un incremento de las variaciones en el número de copias. Se produce una inactivación bialélica o delección homocigota del gen *CDKN2A*, dándose a su vez mutaciones en el complejo remodelador de la cromatina *SWI/SNF*, el cual actúa de supresor tumoral en un amplio número de tumores<sup>5</sup>. Otras alteraciones relevantes, que ocurren durante la progresión tumoral en estadios avanzados, son las mutaciones puntuales o alteraciones en número de copias en el gen *TP53*, imprescindible en el control de daño al ADN y el control del ciclo celular; y en *PTEN*, un supresor tumoral de la vía PI3K/AKT<sup>3,14</sup>.

Además, también se producen mutaciones puntuales y/o delecciones en genes involucrados en otras vías de señalización relacionadas con proliferación, crecimiento, supervivencia, adhesión celular y evasión de la apoptosis, tales como, las vías Wnt/ $\beta$ -catenina, MAPK y PI3K/AKT que confieren a las células tumorales capacidad **metastásica**<sup>5</sup>. Las vías MAPK y PI3K/AKT operan de forma conjunta, enviando señales de supervivencia a las células de melanoma. Ambas vías, junto con la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, implicada en el desarrollo embrionario, alteran la expresión de proteínas de adhesión celular (N-cadherina, vimentina) y metalopeptidasas (MMPs) que promueven el remodelamiento de la matriz extracelular (del inglés, *extracellular matrix*, ECM), y que a su vez están implicadas en la transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés, *epithelial-to-mesenchymal transition*). Como consecuencia, las células tumorales pierden su anclaje permitiendo su diseminación a través del torrente sanguíneo<sup>3,14</sup>.

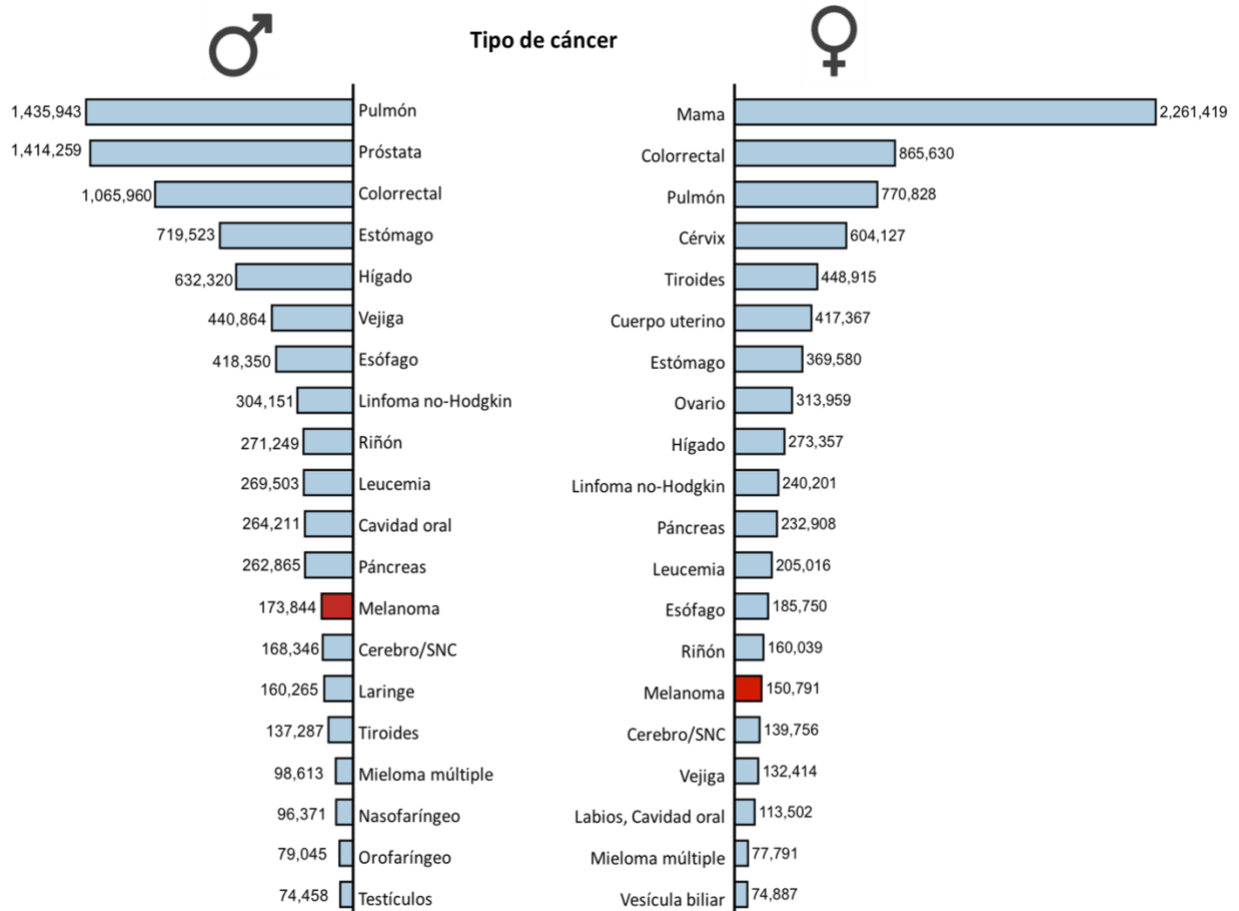


**Figura 3. Progresión del melanoma según la vía clásica o de Clark.** Representación esquemática de la progresión desde un melanocito normal a melanoma metastásico (superior), y las alteraciones moleculares acumuladas a lo largo de la progresión (inferior). (Creado con BioRender.com).

### 1.3. EPIDEMIOLOGÍA

#### 1.3.1. Incidencia y mortalidad

El melanoma ocupa el puesto 17º del total de tumores diagnosticados en ambos sexos a nivel mundial, ocupando el puesto 13º en hombres y el 15º en mujeres<sup>15</sup>. Aunque no es un tumor que se diagnostique de forma frecuente, su incidencia ha ido aumentando de forma global, especialmente en la población caucásica de países de Occidente. De hecho, se ha observado una duplicación del número de casos cada 10-20 años, suponiendo un problema de salud pública a nivel mundial (Figura 4)<sup>15,16</sup>.



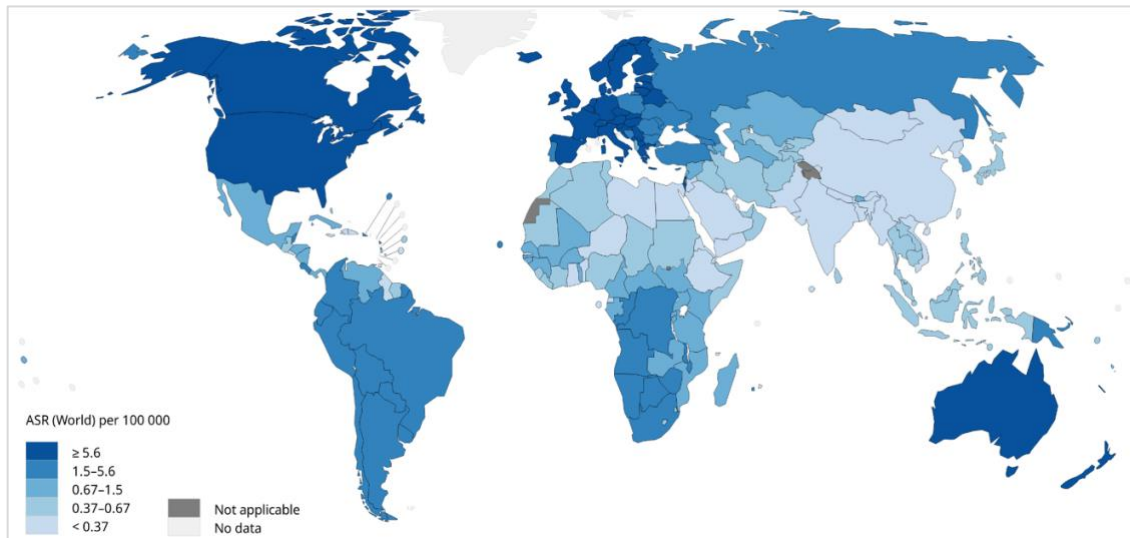
**Figura 4. Casos diagnosticados a nivel global por género.** Representación gráfica de los casos diagnosticados de los 20 tipos de cáncer con mayor incidencia en 2020. (Adaptada de *Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer*).

Este aumento de **incidencia** global podría deberse a diversos factores, por un lado, a un aumento de la intensidad de exposición a la radiación ultravioleta natural y artificial, y, por otro lado, debido al incremento de campañas y programas de detección precoz y concienciación que favorecen el diagnóstico de melanomas de crecimiento lento en estadio muy precoz que anteriormente podían pasar desapercibidos. Finalmente, también por el envejecimiento de la población<sup>17</sup>.

En 2020, fueron diagnosticados 324.635 pacientes por melanoma, siendo el 50.1% del total en Europa, principalmente en el Oeste de Europa (21.8%)<sup>15</sup>. En cuanto a la tasa de incidencia, la más alta la contempló Australia, con una tasa de 36.6 casos cada 100.000 habitantes/año, seguida del Noroeste de Europa con 20-30 casos cada 100.000 habitantes/año y de Estados Unidos con una tasa de 16.6 casos cada 100.000 habitantes/año. Esta enfermedad es muy poco

## 8 INTRODUCCIÓN

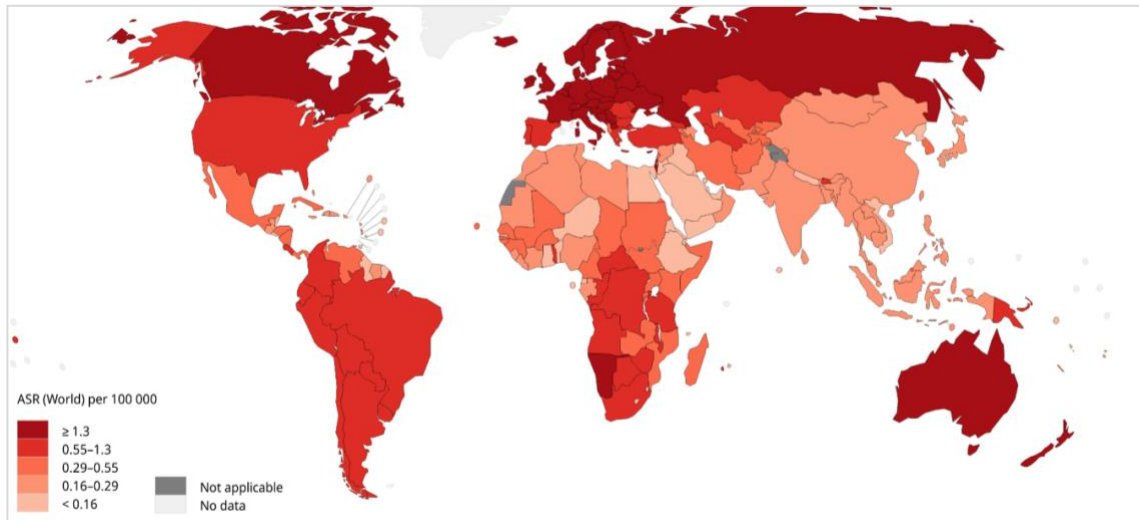
frecuente en la mayoría de países del continente africano, cuya tasa de incidencia es inferior a 1 caso cada 100.000 personas al año, y siendo casi en su totalidad del tipo lentiginoso acral (Figura 5)<sup>18</sup>.



**Figura 5. Tasas de incidencia global del melanoma ajustada por edad.** Imagen representativa de la tasa de incidencia global estimada de melanoma en 2020, ajustada por edad en ambos sexos. (Adaptado de *Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer.*)

En España, se estima que fueron diagnosticados 7.474 casos nuevos de melanoma en 2022, que corresponde a una incidencia de 16 cada 100.000 habitantes, siendo la incidencia de 15 y 17 casos por cada 100.000 habitantes en hombres y mujeres, respectivamente. En los últimos 10 años, la incidencia ha aumentado un 1.6% anual en hombres y un 2.5% en mujeres, diagnosticándose mayoritariamente (44% del total) en pacientes mayores de 65 años<sup>19,20</sup>.

La **mortalidad** fue de 57.043 personas a nivel mundial en el año 2020, siendo la tasa de mortalidad de 0.7 cada 100.000 habitantes/año en hombres y de 0.4 cada 100.000/año en mujeres. Nueva Zelanda tiene la tasa de mortalidad más alta con 4.7 muertes por cada 100.000 habitantes, seguida de Noruega con 3.2 cada 100.000. Aunque los datos reflejan una tasa de mortalidad inferior a otros tipos de tumor, el melanoma ocupa un 80% del total de muertes por cáncer de piel (Figura 6)<sup>15</sup>.



**Figura 6. Tasas de mortalidad global del melanoma ajustada por edad.** Imagen representativa de la tasa de mortalidad global estimada de melanoma en 2020, ajustada por edad en ambos sexos. (Adaptado de *Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer*).

Según los registros, las muertes por melanoma se vieron incrementadas en Estados Unidos en un 7.5% entre los años 1986 a 2013, sin embargo, tras la aprobación de nuevas terapias dirigidas e inmunoterapia a partir de 2011, la mortalidad ha disminuido en un 17.9% entre los años 2013 y 2016<sup>21,22</sup>.

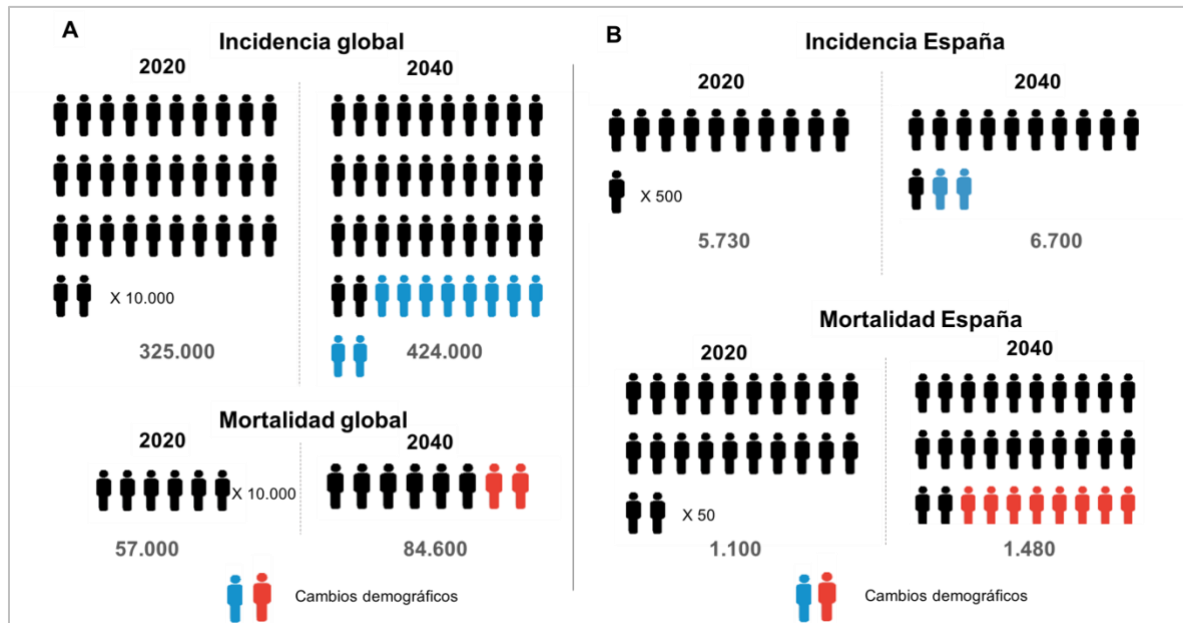
En España, en 2022, se registraron 1.079 muertes por melanoma, lo cual se corresponde con una tasa de mortalidad de 2.3 muertes por cada 100.000 personas/año, siendo la tasa de mortalidad de 2.8 y 1.8 cada 100.000 personas/año en hombres y mujeres, respectivamente. El 70% de estas muertes se dieron en el grupo de edad de mayores de 65 años. En el periodo entre 2002-2020, la tasa de mortalidad ajustada por edad cada 100.000 personas/año, sufrió un incremento anual del 0.4% en hombres y un descenso de un 0.4% en mujeres<sup>19</sup>.

### **1.3.2. Perspectivas futuras**

Si se mantienen las tasas de 2020, se estima que se aumentarán hasta 424.000 nuevos casos y hasta 84.600 muertes en 2040 a nivel mundial, lo que supone un incremento de un 30% en casos diagnosticados y un 48% en muertes, según los cambios demográficos previstos (*Figura 7A*)<sup>15,18</sup>.

En España, se estima que la incidencia sufrirá un incremento del 17% en el número de casos diagnosticados entre 2020 y 2040, pasando de 5.730 casos a 6.700 casos diagnosticados de melanoma. En cuanto a la tasa de mortalidad, sufrirá un incremento de un 34% tras pasar de

1.100 muertes (2020) a unas 1.480 (2040) según los cambios demográficos previstos (Figura 7B)<sup>15,23</sup>.



**Figura 7. Esquema representativo de las perspectivas futuras de incidencia y mortalidad en melanoma.** A) Incidencia (arriba) y mortalidad global (abajo) en 2020 y su estimación futura para 2040. B) Incidencia (arriba) y mortalidad en España (abajo) en 2020 y su estimación futura para 2040. (Adaptada de Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer).

### 1.3.3. Factores de Riesgo

El melanoma, como la mayoría de tumores malignos, tiene una etiología multifactorial, como consecuencia de interacciones entre factores individuales, dependientes de la susceptibilidad genética del propio individuo, y de factores ambientales<sup>16</sup>.

#### 1.3.3.1. Factores individuales

##### a) Características fenotípicas de la piel

Las características pigmentarias del individuo son un factor importante ante la susceptibilidad de padecer melanoma. Ciertas características fenotípicas de la piel, cabello y color de ojos están asociadas con un incremento de sensibilidad ante la radiación UV y por tanto con el desarrollo de melanoma.

Estas características fenotípicas diferenciales o fototipo cutáneo se encuentran recogidas en un sistema de clasificación clínica desarrollado por Thomas B. Fitzpatrick, basado en la sensibilidad



al eritema y capacidad de bronceado<sup>24</sup>. El fototipo refleja el grado de color de la piel, en relación al nivel de sensibilidad ante la radiación UV, siendo útil para clasificar el riesgo de padecer una transformación cutánea maligna fotoinducida. Por tanto, los individuos con piel pálida, ojos claros, pelo rubio o pelirrojo y con incapacidad para broncearse tienen una mayor susceptibilidad de desarrollar melanoma<sup>25</sup>.

El receptor de melanocortina 1 (MC1R, del inglés, *Melanocortin 1 receptor*) es un receptor transmembrana acoplado a proteína G, que se encuentra en la membrana de los melanocitos y cuya estimulación induce la síntesis de eumelanina. *MC1R* es un gen con más de 100 variantes polimórficas, lo cual podría explicar el amplio rango de fenotipos cutáneos existentes. Los melanocitos que expresan la secuencia consenso para MC1R, es decir, la más frecuente, tienen pigmentación oscura, sin embargo, se ha observado que algunos de los polimorfismos de dicho gen presentan variantes con pérdida de función, las cuales están relacionadas con fenotipos de piel clara y pelo rojo, determinado por un aumento de la síntesis de feomelanina. Este tipo de melanina, tiene menor capacidad de absorción de la radiación UV, y, por tanto, menor capacidad de protección del ADN, y, además favorece la generación de especies reactivas de oxígeno en presencia de radiación UV<sup>8,26</sup>.

#### b) Factores genéticos y antecedentes familiares

La mayoría de tumores son esporádicos, y ocurren tras acumular una serie de mutaciones que dan lugar a una transformación tumoral, pero aproximadamente en un 10% de los casos el riesgo al desarrollo de melanoma aumenta muy notablemente debido a la herencia de mutaciones germinales. No obstante, no todos los pacientes que tengan en herencia una mutación germinal terminarán desarrollando melanoma, sino que depende de la penetrancia del gen, así como de otros factores que incrementarán o disminuirán el riesgo.

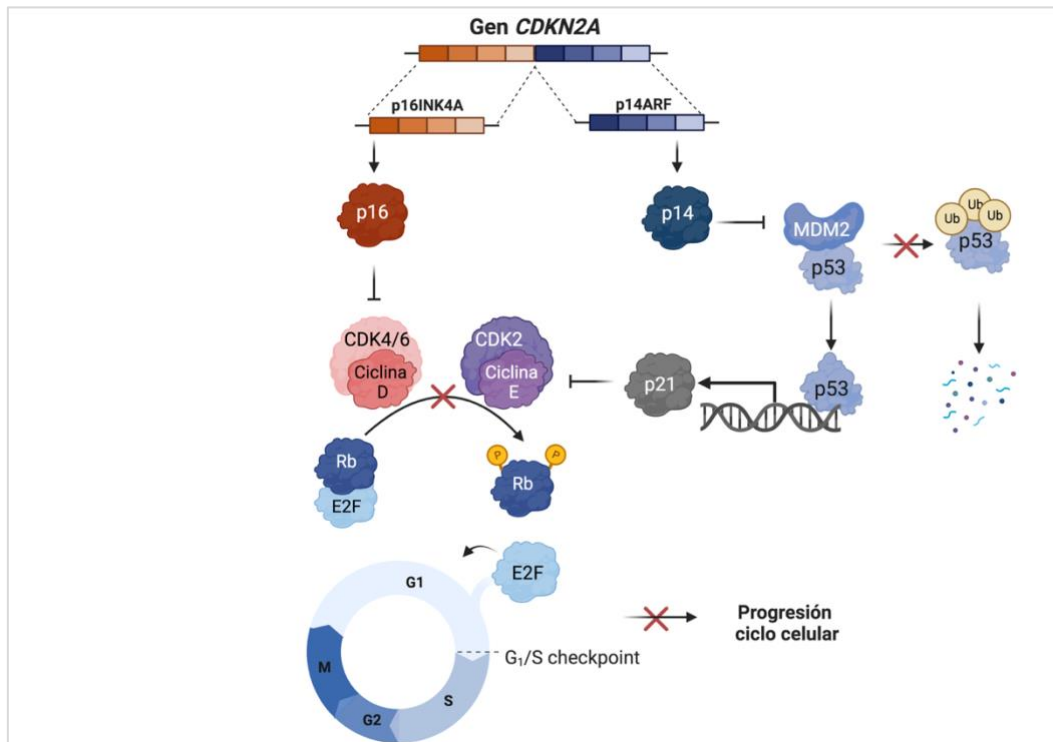
Se estima que en un 40-60% del total de pacientes con melanomas hereditarios diagnosticados (10% del total), fueron detectadas mutaciones germinales en el gen *CDKN2A*. En 1992, se reportó por primera vez, la existencia de mutaciones germinales en el gen *CDKN2A* en pacientes con el síndrome de melanoma familiar con lunares atípicos múltiples (FAMMM, del inglés, *familial atypical multiple mole melanoma*). Este síndrome tiene una herencia autosómica dominante, caracterizándose por la existencia de múltiples *nevi* melanocíticos (>50) y por antecedentes familiares con melanoma y/o cáncer de páncreas y otros tumores malignos<sup>17,26</sup>.

## 12 | INTRODUCCIÓN

El gen *CDKN2A* se localiza en el brazo corto del cromosoma 9 en el locus 9p21.3, y puede aparecer mutado o deleciónado. Este locus codifica para dos proteínas diferentes p14ARF y p16INK4A, en función del proceso de *splicing*. Ambas proteínas intervienen en el control del ciclo celular e interaccionan con dos supresores tumorales: la proteína del retinoblastoma (Rb) y p53. Aunque de forma diferente, ambos influyen en la progresión del ciclo celular, concretamente en el punto crítico de control de la fase G1 del ciclo, que precede a la de replicación del ADN (fase S). Por lo tanto, ambas proteínas son esenciales para evitar el progreso del ciclo celular en presencia de daño en el ADN, y su desregulación provoca un desajuste en puntos esenciales de control del ciclo (*Figura 8*)<sup>14,27</sup>.

La proteína p14ARF inhibe a MDM2 (del inglés, *murine double minute 2*) que se encuentra unido a p53 y lo regula negativamente. A continuación, p53 estimula la transcripción del gen *P21*, y éste evita el progreso del ciclo celular, mediante el bloqueo del complejo kinasa dependiente de ciclina 2 (CDK, del inglés, *cyclin-dependent kinase*) /ciclina E. Por otra parte, la proteína p16INK4A inhibe el complejo Ciclina D/CDK4, evitando la fosforilación de la proteína Rb por parte de dicho complejo, la cual permanece activa e impide que, el factor de transcripción E2F transcriba genes necesarios para la transición del ciclo celular a fase S<sup>27</sup>.

Las alteraciones germinales en el gen *CDK4* también han sido reportadas en pacientes en un 2-3% de los casos de pacientes con melanoma familiar. Este gen se localiza en el brazo corto del cromosoma 12, en locus 12q14, y codifica a la proteína CDK4, que es una kinasa responsable de la transición del ciclo celular de fase G1 a S mediante la fosforilación del factor de transcripción E2F. Algunas mutaciones reportadas en este gen, le permiten pasar de ser un protooncogen a un oncogén dominante, impidiendo que p16 se una a dicha proteína, provocando una proliferación descontrolada de la célula<sup>27</sup>.



**Figura 8. Función normal del gen *CDKN2A* en el ciclo celular.** Esquema representativo de la función del gen *CDKN2A*, un gen supresor de tumores, cuyos transcritos *p16INK4A* y *p14ARF* inhiben la progresión del celular, y que se encuentra ampliamente mutado/deleciónado en melanoma cutáneo. (Creado con BioRender.com)

Otro gen que se encuentra alterado en el melanoma familiar es *TERT*, una ribonucleoproteína que actúa como transcriptasa inversa, evitando el acortamiento de los telómeros en cada replicación. No obstante, en la mayoría de células del organismo, los telómeros se acortan, siendo necesarias solo en algunas células del organismo. El mantenimiento de la longitud de los telómeros es característica de muchos tipos de tumores, incluyendo el melanoma<sup>28</sup>.

Otros genes involucrados en la susceptibilidad a padecer melanoma hereditario son *POT1*, *MC1R*, *MIF* y *BAP1*<sup>27</sup>. No obstante, aunque estos genes se hayan asociado al melanoma familiar, también pueden aparecer alteraciones en los mismos en casos de melanoma esporádico (Tabla 1).

GEN	PROTEÍNA	FUNCIÓN	IMPACTO EN LA FUNCIÓN CELULAR
<i>CDKN2A</i>	p14ARF	Inhibición de la interacción p53-MDM2	Regulador negativo del ciclo celular
<i>CDKN2A</i>	p16INK4A	inhibidor de la interacción Ciclina D-CDK4/6	Regulador negativo del ciclo celular
<i>CDK4</i>	CDK4	Fosforilación de Rb	Regulador positivo del ciclo celular
<i>TERT</i>	TERT	Mantenimiento de la longitud de los telómeros	Proliferación
<i>POT1</i>	POT1	Parte del complejo Shelterin	Protección de los telómeros
<i>MC1R</i>	MC1R	Activador de la adenilato ciclasa	Síntesis de melanina
<i>MITF</i>	MITF	Factor de transcripción de la tirosina kinasa	Desarrollo y diferenciación de melanocitos
<i>BAP1</i>	BAP1	Proteína desubiquitinadora	Regulación del ciclo celular, reparación del ADN y apoptosis

**Tabla 1. Resumen general de los genes implicados en la susceptibilidad genética al melanoma cutáneo.** *CDKN2A* (Inhibidor de la kinasa dependiente de ciclina 2A), *CDK4* (Kinasa dependiente de ciclina 4), *TERT* (Telomerasa transcriptasa inversa), *POT1* (Protector de telómeros 1), *MC1R* (Receptor de melanocortina 1), *MITF* (Factor de transcripción asociado con microftalmia), *BAP1* (Proteína 1 asociada a BRCA1). (Adaptado de Šerman et. al 2022).

#### c) Inmunosupresión

Los pacientes con el sistema inmune (SI) debilitado, así como pacientes que necesitan terapia inmunosupresora tras recibir el trasplante de un órgano sólido, tienen un riesgo incrementado de sufrir melanoma. También existe un riesgo superior en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), leucemia, o con cualquier trastorno que comprometa la inmunosupresión del SI<sup>29,30</sup>.

El melanoma es un tumor muy inmunogénico y que presenta gran infiltración inmune, sin embargo, también es un tumor que desarrolla múltiples mecanismos para evadir al sistema inmunitario, por lo que un estado de inmunosupresión facilitaría la progresión tumoral<sup>31</sup>.

#### d) Presencia de *nevi* e historia previa de melanoma

La presencia de *nevi* melanocíticos es un factor de riesgo para el desarrollo de melanoma. Se consideran que los factores genéticos, la función inmunitaria y la exposición a la radiación UV, son factores determinantes para la proliferación de *nevi*. El número total de *nevi* de un individuo confiere mayor riesgo de melanoma, incrementándose el riesgo si se tratan de *nevi* displásicos o atípicos<sup>17</sup>. El riesgo de desarrollar melanoma es aproximadamente 1.5 veces

superior en personas que presentan entre 11-25 *nevi*, siendo este riesgo duplicado cuando existe un número superior a 25 *nevi*<sup>16</sup>.

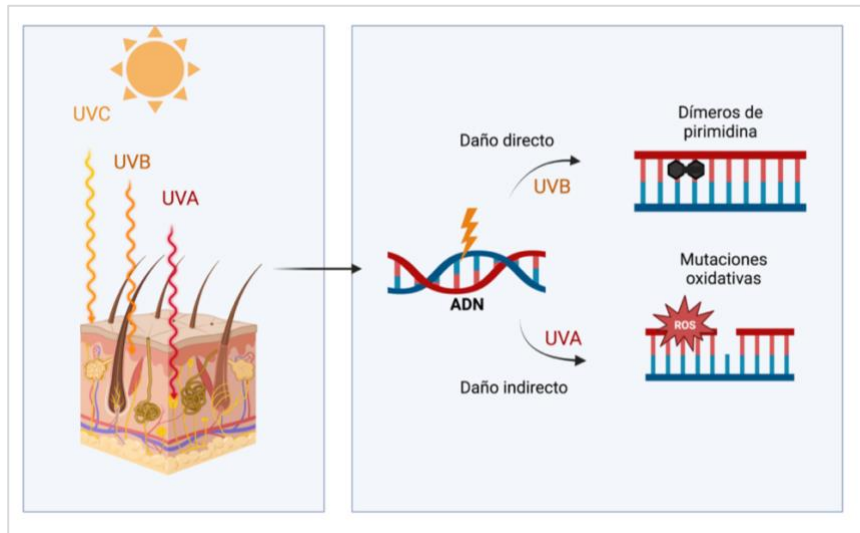
Los antecedentes de haber sufrido un melanoma previo se asocian a un riesgo incrementado de sufrir otro melanoma, siendo el riesgo aún mayor durante el primer año tras el diagnóstico. Según estudios previos, tras analizar una base de datos de 16.591 supervivientes de MC, se encontró que estos pacientes presentan un 32% superior de riesgo de desarrollar un segundo tumor, siendo mayor para el desarrollo de un segundo melanoma<sup>32</sup>.

### 1.3.3.2. Factores ambientales

En 1992, la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC, del inglés *International Agency of Research on Cancer*) clasificó la radiación UV como carcinógeno en humanos, basado en la evidencia sustancial en investigaciones básicas y experimentales<sup>16</sup>. Se estima que el alrededor del 60% de melanomas son causados por la radiación UV.

El sol emite radiación UVA (320-400 nm), UVB (280-315 nm), y UVC (200-280 nm), aunque esta última es absorbida por la capa de ozono antes de llegar a la superficie terrestre. Tanto la radiación UVA como la UVB, intervienen en el desarrollo de melanoma, no obstante, el 98.7% de radiación UV que llega a la superficie es UVA<sup>17</sup>. Mientras que la radiación UVB provoca daño directo en el ADN mediante la formación de dímeros de pirimidina, la radiación UVA penetra 5 veces más profundo en la piel, provocando daño indirecto mediante la formación de radicales libres de oxígeno y peróxido de hidrógeno que dañan el ADN (*Figura 9*)<sup>33</sup>.

Existen principalmente dos patrones de exposición a la radiación, la exposición solar intermitente y la exposición solar crónica, teniendo ambas exposiciones efectos diferenciales en el desarrollo de transformaciones malignas. En cuanto a la exposición intermitente se han observado mutaciones con firma UV, sustituciones C-T y dímeros CC-TT, así como mutaciones predominantes en los genes *BRAF*, *NRAS* y *TERT*, junto con otros genes de la vía de transducción RAS-BRAF<sup>33</sup>. Este tipo de exposición está relacionada con melanomas que se desarrollan en población más joven, generalmente en el tronco y las piernas, y se asocia a la presencia de *nevi* preexistentes. En cambio, la exposición solar crónica, está relacionada con alteraciones en *TP53*, apareciendo en población envejecida, en zonas de exposición solar crónica como son la cara y el cuello y no se asocian a la existencia previa de *nevi*<sup>34</sup>.



**Figura 9. Esquema de los tipos de radiación UV y los tipos de daños al ADN.** Las radiaciones UVA y UVB penetran a diferentes profundidades en la piel, pudiendo provocar daño directo (UVB) dando lugar a dímeros de pirimidina, y/o daño indirecto (UVA), dando lugar a mutaciones provocadas por radicales libres de oxígeno (ROS). (Creada con BioRender.com).

Por otro lado, el bronceado artificial es una práctica cada vez más extendida y que incrementa el riesgo de desarrollar melanoma de un 16% a 20% aproximadamente. También la exposición a radiación en tratamientos médicos, tales como la fototerapia, pueden contribuir al desarrollo de este tumor<sup>29</sup>.

Existen otros factores de riesgo no relacionados con características intrínsecas del individuo ni con la exposición a radiación UV, sobre los cuales se hipotetiza que podrían tener una relación etiológica con algunos tipos de melanoma, pero aún se necesitan más estudios confirmatorios. Estos factores podrían ser la exposición a químicos, traumatismos o estrés físico según la profesión u otras situaciones<sup>35</sup>.

## 1.4. DIAGNÓSTICO, ESTADIAJE Y TRATAMIENTO

### 1.4.1. Diagnóstico y estadificación

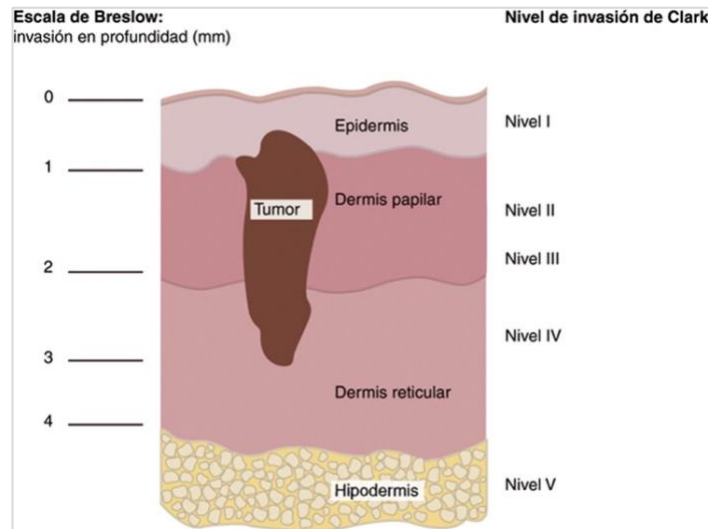
La detección temprana del melanoma es crítica para reducir la probabilidad de diseminación de la enfermedad, y de esta forma aumentar la tasa de supervivencia en los pacientes. En 1985, se desarrolló el criterio de diagnóstico clínico 'ABCDE', cuyo acrónimo se corresponde con **A**simetría-Irregularidad en los **B**ordes-variación de **C**olor, **D**íámetro >6 mm y **E**volución. Este criterio resultó ser una herramienta simple y útil ante la población y profesionales de atención primaria para diferenciar *nevi* benignos de lesiones cutáneas más sospechosas. No obstante, el examen histopatológico es el '*gold standard*' para confirmar el diagnóstico de melanoma<sup>36</sup>.

En la década de los 60, Wallace Clark revolucionó la clasificación del melanoma basando dicha clasificación en las características histológicas del tumor. Clark propuso un sistema de evaluación basado en la profundidad de invasión de las células de melanoma en la dermis y el tejido adiposo subcutáneo, dividiendo la piel en diversos niveles o compartimentos, en los que el riesgo de enfermedad diseminada aumentaba conforme las células iban traspasando dichos compartimentos. Los niveles de invasión de Clark fueron<sup>37</sup>:

- Nivel I: las células de melanoma se encuentran limitadas a la epidermis.
- Nivel II: invasión de células individuales o de pequeños grupos de células en la dermis papilar.
- Nivel III: las células se expanden en la dermis papilar.
- Nivel IV: invasión de la dermis reticular.
- Nivel V: invasión del tejido adiposo subcutáneo (hipodermis).

Sin embargo, en 1970, Alexander Breslow desarrolló un método más preciso para clasificar el melanoma basado en una medida del grosor del tumor en milímetros, en vez de en compartimentos anatómicos de la piel, ya que éstos podían variar en función de la zona anatómica. En un primer momento, la clasificación fue la siguiente (*Figura 10*)<sup>38</sup>:

- Estadio I: menor o igual a 0.75 mm
- Estadio II: 0.76 – 1.5 mm
- Estadio III: 1.51 – 2.25 mm
- Estadio IV: 2.26 – 3.0 mm
- Estadio V: mayor de 3.0 mm



**Figura 10. Esquema de la escala de Breslow y nivel de invasión de Clark.** Corte sagital de la piel con la escala de Breslow (izquierda) en milímetros y el nivel de invasión de Clark (derecha) en niveles del I-V. (Adaptada de Duflo et. al 2008).

Breslow demostró que los pacientes con estadio I y II, tenían mucho mejor pronóstico y menor riesgo de desarrollar metástasis regionales y a distancia. Posteriormente, esta escala fue modificada, siendo uno de los mejores predictores independiente del pronóstico de los pacientes. Ambas escalas, de Breslow y Clark, fueron utilizadas indistintamente por diferentes patólogos, y se observaron variaciones en cuanto a la predicción del pronóstico.

En 1977, *The American Joint Committee on Cancer* (AJCC) publicó la primera edición de clasificación según el TNM (**T**umor, **N**ode o ganglio linfático y **M**etástasis) en la que se llegó un consenso en la clasificación de los tumores. La mayoría de tumores, incluido el melanoma, tiene su propia clasificación mediante el TNM, a través del análisis de múltiples bases de datos de pacientes y, que constantemente se mantiene actualizada. El sistema de estadificación elaborado por la AJCC sirve de guía a clínicos y patólogos para la clasificación del melanoma combinando características del tumor primario (T), la presencia de enfermedad regional en ganglios linfáticos(N), y la presencia de metástasis a distancia (M).

Actualmente, el manual de referencia es la 8ª edición del sistema de clasificación de la AJCC, implementada en 2018, la cual incluye mejoras respecto a la 7ª edición en referencia a la medición del grosor del tumor, la eliminación de la actividad mitótica ( $n^{\circ}$  de mitosis/ $mm^2$ ) en la estadificación de los tumores de bajo grosor, la ampliación de categorías de ganglios linfáticos regionales en función de los ganglios linfáticos positivos, la ampliación de las categorías de las metástasis en función de la ubicación y la ampliación de los grupos en el estadio III, para así estratificar mejor el pronóstico a largo plazo (Tabla 2)<sup>39</sup>.



TNM del AJCC para el melanoma (8.ªed)			
T	TX	Tumor primario no puede ser determinado	
	T0	Sin evidencia de tumor primario	
	Tis	melanoma <i>in situ</i>	
	T1	≤1mm	a (<0,8 mm sin ulceración)
			b (<0,8mm con ulceración o 0,8-1mm con o sin ulceración)
	T2	>1mm-2mm	a (sin ulceración)
			b (con ulceración)
	T3	>2mm-4mm	a (sin ulceración)
			b (con ulceración)
	T4	>4mm	a (sin ulceración)
b (con ulceración)			
N	NX	Afectación ganglionar no puede determinarse (extirpación previa por otro motivo, hábito corporal...)	
	N0	Ausencia de afectación ganglionar clínica/radiológica	
	N1	N1a: micrometástasis <b>en un ganglio</b> linfático (clínicamente oculto)	
		N1b: ganglio linfático clínicamente detectado	
		N1c: metástasis en tránsito, satélites o microsátélites sin afectación ganglionar	
	N2	N2a: micrometástasis <b>en 2 o 3 ganglios</b> (clínicamente ocultos)	
		N2b: metástasis <b>en 2 o 3 ganglios</b> linfáticos	
		N2c: metástasis en un ganglio (oculta o clínica) y metástasis en tránsito, satélites o microsátélites	
	N3	N3a: <b>4 o más</b> micrometástasis en ganglios linfáticos	
		N3b: <b>4 o más</b> metástasis en ganglios linfáticos, al menos una de ella clínicamente evidente o presencia de <b>conglomerado adenopático</b>	
N3c: 2 o más micrometástasis o metástasis ganglionares clínicamente detectables o presencia de conglomerado adenopático y <b>metástasis en tránsito, satélites o microsátélites</b>			
M	M0	Sin evidencia de metástasis ganglionares	
	M1	<b>M1a:</b> metástasis a distancia en <b>piel, tejidos blandos</b> (incluyendo músculo) <b>y/o ganglios linfáticos no regionales</b> - M1a(0): LDH normal - M1a(1): LDH elevada	
<b>M1b:</b> metástasis <b>pulmonares</b> con/sin M1a - M1b(0): LDH normal - M1b(1): LDH elevada			
<b>M1c:</b> metástasis a distancia en <b>órganos distintos del SNC</b> con/sin M1a y M1b - M1c(0): LDH normal - M1c(1): LDH elevada			
<b>M1d:</b> metástasis al <b>SNC</b> con/sin M1a, M1b o M1c - M1d(0): LDH normal - M1d(1): LDH elevada			

Tabla 2. Clasificación TNM de la AJCC para el melanoma cutáneo (8ª edición). (Adaptada de Cañueto et.al 2017)

La información del TNM se condensa en cinco grupos que abarcan desde el Estadio 0 que incluye a los pacientes con melanoma *'in situ'*, hasta al estadio IV en el que el tumor ha avanzado y los pacientes tienen metástasis a distancia. Estos estadios se asocian con unas tasas de supervivencia que varían entre los diferentes estadios (Tabla 3)<sup>40,41</sup>.

Sistema de estadificación TNM del AJCC para el melanoma (8.ªed.)			
Tis	N0	M0	Estadio 0
T1a-T1b	N0	M0	Estadio IA
T2a	N0	M0	Estadio IB
T2b-T3a	N0	M0	Estadio IIA
T3b-T4a	N0	M0	Estadio IIB
T4b	N0	M0	Estadio IIC
T0	N1b/1c	M0	Estadio IIIB
T0	N2b/2c, N3b/3c	M0	Estadio IIIC
T1a/b- T2a	N1a, N2a	M0	Estadio IIIA
T1a/b- T2a	N1b/1c, N2b	M0	Estadio IIIB
T2b/T3a	N1a-N2b	M0	Estadio IIIB
T1a/T3a	N2c/N3a, b,c	M0	Estadio IIIC
T3b/T4a	N1-N3	M0	Estadio IIIC
T4b	N1a-N2c	M0	Estadio IIIC
T4b	N3a/b/c	M0	Estadio IIID
Cualquier T, Tis	Cualquier N	M1	Estadio IV

Tabla 3. Sistema de estadificación TNM del AJCC para el melanoma (8ª edición). (Adaptada de Cañueto et al. 2017).

#### 1.4.2. Tratamiento

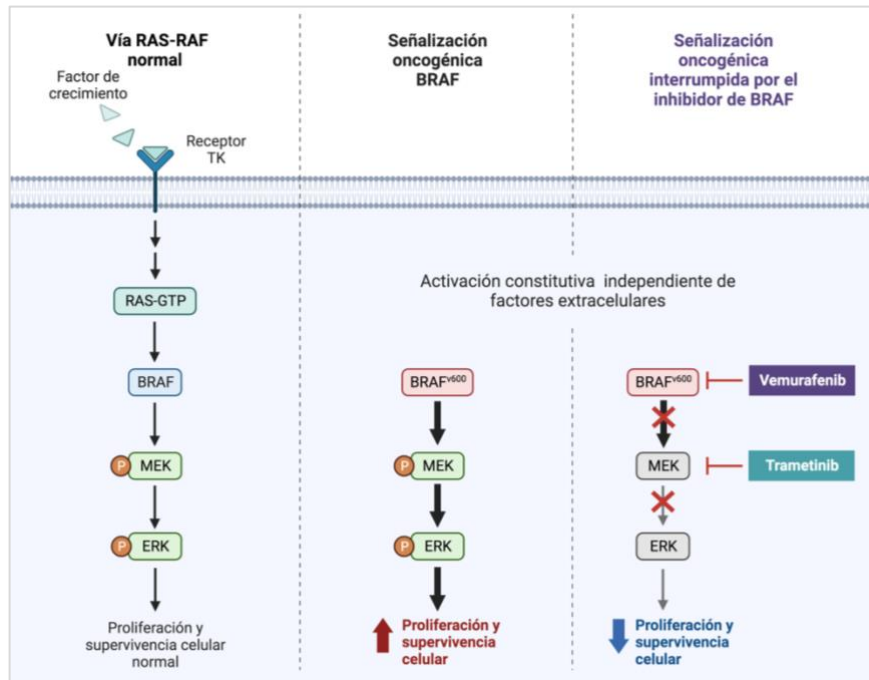
La resección quirúrgica local del tumor y los márgenes libres de enfermedad del mismo, son el tratamiento de elección para melanomas localizados. En el caso de que el tumor sea de un grosor superior a 0.8 mm o de grosor inferior, pero presenta ulceración, se lleva a cabo la biopsia del ganglio centinela. En el caso de que ésta sea positiva, hace unos años siempre se realizaba una resección completa de los ganglios linfáticos de la zona<sup>39</sup>. No obstante, a raíz de la publicación en 2017 de los resultados de diversos estudios, entre ellos el más destacado el ensayo clínico en fase 3 “MSLT-II”, el tratamiento quirúrgico ganglionar inicial del melanoma ha sufrido un gran cambio. En estos ensayos se analizó la supervivencia de pacientes con ganglio centinela positivo con disección ganglionar inmediata respecto a la observación. Se demostró que la disección ganglionar inmediata en pacientes con ganglio centinela positivo no mejoraba

la supervivencia con respecto a la observación y disección ganglionar terapéutica en el momento en que se detectaron metástasis ganglionares mediante la exploración física o técnicas de imagen (ecografía de zonas de drenaje linfático en el seguimiento)<sup>42</sup>. Por ello, la linfadenectomía selectiva se ha abandonado en los pacientes con ganglio centinela positivo, excepto en casos especiales. Sin embargo, el estudio del ganglio centinela sigue llevándose a cabo ya que proporciona información pronóstica importante y permite seleccionar pacientes candidatos a tratamiento adyuvante.

Aunque, en caso de diagnóstico temprano, en alrededor de un 80% de los pacientes la enfermedad puede ser resuelta mediante cirugía, los pacientes con un alto grosor del tumor primario y/o con enfermedad avanzada pueden necesitar tratamientos adyuvantes como terapias dirigidas o inmunoterapia<sup>39</sup>.

En 1975, fue aprobado por la FDA el primer quimioterapéutico para el tratamiento de melanoma metastásico, la **Dacarbazina**, mediante el cual los pacientes tenían una tasa de supervivencia de 1 año de solo el 27%. El desarrollo de nuevos tratamientos ha mejorado el pronóstico de estos pacientes, y la quimioterapia ha dejado de usarse, siendo sustituida por terapias dirigidas e inmunoterapia<sup>43</sup>.

La terapia dirigida más utilizada en melanoma se lleva a cabo mediante la **inhibición de BRAF<sup>V600E</sup>**, mutación que ocurre en aproximadamente entre el 40-50% de los pacientes con melanoma. Los principales inhibidores de BRAF (BRAFi, del inglés, *BRAF inhibitor*) son Vemurafenib, Dabrafenib que fueron aprobados por la FDA para el tratamiento de melanoma avanzado con mutación *BRAF<sup>V600E</sup>*, entre 2011 y 2013<sup>44</sup>. Aunque son muy efectivos en un primer momento, un gran número de pacientes desarrollan resistencias secundarias a dicha terapia de forma progresiva en un periodo de 6-8 meses. Así que, actualmente se suelen tratar los pacientes con terapias combinadas BRAFi (los fármacos mencionados anteriormente o más recientemente Encorafenib) e inhibidores de MEK (MEKi, del inglés, *MEK inhibitor*), de la vía MAPK, aunque hay resultados muy efectivos en primera instancia, siguen apareciendo recidivas en la mayoría de los pacientes con melanoma metastásico (*Figura 11*)<sup>45</sup>.



**Figura 11. Mecanismo de acción de los BRAFi y MEKi.** Esquema representativo de la activación normal de la vía MAPK (izquierda), así de su funcionamiento aberrante tras la mutación en BRAF (centro), y su posterior inhibición con BRAFi y/o con Trametinib, un MEKi (derecha). (Creado con BioRender.com)

Sin embargo, la **inmunoterapia** ha sido el hallazgo más importante para el tratamiento de melanoma metastásico en los últimos 30 años. El melanoma tiene una tasa de mutaciones muy alta y, esto en consecuencia, da lugar a una amplia variedad antigénica. Los antígenos expresados en las células de melanoma, son presentados mediante moléculas de histocompatibilidad tipo I (MHC-I) y reconocidos por el receptor de célula T (TCR, del inglés, *T-cell receptor*) que se encuentran en la superficie de linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTLs, del inglés, cytotoxic T lymphocytes), que eliminan directamente las células tumorales. Por otra parte, las células presentadoras de antígenos (CPA), como los macrófagos o células dendríticas, presentan los antígenos tumorales en el complejo de histocompatibilidad tipo II (MHC-II), a los linfocitos T CD4+ *helper* (*Th*) o colaboradores que permiten el desarrollo de una respuesta inmune (RI) específica.<sup>39,46</sup>

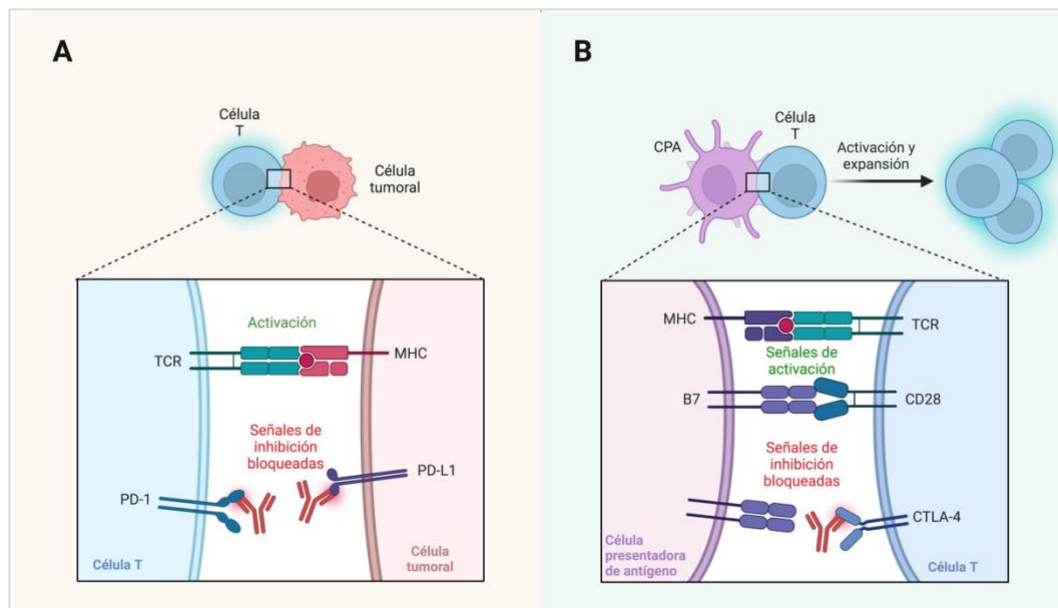
No obstante, la tasa elevada de mutaciones comentada anteriormente, también permite al tumor un desarrollo acelerado de mecanismos de evasión del SI. Algunos de los mecanismos son, reducir los niveles de MHC-I de la superficie celular, la secreción de moléculas inhibitorias del SI o de citoquinas inmunosupresoras como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF-

$\beta$ , del inglés *transforming growth factor*  $\beta$ ). Otra forma de evasión, es mediante la manipulación de los *checkpoints* o puntos de control inmunitarios<sup>39</sup>.

Cuando los receptores de los linfocitos T (*TCR*, del inglés, T-cell receptor) reconocen los antígenos de superficie de las células tumorales, se da una activación para proceder a su eliminación. Aunque cuando las células T se activan, también es necesario una señal de inhibición para evitar una sobreactivación del SI. Así que en la superficie de las células T, existe una proteína llamada proteína de muerte programada 1 (PD1, del inglés, *programed cell death protein 1*), la cual reconoce al ligando PD-L1/2 en la superficie de las células somáticas. Cuando se da lugar la unión receptor-ligando, se produce una inhibición del sistema inmune y una consecuente inducción a la apoptosis de células T maduras, promoviendo la auto-tolerancia y evitando la autoinmunidad. Este mecanismo protege a los tejidos de la RI exacerbada, descontrolada y/o errónea, sin embargo, el tumor sobreexpresa PD-L1/2, para de esta forma evadir la acción del SI<sup>39,47</sup>.

Es por ello que la terapia más efectiva y utilizada es la de **inhibidores de puntos de control del SI**, que fueron aprobados en 2011 y que supuso una disminución acentuada de la mortalidad por melanoma metastásico<sup>22</sup>. Los principales inhibidores son anticuerpos que bloquean PD1, PD-L1/2 y la proteína asociada a linfocito T citotóxico 4 (CTLA-4, del inglés, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*). CTLA-4, se comporta de forma similar que PD1, es una proteína que se expresa de forma constitutiva en linfocitos T y reconocen a la molécula B7-1/2 en las células dendríticas, produciéndose una inhibición del SI. Sin embargo, si CTLA-4 es bloqueado, B7-1/2 se une a CD28 en la superficie del linfocito T, y se produce la estimulación del SI (*Figura 12*)<sup>48</sup>.

Los inhibidores de puntos de control del SI aprobados para su uso en melanoma avanzado, son tres: nivolumab y pembrolizumab como inhibidores de PD-1, y ipilimumab como inhibidor de CTLA-4<sup>49</sup>. Nivolumab presentó una tasa de respuesta superior al 40%, y una tasa de supervivencia a los 12 meses del 73%; por otro lado, el pembrolizumab tuvo una tasa de respuesta de alrededor del 38% y una supervivencia del 74% a los 12 meses. El tratamiento con ipilimumab presentó una supervivencia de hasta 10 años en el 20% de los casos, en comparación con la tasa media de supervivencia de 1 año en pacientes con estadio IV.<sup>50</sup> La tasa de respuesta combinando ipilimumab y nivolumab incrementó a un 57%, y la progresión libre de enfermedad fue de 11.5 meses<sup>51</sup>.



**Figura 12. Mecanismo de acción de los inhibidores de puntos de control del SI.** Esquema representativo de la inhibición de PD-L1/PD-1(A) y CTLA-4 (B) mediante anticuerpos bloqueantes, y la posterior activación de la célula T tras esta inhibición. (Creado con BioRender.com).

No obstante, aunque el avance en el tratamiento del melanoma avanzado con inmunoterapia es evidente, el número de pacientes que obtienen opciones de tratamiento son limitados debido a la resistencia primaria ante los inhibidores de *checkpoints* del SI, así como a resistencias secundarias o a toxicidad asociada. El papel de la genética tumoral, de los componentes del microambiente tumoral y factores sistémicos del huésped pueden tener un rol esencial en la respuesta y toxicidad ante estos tratamientos. Por lo tanto, es necesario la realización de futuros estudios para comprender la actuación de estos factores y desarrollar terapias acordes a dichos factores, enfocados a una medicina personalizada para mejorar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes<sup>52</sup>.

### 1.5. CLASIFICACIÓN CLINICOPATOLÓGICA DEL MELANOMA CUTÁNEO

Las variantes del MC primario han sido clasificadas de forma clásica en cuatro principales subtipos. Las principales diferencias se basan en el patrón de crecimiento, aunque el pronóstico es similar para los cuatro subgrupos cuando se normaliza por el grosor Breslow al momento del diagnóstico y tratamiento.

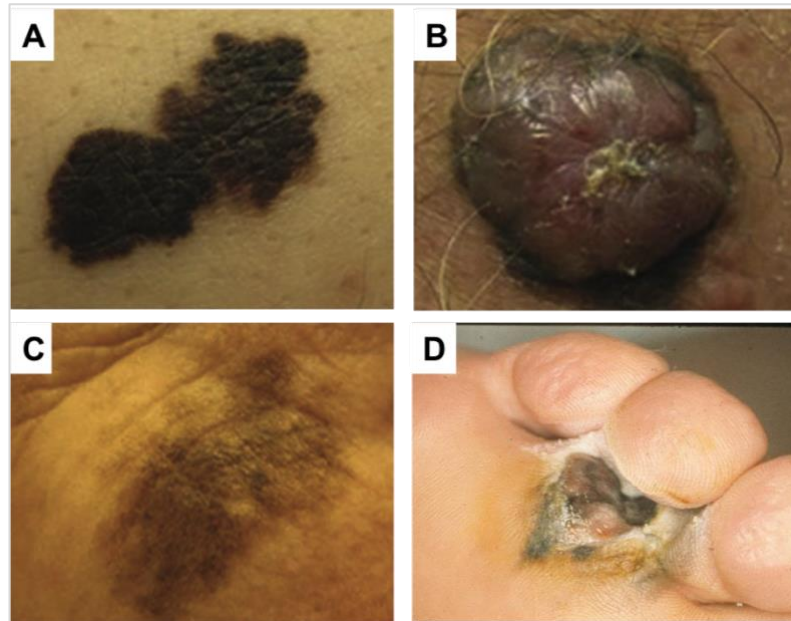
El **melanoma de extensión superficial** (MES) es diagnosticado en un 60-70% de los casos respecto del total de casos de melanoma, en población caucásica. Este tipo de melanoma presenta una fase de crecimiento radial prolongada en el tiempo, caracterizada por una invasión intraepidérmica que se sucede con una fase de crecimiento vertical con invasión dérmica y bajo pronóstico. Está relacionado con la exposición solar intermitente, y con la presencia de *nevi* melanocíticos o displásicos previos. Aunque en un inicio, a nivel clínico es indistinguible de un *nevus* benigno, de forma progresiva van desarrollando las características de la regla 'ABCDE'. A nivel genético, la mutación más característica del MES es la mutación *BRAF*<sup>V600E</sup> (Figura 13A)<sup>4,53</sup>.

El **melanoma nodular** (MN) representa un 15-20% del total de melanomas diagnosticados, aunque son responsables de alrededor del 40% de las muertes por melanoma<sup>54</sup>. Es un tumor de crecimiento rápido, y solo presenta una fase de crecimiento vertical, en ausencia de fase de crecimiento radial. Por lo tanto, aunque presenten un pequeño tamaño, suele ser diagnosticado con un Breslow significativamente alto (Figura 13B)<sup>4</sup>.

El **melanoma sobre lentigo maligno** (LMM, del inglés, *lentigo malignant melanoma*) representa un 4-10% de los melanomas diagnosticados y se da principalmente en población envejecida en zonas con exposición solar crónica<sup>54</sup>. Tiene como origen un lentigo maligno previo (considerado actualmente como un verdadero melanoma *in situ*), que presenta un crecimiento lento y que cambia de marrón a una mácula negra con bordes irregulares (Figura 13C)<sup>4</sup>. Su frecuencia ha aumentado mucho en las últimas décadas a nivel mundial; en Cataluña, desde un 6,9% de todos los melanomas cutáneos en 2000 hasta un 22,6% en 2017, según datos de la "Xarxa de melanoma de Catalunya"<sup>55,56</sup>.

El **melanoma lentiginoso acral** (MLA) representa un 2-8% del total de melanomas diagnosticados, y se da en las palmas de las manos, plantas de los pies y de forma subungueal<sup>54</sup>. La incidencia relativa del MLA es predominante en personas con piel oscura, que casi no sufren otros tipos de melanoma, y a nivel clínico presenta cambios graduales en tamaño, forma y color,

de forma similar al MES y al LMM. El desarrollo de MLA no se ha relacionado con exposición UV, de hecho, tiene un número bajo de mutaciones puntuales, pero una alta variación del número de copias. El presente trabajo se centra en este tipo de melanoma, en el cual se profundizará en los próximos apartados (*Figura 13D*)<sup>4,57</sup>.



**Figura 13. Subtipos clínicos de melanoma cutáneo.** (A) Melanoma de extensión superficial (MES), (B) Melanoma nodular (MN), (C) Melanoma sobre lentigo maligno (LMM) y (D) melanoma lentiginoso acral (MLA). (*Adaptado de Stephen et.al 2021; Servicio de Dermatología del Hospital Universitari Arnau de Vilanova (HUAUV) de Lleida*)

En 2018, la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una clasificación multidimensional del MC<sup>58</sup> basada en si el tumor se había originado a partir de daño solar acumulativo (CSD, del inglés, *cumulative sun damage*) o si el origen no era consistente con el daño solar acumulativo (non-CSD, del inglés, *non-cumulative sun damage*), en relación a su firma mutacional, lugar anatómico y epidemiología. Los melanomas del grupo CSD, fueron divididos en bajo y alto CSD, según el grado de elastosis solar (envejecimiento provocado por la radiación UV). El grupo de melanoma de bajo CSD incluyó al MES, y el de alto CSD al melanoma LMM y al melanoma desmoplásico. La categoría non-CSD incluyó a melanomas acrales, melanomas Spitz, melanomas mucosos, melanomas en nevus azules, melanomas en nevus congénitos y uveales. Como categoría aparte, se incluyó el MN, ya que puede ocurrir en cualquiera de las vías (*Tabla 4*)<sup>53,59</sup>.



Relación con la exposición solar	Vía	Subtipo	Background genético
Melanoma en zonas expuestas a radiación solar	1	Bajo CSD/MES	Alta frecuencia de mutación <i>BRAF<sup>V600E</sup></i>
	2	Alto CSD (incluyendo LMM, MN de alto CSD)	Predominancia de mutaciones mutuamente excluyentes en <i>NF1</i> , <i>NRAS</i> y <i>BRAF<sup>non-V600E</sup></i> , y mutaciones en <i>KIT</i> .
	3	Melanoma desmoplástico	Mutaciones recurrentes inactivadoras en <i>NF1</i> , mutaciones promotoras en <i>NFKBIE</i> , y en diferentes mutaciones activadoras de la vía MAPK (ej.: <i>MAP2K1</i> )
Melanoma en zonas no expuestas a la radiación solar o sin asociación etiológica conocida con la radiación UV	4	Melanoma de Spitz	Mutaciones en <i>HRAS</i> y fusiones de kinasa en <i>ROS1</i> , <i>NTRK1</i> , <i>NTRK2</i> , <i>ALK</i> , <i>BRAF</i> , <i>MET</i> y <i>RET</i> ; deleciones homocigotas en <i>CDKN2A</i> , mutaciones promotoras en <i>TERT</i> y fusiones/truncamientos en <i>MAP3K8</i> solo en variantes letales o agresivas.
	5	Melanoma acral (incluyendo MN en zona acral)	Amplificaciones múltiples en <i>CCND1</i> , <i>KIT</i> y <i>TERT</i> ; mutaciones en <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> y <i>KIT</i> ; fusiones de kinasa de <i>ALK</i> o <i>RET</i> en pocos casos.
	6	Melanoma mucoso	Numerosas variaciones del número de copias y estructurales; de forma infrecuente mutaciones en <i>KIT</i> y <i>NRAS</i> .
	7	Melanoma sobre nevus congénito	En nevus grandes y gigantes: mutaciones <i>NRAS</i> ; en pequeños y medianos, mutaciones en <i>BRAF</i> .
	8	Melanoma sobre nevus azul	Mutaciones iniciadoras en la vía de señalización Gαq ( <i>GNAQ</i> , <i>GNA11</i> , <i>CYSLTR2</i> , <i>PLCB4</i> ); monosomía 3 y ganancias en el cromosoma 8q en casos agresivos; aberraciones adicionales secundarias en <i>SF3B1</i> y <i>EIF1AX</i> .
	9	Melanoma uveal	Mutaciones mutuamente excluyentes en la vía de señalización Gαq ( <i>GNAQ</i> , <i>GNA11</i> , <i>CYSLTR2</i> , <i>PLCB4</i> ); mutaciones en <i>BAP1</i> , <i>SF3B1</i> y <i>EIF1AX</i> durante la progresión.

**Tabla 4. Clasificación del melanoma según la OMS publicada en 2018.** Clasificación basada en la relación del melanoma con la exposición solar, y según su firma genética. CSD: *Cumulative sun damage*; LMM: *Lentigo malignant melanoma*; MN: melanoma nodular. (Adaptado de Ferrara et. al 2021)

## 2. EL MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL (MLA)

---

El melanoma lentiginoso acral (MLA) es una variante rara dentro de los melanomas cutáneos, que supone entre el 2-8% del total de melanomas, siendo el cuarto subtipo más diagnosticado. Esta variante fue añadida por Reed a la clasificación en 1976, como subtipo histopatológico diferente, caracterizado por su fase inicial de crecimiento radial que puede evolucionar durante meses y/o años, seguido de una fase vertical invasiva en la dermis<sup>60</sup>.

La terminología 'acral' se refiere a su localización, ya que con localización acral nos referimos a las zonas de la piel glabras (sin pelo) de las extremidades, concretamente en MLA en las palmas de las manos, las plantas de los pies y las uñas. El término 'lentiginoso' se refiere a su fase de crecimiento de forma radial, la cual sucede de forma previa a la invasión hacia la dermis por parte del tumor.

Esta terminología ha llevado a controversia y a confusión, ya que ciertos autores utilizan de forma indistinta 'melanoma acral' (MA) y 'MLA', utilizando MA para referirse a MLA por ser el subtipo histológico más común dentro de los melanomas que se desarrollan en esta localización. Sin embargo, hay otros autores, que con MA se refieren a todas las variantes histopatológicas que ocurren en localización acral. En definitiva, no todos los melanomas que se desarrollan en situación acral son MLAs, sino que pueden desarrollarse tanto MLA como MN. Más discutido es que pueden verse verdaderos MES en la piel acral (glabra) de manos y pies. En el dorso de manos y pies, expuestos a UV, no es raro el desarrollo de MES<sup>61</sup>.

### 2.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL MELANOMA ACRAL

#### 2.1.1. *Incidencia*

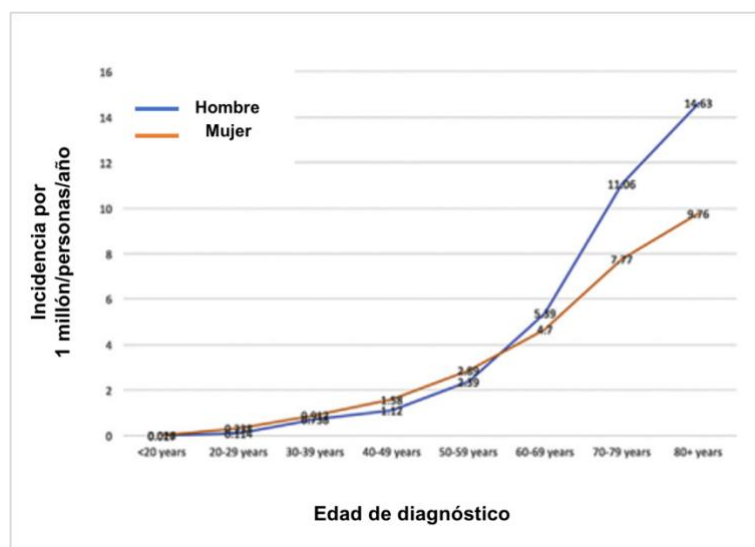
Los casos de MLA representan el 2-8% del total de melanomas diagnosticados en población caucásica. Sin embargo, es el subtipo de melanoma más diagnosticado en individuos con piel oscura, concretamente en población descendiente de América Latina, Asia y África, que en algunos países puede suponer más del 50% de los casos<sup>62</sup>.

Aunque, en cuanto a incidencia, los casos de MLA muestran unas tasas similares en todas las etnias (0.18-0.25 casos cada 100.000 personas/año), se observan diferencias significativas de proporción de casos de MLA respecto al total de melanomas diagnosticados<sup>63</sup>. Esta marcada variabilidad se da debido a la diferencia de incidencia de melanomas inducidos por la radiación

solar, que son mucho más comunes en individuos de piel clara con respecto a los individuos de piel más oscura, ya que estos últimos producen un nivel de melanina superior que los primeros y les provee de una protección incrementada ante la radiación UV<sup>62</sup>.

En el caso de América Latina, los casos en países con ancestros mayoritariamente europeos como Argentina, presentaron un 6% de casos de MLA, sin embargo, en México y Perú con población con ancestros tanto europeos, como americanos y/o africanos, la mayoría de diagnósticos fueron MLA<sup>62,64</sup>. A pesar de que, en África, los estudios son limitados, se observó que hay una mayor proporción de MLA diagnosticados en población negra africana que en población blanca africana. Según un estudio realizado por Hudson y Krige en Sudáfrica, un 71% de melanomas cutáneos fueron diagnosticados en población negra, de los cuales un 54% fueron MLAs<sup>65</sup>. Otro estudio en Sudáfrica, reportó que un 80% de melanomas cutáneos diagnosticados en individuos de piel negra fueron en localización acral<sup>66</sup>. Por otra parte, en Asia, la forma más común de melanoma es el MLA, corroborado por varios estudios que reportaron que la proporción estimada de pacientes diagnosticados de MLA fue de un 47% en pacientes en Japón<sup>67</sup>, un 42% en China<sup>68</sup> y un 58% en Taiwán<sup>69</sup>.

Este tipo de melanoma suele desarrollarse a partir de la sexta década de edad, de hecho, la incidencia de MLA aumenta con cada año de edad tanto en hombres como en mujeres, sin haber hallado diferencias significativas en incidencia respecto a sexo (Figura 14)<sup>70</sup>. En cuanto a localización, es más frecuente su diagnóstico en las extremidades inferiores, concretamente en la zona plantar y en las manos suele presentarse de forma subungueal<sup>63</sup>.



**Figura 14. Incidencia de MLA separada por rangos de edad y sexo.** Representación gráfica de la incidencia de MLA ajustada por edad y por sexo de una cohorte de 1724 pacientes de MLA procedente del registro 'Surveillance, Epidemiology and End Results' de EEUU entre los años 2006-2015. (Adaptado de Huang et.al 2020).

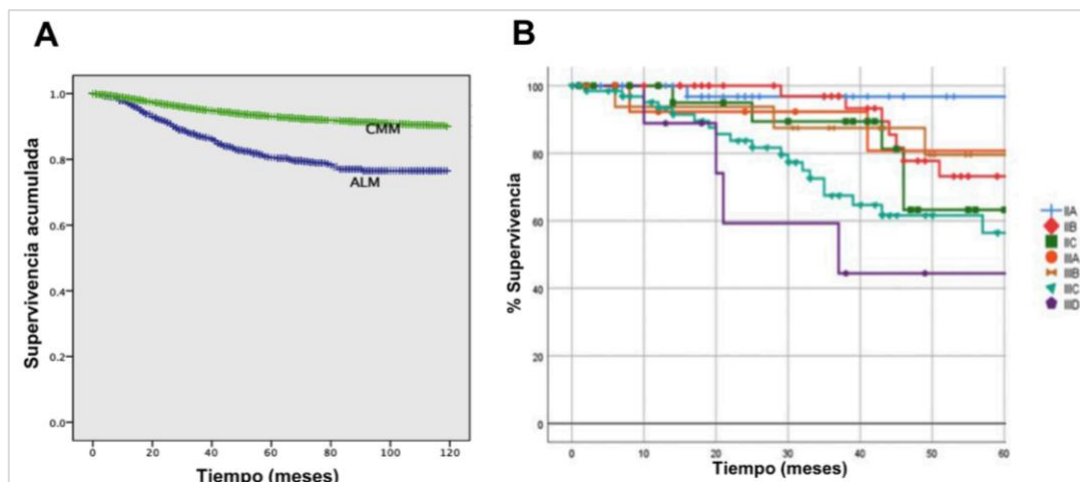
### 2.1.2. Factores pronósticos y supervivencia

El MLA tiene un peor pronóstico, siendo su tasa de supervivencia un 10-20% inferior con respecto al resto de MCs<sup>62,71</sup>.

En un estudio reciente, Huang et al., reportó que la tasa de supervivencia específica de MLA fue de un 81% comparada con un 93% en MCs no lentiginosos acrales (*Figura 15A*)<sup>70</sup>. Algunas hipótesis dicen que esto se debe a que se presenta en estadios avanzados, sin embargo, otros sugieren que el MLA tiene un peor pronóstico incluso, tras controlar el grosor del tumor y el estadio<sup>72</sup>.

Diversos factores clinicopatológicos han sido reportados como factores pronósticos independientes en MLA como han sido sexo, grosor del tumor, localización, ulceración, índice mitótico, invasión vascular, estadio patológico y biopsia del ganglio centinela positiva <sup>70,71,73</sup>. Otros factores pronósticos que se han considerado son la edad avanzada, raza y el estatus socioeconómico<sup>72</sup>.

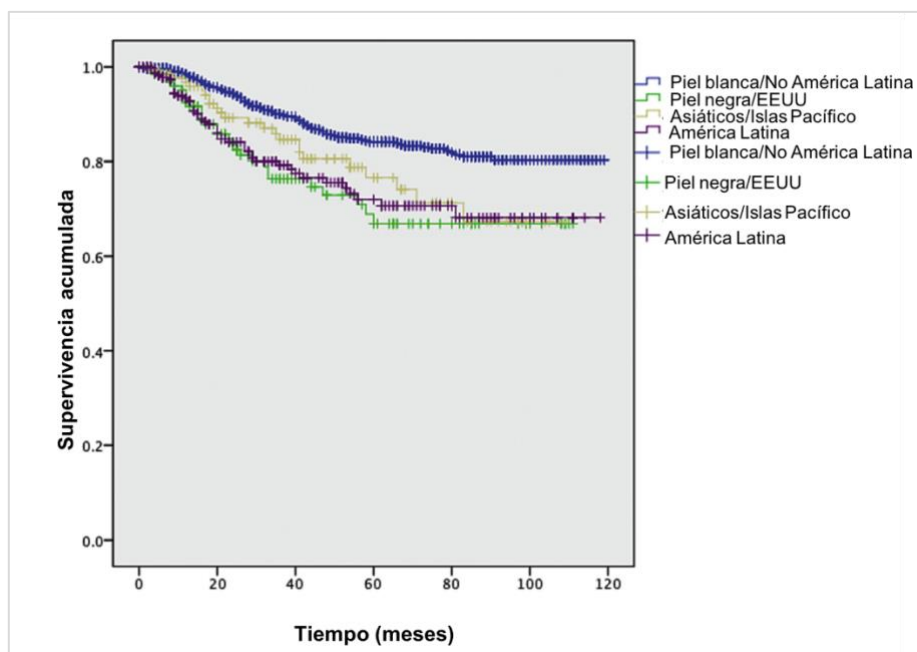
En un estudio multicéntrico realizado en EEUU, se observó que los pacientes con enfermedad en estadio IIB/IIC tenían una supervivencia específica por MLA y una tasa de recaída especialmente bajas en comparación con la enfermedad en estadio IIIB, sugiriendo que el aumento del grosor se asocia a peor pronóstico, incluso en ausencia de metástasis ganglionares (*Figura 15B*)<sup>74</sup>.



**Figura 15. Representación de la supervivencia del MLA a lo largo del tiempo.** (A) Representación de la supervivencia acumulada del MLA (azul) comparado con el MC (verde) de una cohorte de 1724 pacientes de MLA y 87.442 pacientes de MC procedente del registro 'Surveillance, Epidemiology and End Results' de EEUU entre los años 2006-2015. CMM: Cutaneous Malignant Melanoma (Melanoma Cutáneo Maligno); ALM: Acral Lentiginous Melanoma (Melanoma Lentiginoso Acral). (*Adaptado de Huang et. al 2020*). (B) Representación gráfica del porcentaje de supervivencia por

estadios según la 8ª edición de la AJCC de una cohorte de 433 pacientes de MLA procedente de la 'United States Melanoma Consortium Database' seguida durante los años 2000-2017. (Adaptado de Kolla et. al 2021)

En cuanto a considerar la raza como factor pronóstico, ha habido controversia ya que algunos estudios han reportado que la población caucásica tiene una tasa de supervivencia mayor que otros grupos raciales, siendo la población con piel negra la que tiene peor supervivencia (Figura 16)<sup>70</sup>. Sin embargo, muchos estudios reportan que la población negra suele ser diagnosticada en estadios avanzados, en comparación con población blanca. Además, otros estudios sugieren que el estatus socioeconómico, la falta de concienciación ante las enfermedades cutáneas y la dificultad de acceso al sistema sanitario podrían ser las causas subyacentes a las diferencias raciales, debido al retraso del diagnóstico<sup>71</sup>.



**Figura 16. Supervivencia acumulada del MLA a los 5 años según la raza.** Representación gráfica de la supervivencia acumulada de una cohorte de 1724 pacientes de MLA y 87.442 pacientes de MC procedente del registro 'Surveillance, Epidemiology and End Results' de EEUU entre los años 2006-2015. (Adaptado de Huang et. al 2020).

También se han encontrado diferencias en la supervivencia según la localización del tumor. Howard et al., reportó que los pacientes con MLA en zonas subungueales tenían una supervivencia inferior que el resto de pacientes con MLA en otras zonas<sup>75</sup>.

Las diferencias en supervivencia teniendo en cuenta el estadio de la enfermedad, podrían deberse también a diferencias biológicas. MLA tiene un menor número de mutaciones en el gen *BRAF*, con lo cual las terapias dirigidas son menos efectivas. Además, algunos sugieren que los pacientes con MLA son menos susceptibles a los inhibidores de puntos de control del SI, debido

al bajo número de mutaciones puntuales en comparación con melanomas no MLA, y en consecuencia por su menor inmunogenicidad<sup>72</sup>.

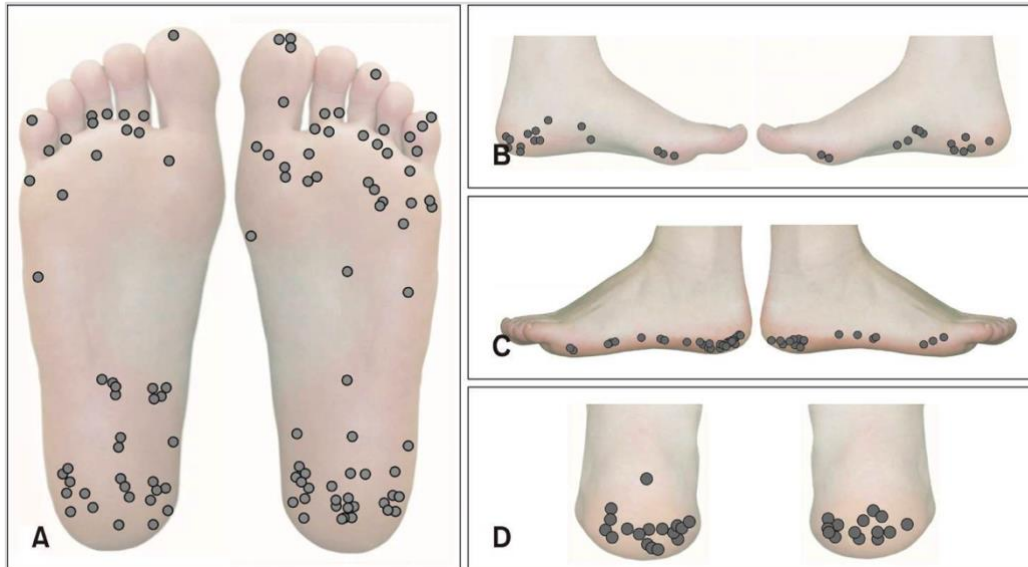
### **2.1.3. Factores de riesgo**

La etiología del MLA es controvertida, y no hay consenso en cuáles son los principales factores específicos que dan lugar a su desarrollo.

Existen diversas evidencias que sugieren que podrían existir algunos factores de riesgo genético, aunque hasta el momento no ha sido descrito ningún caso de MLA familiar. En un estudio se observó que el riesgo de desarrollar cualquier tipo de melanoma era superior en familiares de primer grado que habían sido previamente diagnosticados de MLA. Además, también se ha observado, que los pacientes con MLA desarrollaban otros tipos de tumores de forma secundaria y también tenían antecedentes de cáncer en su familia con mayor frecuencia que pacientes con otra variante de melanoma u otros tumores<sup>62</sup>.

Debido a la localización característica del MLA en zonas no expuestas a la radiación solar, además de la ausencia de mutaciones inducidas por la radiación UV presentes en otros tipos de MCs, su etiología no parece estar relacionada con la exposición solar, ni con la presencia de *nevus* benignos o atípicos previos. Sin embargo, se ha propuesto que tener un historial de traumatismos, o estar sometido a estrés físico y/o mecánico podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de MLA, debido a su desarrollo en zonas del cuerpo que soportan peso y que son susceptibles al daño mecánico, como son las plantas de los pies y las palmas de las manos<sup>62</sup>.

En un estudio retrospectivo sobre melanoma acral realizado en China (n=685), se encontró asociación entre un traumatismo o enfermedad previa en la zona del desarrollo del tumor<sup>76</sup>. En otro estudio realizado en Corea (n=313) se observó que un 26.8% reportó un traumatismo y en un 29.1% reportó estrés físico en la zona del tumor de forma previa, además se halló que de forma significativa los melanomas subungueales estaban más asociados con un historial de traumatismos, por ser una zona más susceptible a estos. En el mismo estudio, también se estudiaron las profesiones de los pacientes, siendo un 41.5% agricultores o pescadores<sup>35</sup>. Otros estudios han reportado que la localización más frecuente de aparición de MLA es el pie, concordando con que es el lugar sometido a mayor tensión mecánica, y que, además el desarrollo tumoral coincide con las zonas de mayor presión de la planta del pie, o en los bordes de éste, zona expuesta a irritación por el calzado (*Figura 17*)<sup>35,77</sup>.



**Figura 17. Mapa anatómico de melanomas acrales diagnosticados en el miembro inferior.** Imágenes procedentes de un estudio de melanoma acral en Corea de una cohorte de 313 pacientes diagnosticados entre 1992-2018, de los cuales 212 fueron diagnosticados en el pie, principalmente en las zonas de mayor presión (A), y en los bordes de los mismos (B-D). (Adaptada de Yun et. al 2021).

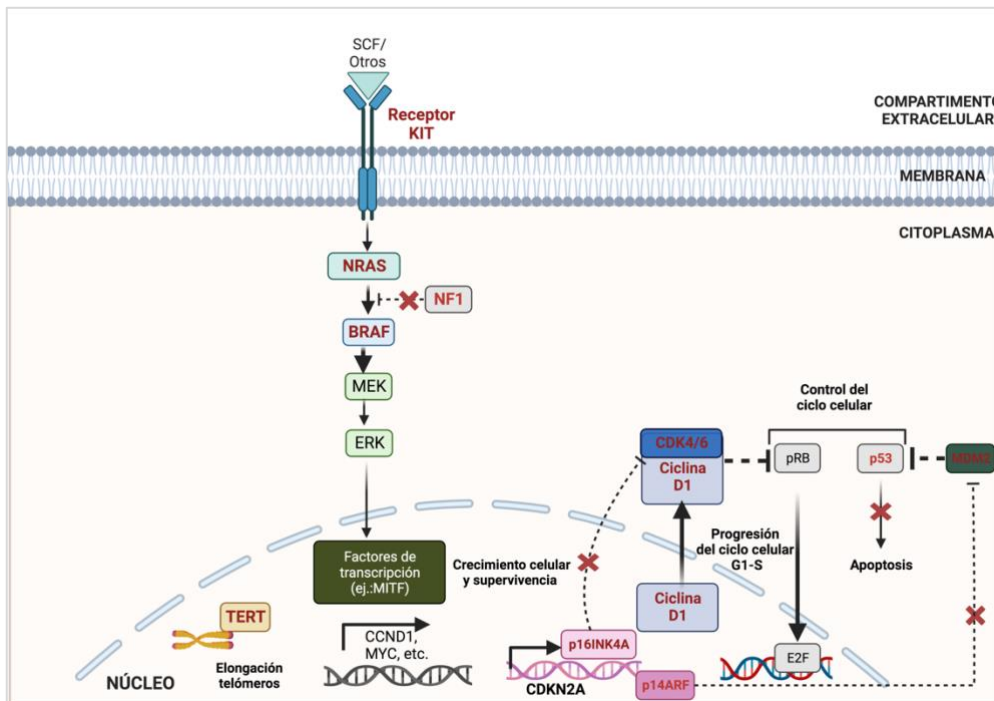
Sin embargo, la teoría del traumatismo y el estrés mecánico como factores de riesgo es controvertida, ya que hay otros estudios que no han encontrado correlación, como en un estudio retrospectivo (n=122) de la Clínica Mayo (EEUU) que no encontraron diferencias en la distribución de melanomas acrales entre las zonas que soportan más o menos peso de los pies<sup>78</sup>. Por lo tanto, son necesarios nuevos estudios que permitan dilucidar la etiopatología de este tumor.

## 2.2. ALTERACIONES GENÉTICAS

El MLA tiene un perfil genético distintivo respecto a otros MCs, ya que se caracteriza por tener un número inferior de mutaciones puntuales o variaciones de un nucleótido (SNV, del inglés *Single Nucleotide Variants*) y de inserciones/delecciones (indels) de pequeños fragmentos de nucleótidos. Sin embargo, se ha observado un incremento del número de reordenamientos estructurales en el genoma y de variaciones en el número de copias (CNVs) de genes. Esta diferencia del MLA respecto a otros MCs, se atribuye al efecto de la radiación UV en estos últimos<sup>79</sup>. De hecho, la mayoría de MLAs tienen un porcentaje de aproximadamente un 40% de mutaciones en *BRAF*, *NRAS* o *NF1*, es decir, suelen ser triples negativos para estos genes, a diferencia del MC que suelen ocurrir en un 90% de los casos<sup>80,81</sup>.

En un estudio reciente de secuenciación completa (WGS, del inglés *Whole-Genome Sequencing*) del genoma de pacientes (n=87) de melanoma acral, se observó que la carga de SNVs/indels fue baja, de alrededor de 2.1 mutaciones por megabase (Mb), en cambio los reordenamientos fueron frecuentes, con una media de 283 reordenamientos por tumor, y de un 26% de CNVs. Los eventos de duplicación completa del genoma se dieron en un 71% de los tumores estudiados.<sup>79</sup>

Los principales genes alterados que han sido identificados como promotores de tumores han sido los genes *KIT*, la ciclina D1 (*CCND1*), *CDK4*, *CDKN2A*, *MDM2* y *TERT* (Figura 18).



**Figura 18. Principales vías de señalización alteradas en MLA.** Esquema representativo de las principales vías afectadas por mutaciones y/o variaciones del número de copias (representado en rojo) de oncogenes o supresores tumorales. (Creado con BioRender.com).

No obstante, aunque en los últimos años el número de estudios ha incrementado, no son del todo suficientes, ya que las conclusiones derivan de un número relativamente pequeño de pacientes, respecto a los estudios existentes sobre otros subtipos de MCs y, son principalmente sobre melanoma acral en general, sin concretar si se trata de la variante lentiginosa.

### 2.2.1. *KIT*

El gen *KIT* es un receptor tirosina kinasa tipo III que estimula crecimiento celular, división, supervivencia y migración y es directamente responsable, mediante la unión de factores de



crecimiento, de la activación e iniciación de las vías MAPK y PI3K/AKT. Este gen se encuentra alterado, según los diversos estudios, entre un 8-36% de los casos de acral, y también en aproximadamente un 22% de los melanomas mucosos, una proporción elevada con respecto al resto de MCs (1%)<sup>82</sup>.

En un metaanálisis reciente, se reportaron 8.7% de mutaciones y entre un 5.6% de amplificaciones en el gen *KIT* en melanoma acral. Las mutaciones puntuales más comunes halladas en acral fueron p.K642E y L576P<sup>81</sup>.

### 2.2.2. *CDKN2A/CDK4/CCND1*

Los genes *CDKN2A*, *CDK4* y *CCND1* son los más afectados en MLA en cuanto a CNVs y están implicados en la transición del ciclo celular de fase G1 a fase S, como se ha comentado con anterioridad. Por un lado, *CDKN2A* codificando a dos proteínas diferentes (p14ARF y p16INK4A) que actúan como supresoras tumorales evitando que la célula pase de G1 a S en presencia de daño en el ADN mediante la estabilización de p53. Por otro lado, *CCND1* y *CDK4* que codifican para la ciclina D1 y la proteína CDK4, las cuales formando un complejo promueven la transición de G1 a S. Dichos genes suelen presentar CNVs, aunque a diferencia de otros MCs, las mutaciones puntuales no son comunes en esta variante de melanoma<sup>62,83</sup>.

En un estudio previo, Kong et al., reportaron una frecuencia global de amplificaciones en *CDK4/CCND1* o deleciones en *CDKN2A*, de un 82.7% en los pacientes estudiados (n=514), con lo cual la mayoría de los casos de melanoma acral tenían desregulada la transición de fase G1-S en el ciclo celular<sup>84</sup>.

El gen *CCND1* se encuentra amplificado entre un 30-45% de melanoma acral en estadios tempranos de melanoma acral, y muestran altas frecuencias de CNVs tanto en melanoma acral como en nevi melanocíticos acrales. Además, se ha observado una correlación positiva entre los pacientes con un alto incremento de CNVs y la expresión de la proteína ciclina D1, sin que existan diferencias significativas entre aquellos pacientes sin amplificación en dicho gen, o con un bajo número de CNVs en el mismo<sup>85,86</sup>.

Yeh et al., reportaron que las amplificaciones en el cromosoma 12 afectaron en un 22.1% de los casos al locus del gen *CDK4* (12q13), así como al locus 12q15 correspondiente al gen *MDM2* en

un 10.7% de los casos. *MDM2* fue co-amplificado junto con *CDK4* en más de un tercio de los casos, sin embargo, la amplificación de *MDM2* sin *CDK4* solo se dio en un 3.3% de los casos<sup>87</sup>.

Según Broit et al., en una revisión sistemática y metaanálisis reciente en melanoma acral, se observó un 30.4% de deleciones homocigotas y un 16% de deleciones heterocigotas en el gen *CDKN2A*. También se observaron frecuentes amplificaciones en *MDM2* (12%), en *CDK4* (12.8%), *CCND1* (24.8%) y *CCND2* (5.6%)<sup>81</sup>.

### **2.2.3. TERT**

*TERT*, es un gen frecuentemente mutado en MC (86%) con respecto al MLA (9.2%), sin embargo, se encuentra amplificado en un 20.8% de los casos de MLA, respecto al 11.4% del resto de MCs, aunque aún la función de la regulación de la telomerasa en este tipo de tumor no está clara<sup>62,81</sup>.

### **2.2.4. Vía MAPK/ERK**

El gen *BRAF* se encuentra mutado en aproximadamente un 21% de los casos de melanoma acral, a diferencia del resto de MCs, en los cuales se da en alrededor del 55% de los casos. La mutación más recurrente es la mutación *BRAF*<sup>V600E</sup> que se dio en un 80% de los casos (del total de *BRAF*). Por otro lado, las amplificaciones en el gen *BRAF* también han sido observadas, ocurriendo en un 15% de los casos estudiados, y pueden incluso co-ocurrir junto con mutaciones puntuales del mismo gen<sup>79,81</sup>.

Las mutaciones en *NRAS* son menos frecuentes, y suelen darse en alrededor de un 14% de los casos, respecto a un 32.1% en MC, sin embargo, las amplificaciones en este gen no suelen ser frecuentes (2%). Por otro lado, el gen *NF1* suele tener mutaciones de pérdida de función en alrededor de un 6% de los casos, y también suelen darse tanto deleciones homocigotas (3.2%) como heterocigotas (9.6%) en dicho gen<sup>81</sup>.

## **2.3. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO**

El MLA, como la mayoría de MCs, en estadios tempranos es asintomático y la enfermedad puede erradicarse de forma frecuente mediante una escisión local. Sin embargo, suele ser diagnosticada en estadios avanzados por diferentes motivos. Por una parte, este tumor suele aparecer en pacientes de edad avanzada, los cuales pueden tener dificultades para examinar las

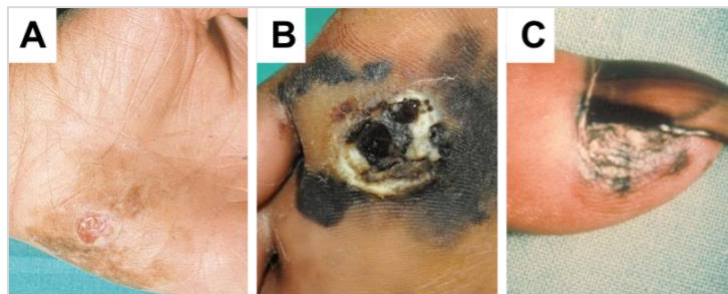
zonas acrales, como ocurre con las plantas de los pies. Por otra parte, el retraso en la detección puede deberse al diagnóstico erróneo del tumor, por confusión con otras patologías tales como infecciones fúngicas, verrugas, úlceras diabéticas o hematomas, especialmente en el caso de MLAs subungueales. Este retraso en el diagnóstico se ha asociado a un incremento del grosor del tumor, estadios avanzados de la enfermedad y a una supervivencia inferior a 5 años<sup>39</sup>.

Por lo tanto, es de importancia realizar un examen cutáneo exhaustivo incluyendo plantas de los pies, palmas de las manos, uñas e incluso entre los dedos de manos y pies. Además, los pacientes de MLA, suelen tener un bajo número de *nevi* cutáneos, con frecuencia no realizan un seguimiento dermatológico, por lo que es esencial que otros especialistas no dermatólogos y médicos de atención primaria estén familiarizados con las características del MLA<sup>88</sup>.

### 2.3.1. Diagnóstico clínico

El MLA se presenta inicialmente como una mácula o pápula pigmentada con bordes irregulares y coloración variada. Conforme el tumor va progresando, las lesiones aumentan de tamaño y se observan nódulos que se tornan negro azulados. También son comunes las lesiones amelanocíticas con presencia de máculas o nódulos rosáceos<sup>89</sup>.

Los melanomas subungueales son difíciles de diagnosticar, principalmente si son amelanocíticos y hasta que no adquieren pigmentación y/o relieve no se lleva a cabo una biopsia. La variante subungueal suele presentarse como estrías que se extienden desde la base hasta la punta de la uña, y con frecuencia se confunden con hemorragias subungueales, aunque estas últimas se desplazan conforme la uña crece a diferencia del MLA (*Figura 19*)<sup>89</sup>.



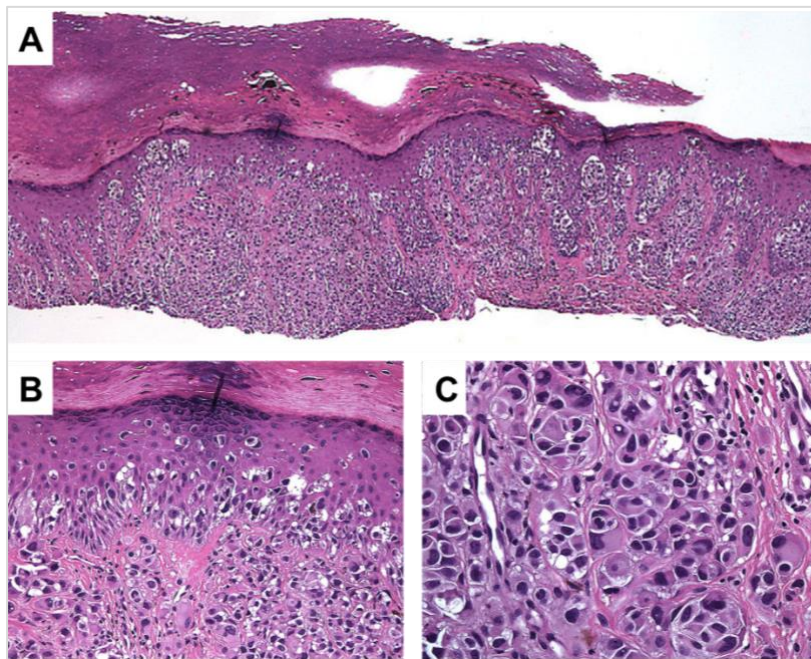
**Figura 19. Imágenes de MLA en diferentes localizaciones.** Imágenes representativas de MLA amelanocítico palmar(A), MLA plantar(B) y MLA subungueal en la mano (C). (*Imágenes procedentes del Servicio de Dermatología del HUAV, Lleida*).

### 2.3.2. Diagnóstico histopatológico

La histopatología del MLA se caracteriza por una proliferación asimétrica y poco circunscrita de melanocitos aislados de forma continua en la unión dermoepidérmica. Este crecimiento lentiginoso se caracteriza por la presentación de células tumorales como unidades individuales, que posteriormente se unen formando nidos, aunque predominan los melanocitos aislados.

El crecimiento pagetoide se observa también de forma tardía en MLA, así como el desarrollo de nidos los cuales se disponen de forma paralela a la epidermis. Aunque la presencia de nidos tumorales es un indicador de *nevus* melanocítico, también el *nevus* puede presentar un crecimiento de células aisladas, con lo cual no es exclusivo de MLA. Sin embargo, en el caso del *nevus*, los nidos suelen estar orientados de forma vertical, a diferencia de la disposición paralela a la epidermis de los nidos de MLA (Figura 20)<sup>89,90</sup>.

La epidermis suele ser hiperplásica y muy pigmentada, por otro lado, la dermis, si está presente, suele tener un estroma desmoplásico (exceso de colágeno) y mitosis dérmicas profundas. El tamaño de los núcleos también se trata de una característica diferencial del MLA respecto al *nevus*. Los núcleos de los *nevi* melanocíticos suelen ser más pequeños que los de los queratinocitos adyacentes, en cambio los núcleos en MLA son de un tamaño superior<sup>89</sup>.



**Figura 20. Imágenes histopatológicas de MLA a diferentes aumentos.** (A) Imagen a bajo aumento en la que se observa una proliferación de melanocitos atípica tanto en la dermis como en la epidermis, con un marcado patrón lentiginoso y pagetoide de melanocitos individuales. (B) Imagen a medio aumento en el que se observan melanocitos

atípicos a todos los niveles de la epidermis y la dermis. (C) Imagen a alto aumento de los melanocitos dérmicos en los que se observan núcleos atípicos y grandes. (*Adaptado de Piliang et. al 2009*).

### 2.3.3. Tratamiento

La escisión local amplia de las lesiones primarias de MLA requieren de la amputación de dígitos de la mano o del pie, principalmente en el caso de melanomas subungueales. No obstante, muchos de los pacientes amputados pueden preservar sus dígitos mediante técnicas de reconstrucción, sin interferir necesariamente en la resección adecuada del tumor.

Las opciones de tratamiento para el MLA avanzado son limitadas, ya que debido a las diferencias genéticas y etiológicas entre el MLA y el resto de MCs, es difícil extrapolar ciertos tratamientos que se utilizan en la actualidad para otro tipo de melanoma. La mutación *BRAF* suele ser muy frecuente en MES, sin embargo, el MLA presenta una frecuencia mutacional muy baja y por ello la mayoría de pacientes no puede beneficiarse de esta terapia.

Por otro lado, el proto-oncogen *KIT*, se encuentra mutado/amplificado en pacientes con MLA y podría utilizarse como diana terapéutica<sup>88</sup>. Varios ensayos clínicos en fase II han demostrado resultados positivos en pacientes con *KIT* mutado en melanoma. Sin embargo, el tratamiento tiene mejores efectos en pacientes con mutaciones en *KIT* que, en pacientes con amplificaciones en el mismo, reduciéndose el rango de pacientes que pueden beneficiarse de esta terapia<sup>91,92</sup>. Otra diana podría ser el gen *CDK4*, sobre el que se han realizado estudios preclínicos en los que se observó que las alteraciones en la vía de CDK4 daban lugar a una sensibilización ante inhibidores específicos de CDK4/6, tales como el Palbociclib<sup>84</sup>. También se ha observado que este inhibidor da lugar a un incremento de expresión de PD-L1, lo cual podría mejorar la respuesta a la inmunoterapia. Además, existen ensayos clínicos en marcha en los que se están testando inhibidores de CDK4/6, en pacientes con melanoma acral que tienen alterada esta vía<sup>62,93</sup>.

Se ha demostrado que el MLA metastásico tiene una menor susceptibilidad a los inhibidores de puntos de control del SI, debido a la respuesta inmunitaria deficiente que se desarrolla contra este tipo de tumor. Se ha observado que PD-L1 se expresa en un 31% de los MLAs, presentando un menor número de linfocitos infiltrantes en el tumor (TILs, del inglés *Tumor-infiltrating lymphocytes*) que otros MCs<sup>94</sup>. Algunos estimulantes del SI como el imiquimod, dacarbazina o interferón podrían ayudar a aumentar el número de TILs y aumentar la acción de los inhibidores del punto de control del SI<sup>95</sup>.

### 3. MICROAMBIENTE TUMORAL Y SECRETOMA

---

#### 3.1. ANTECEDENTES: DEFINICIÓN Y COMPONENTES

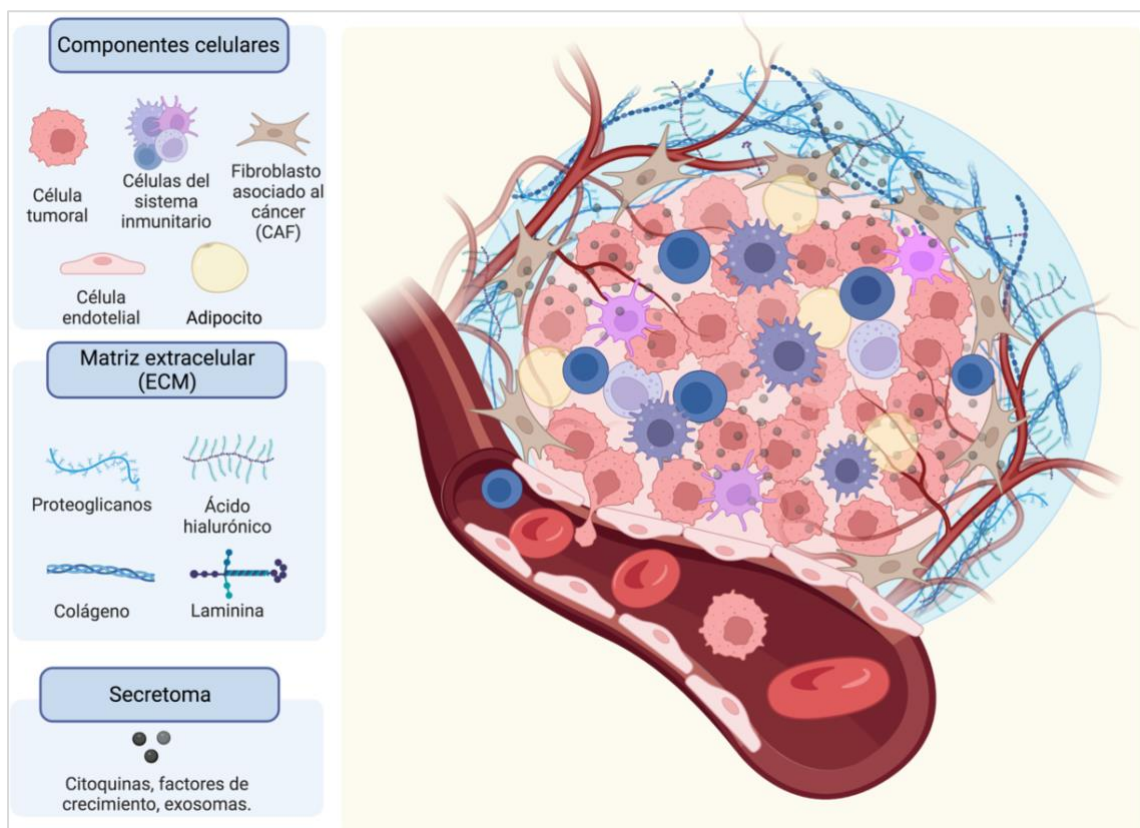
A lo largo del tiempo, el principal enfoque que se ha tenido ante el estudio del cáncer ha sido dirigido hacia sus alteraciones genéticas y epigenéticas. Aunque desde hace tiempo, se tienen conocimientos de que las células no tumorales que se encuentran en el entorno tumoral tienen un papel fundamental, como es el caso de las células estromales e inmunitarias, la principal atención ha sido recibida por parte de las células cancerosas. Sin embargo, con el tiempo se ha reconocido que el cáncer es un proceso evolutivo y ecológico, el cual implica interacciones continuas, recíprocas y plásticas entre las células tumorales y el microambiente tumoral (TME, del inglés, *Tumor Microenvironment*)<sup>96</sup>.

Las células tumorales promueven cambios de gran relevancia a nivel molecular, celular y físico en los tejidos circundantes que las rodean. En los primeros estadios del desarrollo tumoral, se desarrolla una relación dinámica y recíproca entre las células tumorales y los componentes del TME, lo cual proporciona un soporte que favorece el crecimiento y supervivencia del tumor, la invasión local y la diseminación del tumor hacia otros tejidos. El TME coordina una serie de procesos, mediante los cuales promueve la angiogénesis para restaurar el suministro de oxígeno y nutrientes al tumor, y eliminar los residuos metabólicos, y de esta forma sobrellevar el ambiente hipóxico y ácido que existe en el tumor. Además, los diferentes tipos de células inmunitarias que se infiltran en el tumor, pueden promover un entorno antitumoral o protumoral, dependiendo de las funciones que lleven a término.

El TME se encuentra en continua evolución y posee una alta complejidad, comprendiendo todas las **células no tumorales** que se encuentran en el tumor, incluyendo células del estroma como fibroblastos asociados al tumor (CAFs, del inglés *cancer-associated fibroblasts*), células endoteliales, neuronas y adipocitos; células del SI innato y adaptativo tales como linfocitos T y B, neutrófilos, macrófagos asociados al tumor (TAMs, *tumor-associated macrophages*), células asesinas naturales (NK, del inglés *natural killer*), células dendríticas (CDs) y células mieloides supresoras (MDSCs, del inglés *myeloid-derived supresor cells*). Los **componentes no celulares**, también componen el TME e incluyen la ECM que es rica en colágeno, proteoglicanos, ácido hialurónico, lamininas y fibronectina, y proporciona la estructura y soporte que facilita la proliferación del tumor (*Figura 21*)<sup>97</sup>.

Además, la comunicación entre el tumor y los demás componentes del TME se produce a través de una variedad de productos solubles secretados como citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y exosomas. Todas estas moléculas también pertenecen al TME, y conforman un **secretoma heterotípico** que deriva no sólo de las células tumorales, sino también de las células estromales e inmunitarias asociadas al tumor, y el cual es una fuente importante de marcadores y reguladores clave en el proceso tumorigénico<sup>98,99</sup>.

Por lo tanto, la caracterización del microambiente tumoral y del secretoma podría proporcionar biomarcadores útiles para la mejora del diagnóstico y pronóstico de los pacientes, así como de la monitorización de las respuestas ante los tratamientos<sup>99</sup>.



**Figura 21. Componentes del microambiente tumoral.** Esquema representativo de los componentes celulares del microambiente tumoral formado por células tumorales, células inmunitarias, CAFs, células endoteliales y adipocitos; y los componentes no celulares formado por la matriz extracelular y el secretoma. (Creado con BioRender.com).

### 3.2. CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO (SI)

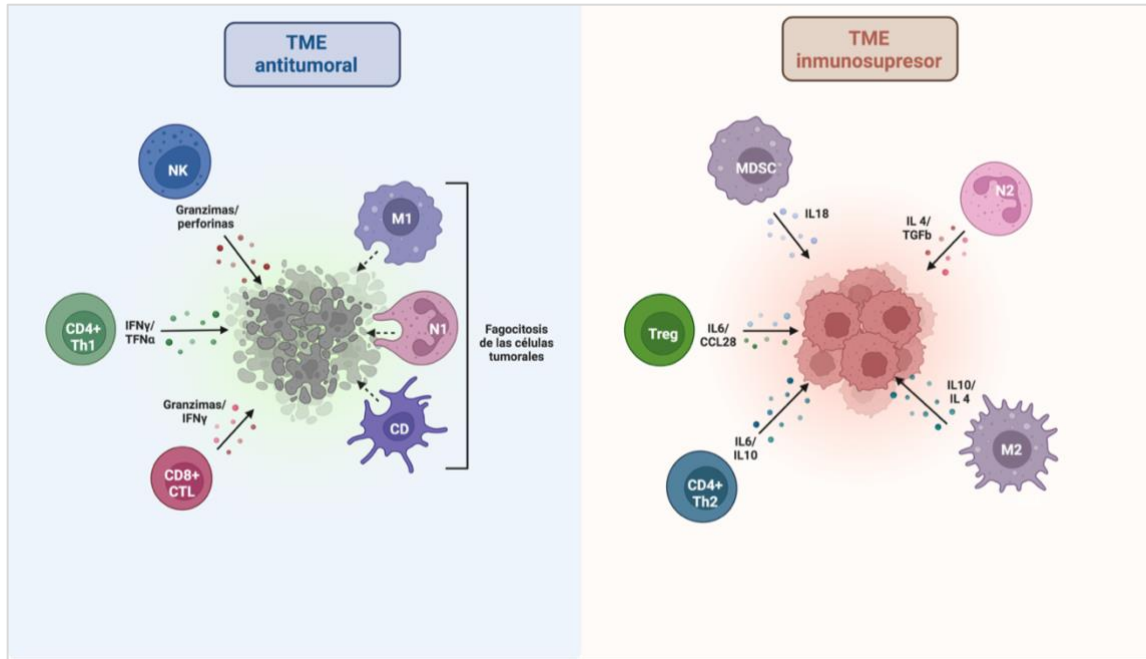
Las células del SI son un componente crítico del TME, las cuales pueden ofrecer dependiendo del contexto y el secretoma, un escenario dicotómico, ya que pueden suprimir (escenario antitumoral) o promover el crecimiento tumoral (escenario protumoral). Sin embargo, el TME suele ser altamente inmunosupresor, y por ello un gran número de terapias que estimulan el SI contra el tumor tienen una eficacia clínica limitada. De hecho, los tumores suelen desarrollar las herramientas necesarias para evitar su propia detección y destrucción a diferentes niveles (Figura 22)<sup>97</sup>.

Dentro de la inmunidad innata, los **TAMs** pueden tener una función antitumoral (M1) o promover la progresión tumoral promoviendo la angiogénesis, invasión y metástasis (M2) dependiendo de la composición del TME. Las **MDSCs**, también derivadas de la médula ósea y que comparten progenitores comunes con los macrófagos, tienen gran capacidad de suprimir la respuesta inmunitaria. Estas células son consideradas una población heterogénea de células mieloides inmaduras, que podrían surgir debido al entorno inflamatorio crónico que existe en los tumores, y que suprime la respuesta antitumoral mediante la inhibición de células T y NK dentro del TME. Los **neutrófilos**, primera línea de defensa contra patógenos, también pueden polarizarse, teniendo un papel proinflamatorio en estadios tempranos (N1) e inmunosupresor (N2) en fases avanzadas del tumor<sup>100,101</sup>.

Los **linfocitos T CD4+ Th** y los **CD8+ CTLs**, son los que realizan un control directo y crucial del tumor, siendo la presencia intratumoral de estos TILs, un indicador de buen pronóstico clínico según un gran número de estudios. Los **linfocitos CD4+ Th1** secretan diversas citoquinas, entre ellas interferón (IFN)- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (TNF-  $\alpha$ , del inglés, *tumor necrosis factor  $\alpha$* ) e interleuquina (IL)-2 que tienen una función antitumoral, y que también reclutan CTLs. Sin embargo, los **linfocitos T CD4+ reguladores (Tregs)** se encuentran elevados en pacientes con cáncer y promueven un efecto inmunosupresor en el TME. Los Tregs interactúan de forma directa con las células inmunitarias y/o mediante la producción de citoquinas inmunorreguladoras como IL-10 y TGF-  $\beta$  inhibiendo la actividad antitumoral de las células NK y de los CTLs. Además de las Tregs, **las células CD4+ Th2** también bloquean la respuesta antitumoral generada por las células T mediada por las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13, regulando las respuestas de las células Th1 e induciendo la polarización de los macrófagos hacia M2<sup>100,102</sup>.



Las células B se encuentran en un porcentaje muy reducido en el TME, y según el subtipo pueden promover o inhibir las respuestas inmunitarias antitumorales. Las inmunoglobulinas (Igs) producidas por las células plasmáticas pueden activar la cascada del complemento, regular la cascada de la coagulación, favorecer la metástasis, así como inhibir la eficacia de diferentes terapias contra el cáncer<sup>96,100</sup>.



**Figura 22. Papel del sistema inmunitario en el TME.** Esquema representativo de los componentes celulares más relevantes que intervienen en el TME en sus dos escenarios posibles: antitumoral (izquierda) e inmunosupresor (derecha). CD: Célula dendrítica, Treg: célula T reguladora. (Creado con BioRender.com).

Los estudios sobre el rol del SI en el TME se habían enfocado de forma primordial en las células de la inmunidad adaptativa, principalmente en los linfocitos T. Sin embargo, en la actualidad, se han encontrado evidencias suficientes de que la inmunidad innata, no sólo influye de forma indirecta en el TME, sino que lo ‘esculpe’ de forma significativa<sup>96</sup>. Por ello, en los siguientes apartados nos centraremos en los TAMs, células pertenecientes a la inmunidad innata, las cuales tienen un rol crítico en el TME<sup>103</sup>.

### 3.2.1. Macrófagos asociados al tumor (TAMs)

Los macrófagos son un componente esencial dentro de la inmunidad innata, los cuales modulan la respuesta inmune a través de la fagocitosis de patógenos y la presentación de antígenos. Los TAMs son macrófagos que participan en la formación del TME, son unas de las células más comunes que infiltran el TME y han sido hallados en una gran variedad de tumores. Los TAMs

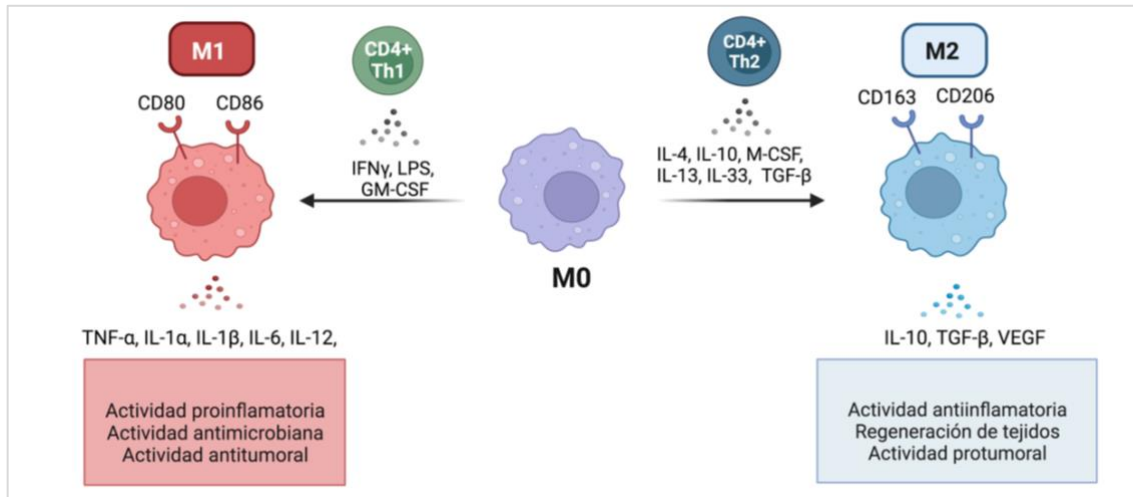
pueden promover el crecimiento y la invasión tumoral, la metástasis y la resistencia a diferentes tratamientos<sup>97,104</sup>.

Los TAMs se originan, principalmente, a partir de monocitos de la médula ósea, aunque en estudios recientes se ha sugerido que el reclutamiento de monocitos circulantes, que son polarizados hacia TAMs en el TME, es imprescindible para la acumulación de TAMs. Los monocitos inflamatorios circulantes pueden ser reclutados por el tumor mediante la secreción de diferentes quimioquinas, como CCL2 (del inglés, *C-C Motif Chemokine Ligand 2*) y CCL5; citoquinas, como el factor estimulante de colonias tipo 1 (CSF-1, del inglés *Colony Stimulating Factor 1*) y miembros de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*)<sup>104</sup>. También se ha reportado, que en una fracción muy baja provienen de macrófagos residentes en los tejidos de forma previa<sup>97,103</sup>.

### 3.2.1.1. Polarización de los TAMs

Los macrófagos son células muy plásticas, las cuales pueden ser polarizadas desde macrófagos indiferenciados (M0), hacia dos tipos: macrófagos **clásicamente activados (M1)** o **alternativamente activados (M2)**, dependiendo de los estímulos a los que están expuestos. Los macrófagos M1 suelen ser polarizados principalmente mediante interferón (INF)- $\gamma$ , producido por las células T Th1, y lipopolisacárido (LPS) bacteriano, caracterizándose, generalmente, por tener efectos proinflamatorios, antitumorales y por secretar factores inflamatorios como IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF-  $\alpha$ . Este estado de polarización se da en un pequeño porcentaje de los TAMs en el TME, expresan los marcadores CD86 y CD80, y son conocidos como **M1-like TAMs** (Figura 23)<sup>105</sup>.

Por otro lado, los macrófagos M2 son estimulados fundamentalmente mediante IL-4, IL-10, IL-13 (producida por las células Th2) y CSF-1 y tienen un papel fundamental en la iniciación, proliferación, metástasis y evasión inmunitaria, secretando factores antiinflamatorios como IL-10, TGF-  $\beta$  y VEGF<sup>101,105</sup>. La mayoría de TAMs expresan marcadores de macrófagos M2 como el receptor de manosa CD206 y el receptor *scavenger* CD163, y son conocidos como **M2-like TAMs**.



**Figura 23. Polarización de los macrófagos.** Esquema representativo de la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo proinflamatorio y antitumoral (M1) o hacia un fenotipo antiinflamatorio y protumoral (M2). En el esquema se representan los principales factores solubles que inducen ambos fenotipos, los principales marcadores de superficie, así como las principales citoquinas que secretan. (Creado con BioRender.com).

Algunos estudios clasifican los macrófagos M2 en cuatro subtipos, M2a (inducidos por IL-4 e IL-13), M2b (inducido por inmunocomplejos y por ligandos de receptor tipo Toll (TLR)), M2c (inducidos por IL-10, TGF- $\beta$  y glucocorticoides) y M2d (inducidos por CSF-1, IL-6 y LIF). Los macrófagos M2a y M2b juegan un papel inmunomodulador y promueven una respuesta Th2, mientras que los M2c están asociados a supresión inmune y remodelamiento de tejidos. Finalmente, los M2d participan en angiogénesis y en la progresión tumoral, y en algunos estudios son llamados TAMs propiamente dichos<sup>101,105</sup>.

No obstante, las poblaciones de TAMs están en un estado constante de transición entre M1 y M2, siendo determinada la proporción de estas poblaciones según el contexto y secretoma al que estén expuestas en el TME.

### 3.2.1.2. Papel de los TAMs en la progresión tumoral

Los M1-like TAMs tienen un papel proinflamatorio y de inhibición de la progresión tumoral en el TME, aunque la mayoría de estudios se han enfocado en los M2-like TAMs, debido a su papel protumoral y por ser la proporción de TAMs predominante en el TME<sup>105</sup>.

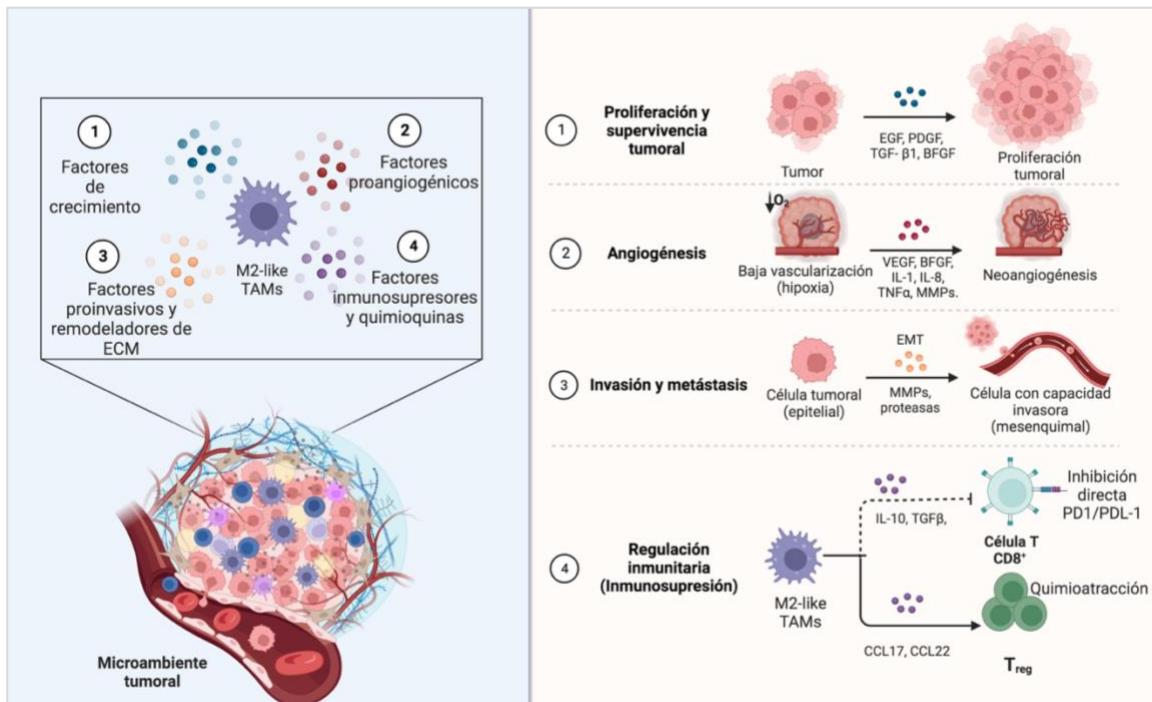
El principal papel de los M2-like TAMs en el TME es antiinflamatorio y promueven la progresión tumoral. Los principales efectos producidos por estas células se pueden dividir en cuatro aspectos principales: **proliferación y supervivencia, angiogénesis, invasión y metástasis y regulación inmune** (Figura 24)<sup>105</sup>.

El secretoma de los M2-like TAMs está compuesto por una amplia variedad de citoquinas y factores de crecimiento que promueven la **proliferación y supervivencia**. Algunos ellos son el factor de crecimiento epitelial (EGF, del inglés, *epithelial growth factor*), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés, *platelet-derived growth factor*), TGF-  $\beta$ 1, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, del inglés, *hepatocyte growth factor*), ligandos de la familia de receptores del factor de crecimiento epitelial (EGFR, del inglés, *epithelial growth factor receptor*) y el factor de crecimiento básico de fibroblastos (BFGF, del inglés *basic fibroblast growth factor*). Los ligandos de la familia de EGFR tienen un papel esencial en la tumorigénesis, mediando la transducción de señales de proliferación celular en el tumor<sup>104</sup>.

Además, las zonas hipóxicas con poca circulación sanguínea tienen un alto número de M2-like TAMs que secretan **factores proangiogénicos** como BFGF, VEGF, IL-1, IL-8, TNF-  $\alpha$ , metaloproteasas de matriz extracelular (MMP, del inglés, *matrix metalloproteinase*) 2 y 9 y óxido nítrico (NO). La expresión coordinada de estas moléculas tiene como consecuencia la proliferación de células endoteliales, remodelamiento de la matriz y la vascularización del tumor<sup>104,106</sup>.

En última instancia, los TAMs pueden promover la degradación de la membrana de las células endoteliales a través de la secreción de MMPs, proteasas de serina, catepsinas y, además, descomponer colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, permitiendo la migración de las células tumorales y estromales. La base de la metástasis de los tumores es la transición epitelio-mesénquima (EMT, del inglés, *epithelial-mesenchymal transition*), que es un proceso mediante el cual, las células tumorales pierden sus características epiteliales y su adherencia, y adquieren propiedades migratorias y características de célula madre mesenquimal (MSC, del inglés, *mesenchymal stem cell*). De esta forma, las células tumorales promueven la diferenciación de los TAMs, y estos a su vez promueven la EMT, con lo cual se produce un bucle de retroalimentación positiva, que promueve la **metástasis**<sup>104,106</sup>.

Paralelamente, los TAMs pueden **regular** los efectos de las células T y de las células NK en el TME. Los M1-like TAMs pueden aumentar el número de células NK activadas y de células T, promoviendo la apoptosis de las células tumorales. Por el contrario, los M2-like TAMs pueden inhibir de forma directa la proliferación de las células T CD8+ citotóxicas y, además, promover la atracción de células T reguladoras (Tregs) mediante la secreción de CCL17 y CCL22, suprimiendo de forma indirecta la respuesta antitumoral de las células T<sup>97,105</sup>.



**Figura 24. Papel de los M2-like TAMs en la progresión tumoral y su secretoma.** Esquema representativo de las principales funciones de los M2-like TAMs: (1) proliferación y supervivencia, (2) angiogénesis, (3) invasión y metástasis y (4) regulación inmunitaria o inmunosupresión. (Creado con BioRender.com).

### 3.2.1.3. Estrategias terapéuticas dirigidas a los TAMs

La alta infiltración de TAMs, mayoritariamente M2-like TAMs, correlaciona en la mayoría de tipos de tumores como cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, hepatoma y melanoma, entre otros, con un mal pronóstico en los pacientes que lo padecen<sup>97,107</sup>. Por ello, las terapias dirigidas al manejo de los TAMs podrían ser una opción óptima para el tratamiento de dichos pacientes, existiendo varias dianas terapéuticas establecidas que se encuentran bajo estudio en ensayos clínicos.

Las estrategias dirigidas a los TAMs las podemos agrupar en tres grupos principales: 1) Bloqueo o inhibición de la diferenciación y funcionamiento de los macrófagos como en el caso del bloqueo de CSF1R<sup>96,108</sup>; 2) bloqueo de quimioatrayentes de monocitos/macrófagos como es el caso de la inhibición del eje CCL2-CCR2<sup>109</sup>; 3) Conversión de los TAMs de fenotipo protumoral en antitumorales, promoviendo la destrucción del tumor.

Aunque, sin duda, el principal objetivo es convertir los TAMs de fenotipo protumoral a antitumoral, interrumpiendo el bucle de retroalimentación que existe entre las células

tumorales y los TAMs. Una opción sería bloquear CD47, que es altamente expresado en las células tumorales, y que envía a los macrófagos señales para evitar ser fagocitados por estos. Actualmente, existen estudios preclínicos y ensayos clínicos en fases tempranas que han obtenido resultados relevantes, en los que se produce un incremento de la actividad antitumoral por parte de los macrófagos<sup>110</sup>.

#### 3.2.1.4. TAMs y melanoma

Aunque el melanoma es un tumor altamente inmunogénico, a lo largo de su progresión va adquiriendo mecanismos supresores para evitar su detección y destrucción por parte de la inmunidad innata y adaptativa. Las células de melanoma reclutan a los macrófagos hacia el TME mediante la secreción de CCL2, también conocida como proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1, del inglés, monocyte chemoattractant protein-1) y modifican las funciones de los macrófagos dentro del TME, hacia un fenotipo *M2-like* TAMs mediante la secreción de TGF- $\beta$ . El incremento de *M2-like* TAMs da lugar a una reducción de la presentación de antígenos mediante MHC-II, un incremento de las MMPs y de moléculas proangiogénicas como VEGF<sup>111</sup>.

Los TAMs, además de promover la progresión del tumor, tienen un papel fundamental en la inducción de resistencia a tratamientos contra inhibidores de MAPK mediante dos mecanismos principales: 1) inducción de la expresión de factores de resistencia (TNF- $\alpha$ ) que promueve la activación de la vía NF $\kappa$ B, y la expresión de MITF; y 2) reactivación paradójica de la vía MAPK, incrementando la producción de factores proangiogénicos (VEGF e IL-8), y en consecuencia generando resistencia al tratamiento. Además, los TAMs inducen resistencia a la inmunoterapia mediante dos estrategias: 1) expresión elevada del punto de control negativo del SI, VISTA (del inglés, *V-domain Ig supresor of T cell activation*), que aumenta el número de Tregs y la expresión de PDL-1 en la superficie de los macrófagos; 2) inhibición del reclutamiento de linfocitos CD8+ en el TME<sup>112</sup>.

En **MLA**, se han observado diferencias en el infiltrado inmunitario respecto a otros tipos de MCs. Recientemente se ha demostrado que este subtipo de melanoma presenta un incremento de los *M2-like* TAMs, tanto en zonas peritumorales como intratumorales comparado con el MES, y esto se asoció con mal pronóstico en los pacientes con MLA<sup>62</sup>.

Además, en estudios recientes se ha demostrado que el melanoma acral se caracteriza por tener un menor infiltrado inmunitario que el resto de MCs, particularmente con un menor número de

células T CD8+ y células NK. Por otra parte, se observó la expresión de una gran variedad de checkpoints inmunitarios (PD-1, PD-L1, CTLA-4, VISTA), los cuales limitan tanto la activación como el reclutamiento de células del SI en el TME. El checkpoint VISTA, fue altamente expresado en acral, lo cual podría ser un factor pronóstico negativo ya que se ha demostrado que su expresión está asociada con resistencias adquiridas a terapias anti-PD-1<sup>113</sup>.

### 3.3. CÉLULAS DEL ESTROMA

Las interacciones entre el estroma y las células tumorales juegan un papel primordial en el crecimiento y progresión del tumor. La generación del estroma tumoral, según Dvorak, comparte similitudes con un proceso normal de cicatrización, incluyendo la neoangiogénesis, la infiltración de fibroblastos y una extensa remodelación de la matriz extracelular<sup>114</sup>. Se han identificado diversos tejidos a partir de los cuales el tumor lleva a cabo el reclutamiento de células estromales: la médula ósea, compuesta por células mesenquimales y endoteliales, adipocitos y fibroblastos (también inmunitarias); el tejido conjuntivo, compuesto por fibroblastos y células mesenquimales; el tejido adiposo, compuesto por adipocitos; y los vasos sanguíneos, compuesto por pericitos y células endoteliales<sup>115</sup>.

Las células estromales mayoritarias son los fibroblastos en su forma activada, también conocidos como fibroblastos asociados al cáncer o CAFs<sup>115</sup>. En el siguiente apartado nos centraremos en este tipo celular y en su secretoma, el cual juega un papel fundamental en la comunicación entre el TME y el tumor.

#### 3.3.1. *Fibroblastos asociados al cáncer (CAFs)*

Los fibroblastos regulan la estructura y la función de los tejidos normales mediante la remodelación de la matriz extracelular, y la reparación transitoria de los tejidos durante la cicatrización de heridas. No obstante, existen numerosos estudios que han reportado que tienen un papel clave en la tumorigénesis y son el componente estromal mayoritario del TME<sup>114</sup>.

Ante daño tisular, los fibroblastos que normalmente residen en los tejidos pueden activarse mediante TGF- $\beta$  hacia miofibroblastos, los cuales desarrollan características relevantes en cicatrización, como: proliferación, propiedades contráctiles, fenotipos secretores y formación de matriz extracelular. En el TME, las células tumorales y otras células del estroma, secretan

factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , PDGF y factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2, del inglés, *fibroblasts growth factor 2*) que promueven la transformación de fibroblastos a CAFs<sup>97</sup>.

Los CAFs son considerados aquellas células que son negativas para marcadores epiteliales, endoteliales y leucocitarios, que tienen una morfología alargada y en los que, las mutaciones presentes en las células tumorales se encuentran ausentes<sup>116</sup>. Se caracterizan por la expresión incrementada de varios marcadores como la  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA, del inglés, *alpha smooth muscle actin*), la proteína de activación de fibroblastos (FAP, del inglés, *fibroblast activation protein*), la proteína específica de fibroblastos 1 (FSP1, del inglés, *fibroblast-specific protein 1*), el receptor de PDGF (PDGFR) -  $\alpha/\beta$  y la vimentina<sup>117</sup>.

La mayoría de las subpoblaciones de CAFs promueven un entorno protumoral a través de la señalización bidireccional con las células tumorales y otras células del TME, mediante la secreción de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento y exosomas que no sólo facilitan la proliferación tumoral, sino que también inducen la evasión del sistema inmunitario por parte del tumor. Por otro lado, los CAFs también tienen la capacidad de degradar ECM a través de la liberación de MMPs, y además sintetizan nuevas proteínas que proporcionan soporte estructural que permite la invasión tumoral y la angiogénesis<sup>117</sup>.

Estas células han presentado gran heterogeneidad biológica en muchos aspectos, incluyendo su origen, fenotipo y función.

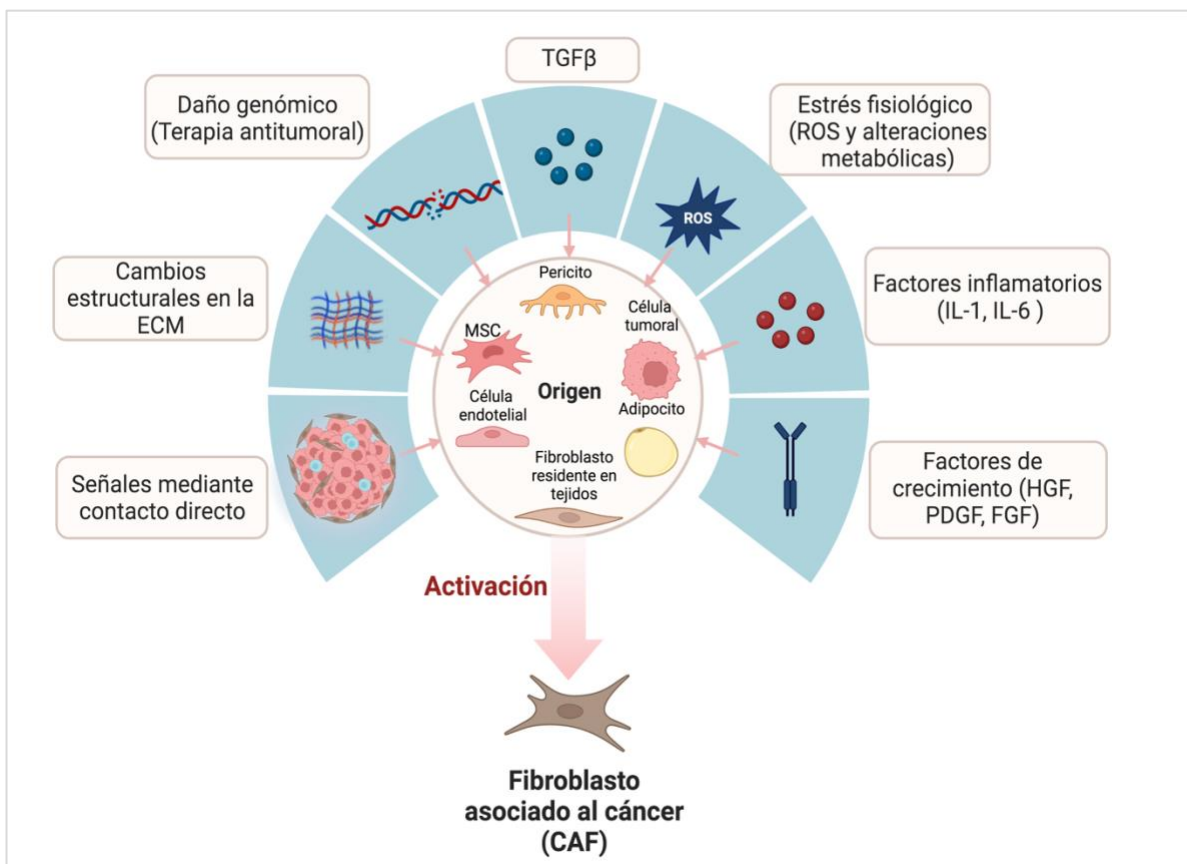
### 3.3.1.1. Origen y activación de los CAFs

Los CAFs derivan de diferentes tipos celulares, lo cual podría explicar la gran heterogeneidad de poblaciones de CAFs existentes. La mayor fuente de CAFs son los **fibroblastos residentes en los tejidos**, también conocidos como fibroblastos quiescentes. Estos fibroblastos son reclutados y activados mediante la estimulación con diferentes moduladores, incluyendo HGF, PDGF, FGF-2, factor derivado de estroma 1 (SDF-1, del inglés, *stromal-derived factor 1*) y especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, *reactive oxygen species*). Según numerosos estudios, las **MSCs** de la médula ósea son también un precursor sustancial de CAFs. La transformación se produce mediante un complejo proceso de varios pasos que abarca desde la transición epitelio-mesénquima, progenitores de la médula ósea, comunicación célula-célula y la estimulación de varias citoquinas y/o quimioquinas, como CCL2, CCL5 y CXCL12. También pueden ser precursores de CAFs, los **pericitos** y los **adipocitos**, mediante un proceso de transdiferenciación



bajo diferentes estímulos. Por otro lado, las **células endoteliales** y las **células epiteliales tumorales** mediante un proceso de transición endotelio-mesénquima (EndMT) e EMT respectivamente, pueden expresar marcadores fibroblásticos como FAP y  $\alpha$ -SMA.

Según los estudios, la generación de los CAFs no se produce mediante un único mecanismo concreto, sino que existen diversas señales que dan lugar a este tipo celular. La vía más establecida de activación de fibroblastos es mediante la vía de señalización de **TGF- $\beta$** , que conduce a la expresión de  $\alpha$ -SMA, y en consecuencia a un incremento de contractilidad del citoesqueleto. También se produce la generación de CAFs, mediante **factores de crecimiento** como HGF, FGF-2 y PDGF; y mediante **mediadores inflamatorios** como IL-1 a través de la vía NF- $\kappa$ B, y la IL-6 mediante la vía JAK-STAT. Otros mecanismos de generación de CAFs son **cambios estructurales** en la ECM, **estrés fisiológico** (ROS y alteraciones metabólicas) y **genómico** (terapia antitumoral) y mediante **señales de contacto** entre fibroblastos y células tumorales (Figura 25).



**Figura 25. Origen y activación de los CAFs.** Esquema representativo de los mecanismos de activación mediante los cuales diferentes tipos celulares se activan hacia CAFs. (Creado con BioRender.com).

### 3.3.1.2. Papel de los CAFs en la progresión tumoral

La mayoría de subpoblaciones de CAFs tienen una función protumoral, aunque también se han descrito algunos subgrupos que tienen la función contraria, y promueven la inhibición de la progresión tumoral. En diversos estudios se ha reportado que los CAFs participan en múltiples etapas del desarrollo tumoral a través de diferentes vías incluyendo la **proliferación e invasión del tumor**, la **angiogénesis**, la **metástasis**, la **inmunomodulación del sistema inmunitario** y la **resistencia a terapias antitumorales** (Figura 26) <sup>116</sup>.

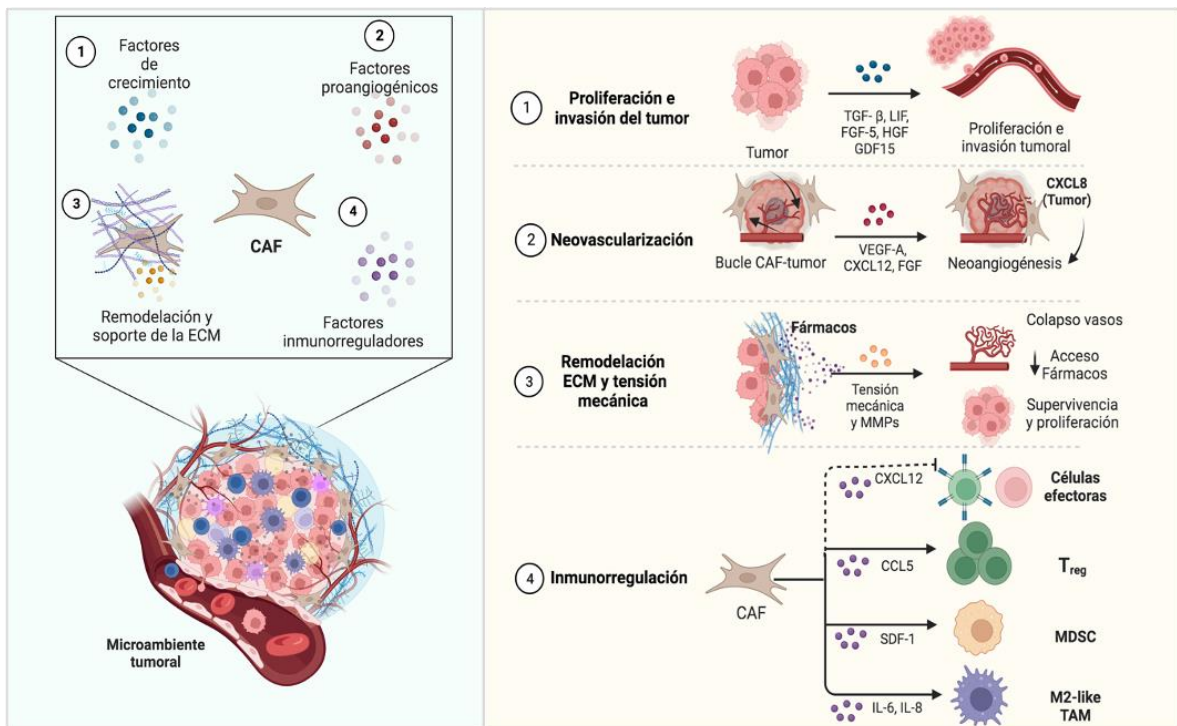
Los CAFs secretan gran cantidad de factores de crecimientos, citoquinas y exosomas que promueven el crecimiento tumoral y modulan las respuestas a tratamientos. La producción de TGF- $\beta$ , factor inhibidor de leucemia (LIF, del inglés, leukaemia inhibitory factor), FGF-5, HGF y factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF15, del inglés, growth differentiation factor 15) promueven la **invasión** y la **proliferación** de las células tumorales<sup>116</sup>.

La **neovascularización** es un importante proceso durante la tumorigénesis, y los CAFs participan de forma activa en este proceso mediante diferentes vías. Estas células secretan VEGF-A, un factor proangiogénico muy potente que se une a VEGFR en la superficie de las células endoteliales. Además, la angiogénesis tumoral también se potencia mediante señales paracrinas entre las células estromales y las tumorales, como ocurre con CXCL12 que promueve la secreción de CXCL8 en el tumor dando lugar a la formación de nuevos vasos sanguíneos o con FGF, que también es un importante factor proangiogénico<sup>118</sup>.

Los CAFs no solo promueven la angiogénesis mediante la secreción de factores proangiogénicos, sino que también actúan **remodelando la ECM**. Esta remodelación funciona como soporte a la nueva vasculatura a través de actividad biomecánica de los CAFs y a la rigidez de la ECM promovida por la actividad MMP. El aumento de rigidez en los tejidos, además, desencadena señales **pro-supervivencia** y **pro-proliferación** en las células tumorales. El aumento de la tensión mecánica puede provocar el colapso de los vasos sanguíneos, dando lugar a tejidos hipóxicos y así promover fenotipos tumorales más agresivos y **reducir la administración de fármacos** al tumor<sup>116,118</sup>.

Se han descrito evidencias contradictorias de las funciones **inmunorreguladoras** de los CAFs durante la progresión tumoral. Aunque un mayor número de CAFs predice la exclusión inmunitaria y el fracaso de la inmunoterapia, una depleción completa de estos se asocia con una

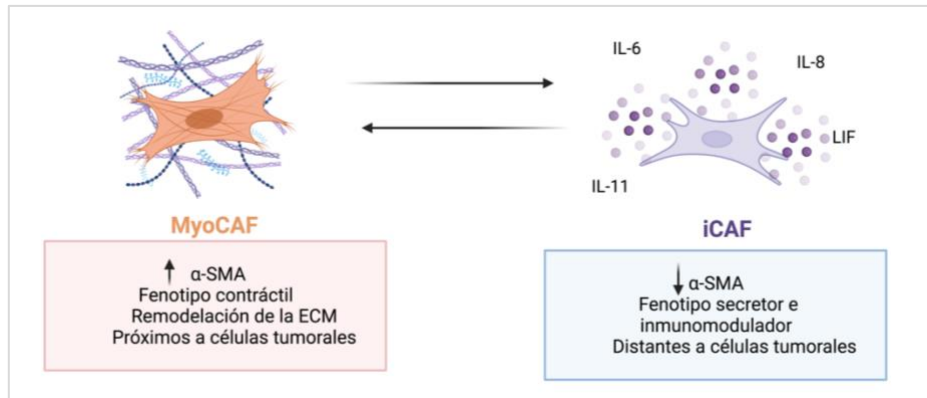
menor infiltración inmunitaria intratumoral. Esto se explica debido a la coexistencia de subpoblaciones de CAFs con propiedades opuestas. Aún así, la gran mayoría de CAFs producen citoquinas y quimioquinas que promueven un TME inmunosupresor y protumoral. A través de la secreción de CXCL12 se produce una reducción de las células T efectoras, y mediante CCL5 se produce un reclutamiento de las células Tregs. Por otra parte, los CAFs participan en el reclutamiento y diferenciación de las MDSCs mediante la secreción de SDF-1, y también en la polarización a M2-like TAMs mediante la secreción de IL-6 e IL-8, y, en consecuencia, promueven una reducción de la citotoxicidad de las células NK<sup>118</sup>.



**Figura 26. Funciones de los CAFs.** Esquema representativo de la diversidad de funciones realizadas por los CAFs, y su impacto en (1) proliferación e invasión, (2) neovascularización, (3) remodelación y soporte de la ECM e (4) inmunorregulación. (Creado con BioRender.com).

El gran número de funciones atribuidas a los CAFs plantea la cuestión de si un único tipo de CAF desempeña simultáneamente todas estas funciones o si existen subespecializaciones y plasticidad entre distintos estados funcionales intercambiables. Los diferentes estudios mediante RNA-seq de una única célula (scrNA-seq, del inglés, *single-cell RNAseq*) de diferentes tipos de cáncer han demostrado la presencia de poblaciones de CAFs transcricionalmente diferentes, pero también se han observado similitudes entre poblaciones de fibroblastos en diferentes tumores. La observación más consistente es la existencia de dos poblaciones diferenciadas: la existencia de una población de **CAFs miofibroblásticos (myoCAF)** y de otra

población de **CAFs inflamatorios (iCAFs)**. Los myoCAFs tienen una elevada expresión de  $\alpha$ -SMA (vía TGF- $\beta$ ), fenotipo contráctil y remodelan la ECM, y se encuentran localizados próximos a las células tumorales. Por otro lado, los iCAFs tienen una baja expresión de  $\alpha$ -SMA, fenotipo secretor e inmunomodulador (vía IL-6, IL-8, IL-11, LIF) y se encuentran localizados más distantes respecto a las células tumorales, participando en la supresión del SI mediante la estimulación de la vía de señalización STAT3 (Figura 27)<sup>116,117,119</sup>.



**Figura 27. Estados funcionales de los CAFs.** Esquema representativo de los principales estados funcionales intercambiables de los CAFs: CAFs miofibroblásticos o myoCAFs y CAFs inflamatorios o iCAFs. (Creado con BioRender.com).

Debido a esta heterogeneidad, los investigadores debaten si estos subtipos son estados intercambiables entre sí, lo cual confirmaría la plasticidad de los CAFs. Algunos estudios confirman este postulado, como, por ejemplo, los iCAFs del cáncer de páncreas son capaces de transformarse en myoCAFs tras la activación de la señalización de TGF- $\beta$  o inhibición de la señalización de la vía JAK/STAT inducida por IL-1, lo cual sugiere una plasticidad potencial entre estos subtipos o estados funcionales<sup>117</sup>.

### 3.3.1.3. Estrategias terapéuticas dirigidas hacia los CAFs

Muchos estudios clínicos han documentado que tanto el número como la función de los CAFs están relacionados con el pronóstico de los pacientes, por lo que actuar sobre estas células sería una estrategia alternativa óptima para el tratamiento del cáncer<sup>116</sup>.

Actualmente, las terapias dirigidas hacia los CAFs se pueden agrupar en: 1) tratamientos dirigidos hacia marcadores de superficie específicos de CAFs (FAP, PDGFR, VDR); 2) bloqueo de citoquinas, quimioquinas o factores de crecimiento secretados por los CAFs (IL-6, CXCL12, LIF);

y 3) tratamientos dirigidos hacia elementos de la ECM (MMPs, colágeno, tenascinas) que interfieren en la comunicación CAF-célula tumoral<sup>100</sup>.

No obstante, la gran variedad de funciones de los CAFs y la posibilidad de la interconvertibilidad entre subtipos, suponen un reto para este campo. Por lo tanto, el beneficio para el paciente podría requerir la selección de un subtipo concreto de CAF o la reprogramación de los CAFs hacia un fenotipo de fibroblasto normal o de CAF antitumorigénico, aunque para ello sería necesario definir los subtipos de CAFs en profundidad y sus interrelaciones<sup>116</sup>.

#### 3.3.1.4. CAFs y melanoma

Recientemente, se ha confirmado que la activación de los fibroblastos hacia CAFs es un paso fundamental para el desarrollo de metástasis en melanoma. Las células de melanoma activan y transforman a los fibroblastos en CAFs mediante la secreción de FGF-19, y, en consecuencia, los CAFs promueven el fenotipo invasivo del tumor mediante la remodelación de la ECM a través de MMP-2 Y MMP-9<sup>112</sup>.

La interacción bidireccional entre las células de melanoma y los CAFs pueden promover la resistencia a inhibidores de BRAF mediante diferentes mecanismos: 1) Secreción mediada por los CAFs de factores activadores (HGF) de la vía MAPK, PI3K y Akt; 2) Secreción de TGF- $\beta$  por parte de las células tumorales mediada por Vemurafenib, que provoca la activación de los CAFs y la remodelación de la ECM; y 3) producción de ROS por parte de los CAFs. Además, los CAFs favorecen un ambiente inmunosupresor, promoviendo la resistencia a la inmunoterapia mediante varios mecanismos: 1) secreción de factores que promueven el reclutamiento de Tregs y la expresión de PDL-1; y 2) secreción de TGF- $\beta$  que provoca la pérdida del MHC-I y la progresión de la enfermedad. Por otro lado, las interacciones directas entre CAFs y células de melanoma están promovidas por la N-cadherina, la cual se encuentra expresada en ambos tipos celulares. Esta interacción crea una barrera física alrededor de la masa tumoral, provocando la activación de señales de supervivencia e impidiendo el acceso de fármacos<sup>112</sup>.

Los estudios de TME en **MLA**, y concretamente de CAFs son limitados, ya que las cohortes de estudio son reducidas, debido a la baja incidencia de este tumor. Recientemente, se hizo un estudio con 6 pacientes de melanoma acral, sin concretar la variante lentiginosa, en el que llevaron a cabo un scRNA-seq en el que se reportaron tres subclusters de CAFs, que incluyó a myoCAF, iCAF y una variante diferente CTGF+ CAF, que se asoció a funciones con crecimiento

celular, respuesta ante hipoxia y procesamiento proteico. Además, se describió que este subcluster de CAFs, tenía una mayor influencia sobre los M2-*like* TAMs<sup>120</sup>.







---

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## HIPÓTESIS

---

El MLA es una variante de melanoma con baja incidencia, y con peor pronóstico respecto al resto de los MCs. Este pronóstico se relaciona tanto con el retraso en el diagnóstico, como con las características intrínsecas del tumor. Sus opciones de tratamiento son limitadas debido a sus diferencias genéticas y etiológicas en relación a otros MCs, presentando una menor susceptibilidad a tratamientos basados en inmunoterapia y careciendo de terapias específicas efectivas. Estas características diferenciales a nivel genético en relación al resto de MCs, basadas en un bajo número de mutaciones puntuales o SNVs y un alto número de CNVs, podrían tener un papel fundamental en cuanto a las bases biológicas de esta enfermedad, y en consecuencia en su pronóstico.

De acuerdo con lo anterior, y teniendo en cuenta la baja incidencia del MLA y por tanto la falta de estudios acerca de este tumor, nos planteamos que:

Las bases biológicas del MLA podrían estar condicionadas por el perfil genético del mismo, y a su vez éste estar relacionado con las características clinicopatológicas y el pronóstico de este tumor. Además, dada la importancia del TME en fenotipos tumorales agresivos, y su constante interacción con las células tumorales, nos planteamos que el secretoma del MLA, así como el TME en su conjunto, podría modular la progresión tumoral y también estar condicionado por el trasfondo genético del MLA.

Esta caracterización a diferentes niveles podría proporcionar la identificación de nuevos biomarcadores en cuanto a diagnóstico y pronóstico, así como a nivel terapéutico, y con ello, optimizar el abordaje de esta enfermedad desde un enfoque traslacional.

## OBJETIVOS

---

Con la finalidad de confirmar o refutar esta hipótesis los objetivos planteados fueron los siguientes:

**Objetivo 1.** Estudiar el perfil genético, secretoma y microambiente tumoral del MLA en una cohorte de pacientes y en líneas celulares humanas.

**Objetivo 1.1.** Revisar retrospectivamente una serie de biopsias de pacientes con MLA primario, y caracterizar la cohorte construida en cuanto a sus características demográficas, clinicopatológicas, evolutivas y ocupacionales.

**Objetivo 1.2.** Caracterizar la dosis génica de oncogenes de la cohorte de pacientes de MLA, analizando la relación de la variación del número de copias de estos oncogenes con las características demográficas, clinicopatológicas, evolutivas y ocupacionales de los pacientes.

**Objetivo 1.3.** Caracterizar la dosis génica de oncogenes en líneas celulares humanas de MLA y analizar los procesos de migración, invasión y proliferación de las líneas celulares humanas de MLA en relación a su perfil genético.

**Objetivo 1.4.** Estudiar el secretoma según el perfil genético de las líneas celulares humanas de MLA.

**Objetivo 1.5.** Estudiar el secretoma y el componente inmunitario del TME según el perfil genético en biopsias y en plasma de pacientes de MLA.

**Objetivo 1.6.** Analizar el componente monocítico y estromal del TME a través del secretoma de las líneas celulares de MLA según su perfil genético.

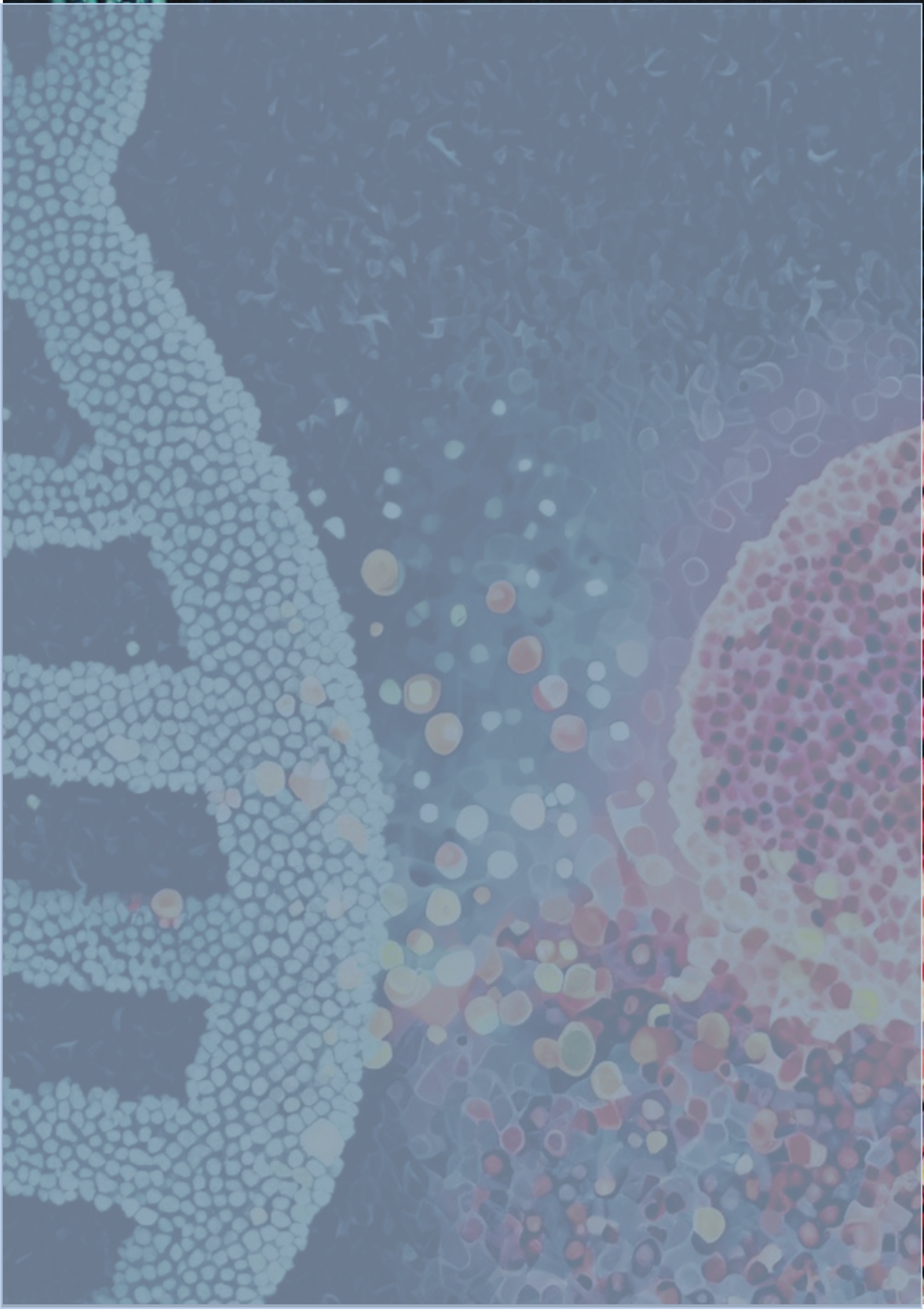
**Objetivo 2.** Estudio de la expresión de marcadores de aplicación clínica en MLA.

**Objetivo 2.1.** Analizar los niveles de expresión de oncogenes en las biopsias de MLA en relación a su perfil genético.

**Objetivo 2.2.** Analizar los niveles de expresión de marcadores de transición de epitelio-mesénquima (EMT) en relación a la clínica de los pacientes de la cohorte y según su perfil genético.

**Objetivo 2.3.** Analizar los niveles de expresión de ALDH1 como marcador de célula madre tumoral, en relación a la clínica de los pacientes de la cohorte y según su perfil genético, así como en líneas celulares de MLA.





---

# MATERIALES Y MÉTODOS

---





## 1. CONSTRUCCIÓN DE LA COHORTE DE MLA

---

### 1.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y SELECCIÓN DE PACIENTES

El estudio realizado tuvo un diseño observacional descriptivo de tipo retrospectivo, el cual fue llevado a término entre los años 2008 y 2021.

La construcción de la cohorte se llevó a cabo a partir de pacientes diagnosticados específicamente con un MLA primario por parte del Servicio de Dermatología y de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Arnau de Vilanova (HUAV) de Lleida. Finalmente, la cohorte se construyó a partir de un total de 33 pacientes diagnosticados con un MLA primario.

Para el uso de las muestras y los datos clínicos del presente estudio, se obtuvo un informe favorable (CEIC-2230) por parte del Comité de Ética de Investigación del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida, del Comité Científico del Biobanco (B.0000682) del IRBLleida y por parte del paciente mediante la firma de un Consentimiento Informado para la donación voluntaria de muestras biológicas para su uso en investigación.

### 1.2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

#### 1.2.1. *Procesamiento e histología básica de las biopsias de MLA*

La totalidad de biopsias de MLA empleadas en el presente estudio provienen del Servicio de Anatomía Patológica del HUAV. Estas biopsias fueron fijadas en formol y colocadas en casetes de inclusión, para posteriormente ser procesadas mediante un proceso de deshidratación e inclusión en parafina. A partir de las biopsias incluidas en parafina, se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$ , los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina (HE) para realizar el diagnóstico histológico por parte de los patólogos.

#### 1.2.2. *Obtención de plasmas de pacientes*

La obtención de plasma de los pacientes se realizó a partir de la extracción de sangre periférica del paciente por parte del Servicio de Dermatología, el mismo día de la obtención de la biopsia del MLA primario, previa firma del Consentimiento Informado y, de forma sucesiva a los 6 meses de la primera extracción. La muestra de sangre extraída fue procesada por parte del Biobanco

del Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, bajo la normativa ISO9001, para la obtención del plasma y almacenada a -80°C hasta su uso.

El plasma de pacientes con MCs de otros subtipos diferentes a MLA fue obtenido por parte del Servicio de Dermatología del Hospital Clínic de Barcelona, de forma previa al diagnóstico de metástasis y procesado por el Biobanco del Hospital Clínic (B.0000575).

### **1.3. RECOGIDA DE DATOS DE LOS PACIENTES DE LA COHORTE**

La recogida de datos de nuestra cohorte se realizó mediante la revisión retrospectiva de las historias clínicas de los pacientes por parte del Servicio de Dermatología del HUAV de Lleida. Las variables registradas fueron el sexo, la edad, la fecha de diagnóstico, la localización del tumor primario, el índice Breslow, la ulceración, el índice mitótico, el estadio de la AJCC (7ª edición) y la ocupación. Además, se registró la fecha de recaída y de muerte, en el caso de que se hubiesen dado dichos eventos, o en caso contrario, la fecha de última visita, mediante las cuales se obtuvieron la supervivencia específica de MLA y la supervivencia libre de enfermedad. La supervivencia específica de MLA contempló el periodo entre la fecha de diagnóstico y la fecha de muerte por MLA/última visita, en la que fueron excluidos los pacientes que fallecieron por otras causas diferentes a MLA. Por otro lado, la supervivencia libre de enfermedad contempló el periodo entre la fecha de diagnóstico y la fecha de recaída/última visita, en la que fueron excluidos los pacientes que fueron diagnosticados con metástasis a distancia desde el inicio.

## 2. CULTIVOS CELULARES

### 2.1. OBTENCIÓN DE LAS CÉLULAS HUMANAS DE MLA

Las células de MLA utilizadas en el presente estudio fueron obtenidas a partir de diversas colaboraciones, y se encuentran recogidas en la Tabla 5.

Nombre	Tipo de cultivo	Procedencia
M28	Línea celular	S.Puig. Hospital Clínic-IDIBAPS, Barcelona, España
M29	Línea celular	
M160113	Primario	M. Levesque. Department of Dermatology, University Hospital Zürich, Suiza.
M100513	Primario	
WM4324	Línea celular	M.Herlyn. The Wistar Institute, Philadelphia, EEUU.
WM4235	Línea celular	
MB4667	Línea celular	K. Couts. University of Colorado, EEUU.
MB2204	Línea celular	

Tabla 5. Identificación, tipo de cultivo y procedencia de las células de MLA utilizadas en el estudio.

### 2.2. PROCEDIMIENTOS BÁSICOS DE CULTIVOS CELULARES

#### 2.2.1. *Mantenimiento de las células en cultivo*

Las células de cultivos primarios fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, GIBCO™, ThermoFisher Scientific®) y el resto con medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium, GIBCO™, ThermoFisher Scientific®) en placas de poliestireno de 60 mm (P60) o 100 mm (P100) de diámetro (Corning®, Sigma-Aldrich®). Ambos fueron suplementados con un 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*; GIBCO™, ThermoFisher Scientific®), un 1% de penicilina/estreptomicina (p/s, GIBCO™, ThermoFisher Scientific®) y un 0.1% de Anfotericina B (GIBCO™, ThermoFisher Scientific®). Las células fueron mantenidas a 37°C en un incubador (ThermoFisher Scientific®) en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Para su mantenimiento, expansión y/o uso en ensayos *in vitro*, en primer lugar, el medio de cultivo es aspirado y las células son lavadas con tampón fosfato salino (PBS, del inglés, *Phosphate Buffered Saline*) 1X para eliminar los restos de medio. Posteriormente, la adherencia de las células a la placa de cultivo se rompe mediante la incubación con tripsina-EDTA 0.25% (GIBCO™, ThermoFisher Scientific®) durante 3 minutos a 37°C. A continuación, la tripsina es inactivada con medio de cultivo completo, y las células, que han perdido su adherencia a la placa, se recogen y se centrifugan durante 5 minutos a 1000 rpm. Tras la centrifugación, el pellet es resuspendido y las células se plantan en placas de cultivo a la dilución de mantenimiento pertinente.

En nuestro caso, fue muy difícil trabajar con las células de MLA en cultivo, ya que la mayoría murieron a los pocos pases (M29, WM4324, MB2204, MB4667), y con las células de cultivos primarios ocurrió lo mismo, y además en este caso, ocurrió un sobrecrecimiento de fibroblastos de forma paralela. Las líneas que logramos mantener fueron la línea celular M28, la cual fue mantenida con dos pases a la semana a una dilución 1:6 en placas P100; y la línea celular WM4235 con dos pases a la semana a una dilución 1:2 en placas P60.

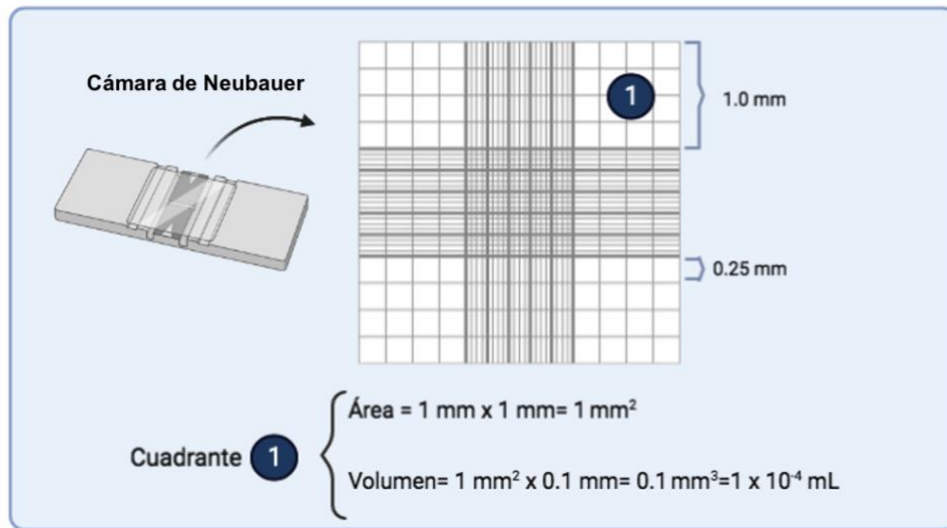
### **2.2.2. Proceso de criopreservación y descongelación de células**

Para el proceso de **criopreservación**, las células centrifugadas tras haber sido tripsinizadas, son resuspendidas en 1 mL de medio de congelación compuesto por un FBS y un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich®). La suspensión celular en medio de congelación se almacena en criotubos (ClearLine®, Biosigma), y estos a su vez son inmediatamente almacenados en un congelador a -80°C durante 24h. Después de este tiempo, los criotubos son trasladados a un tanque de nitrógeno líquido para su conservación.

En cuanto al proceso de **descongelación**, debe ser un procedimiento rápido para que la viabilidad celular se mantenga. Los criotubos son directamente calentados en un baño a 37°C tras ser extraídos del tanque de nitrógeno líquido, y una vez descongelados la suspensión celular se añade a un tubo con medio de cultivo completo precalentado. Esta suspensión se centrifuga durante 5 minutos a 1000 rpm, y tras este tiempo, se eliminan los restos de medio de congelación y el pellet obtenido es resuspendido en medio completo. Por último, el pellet se planta en una placa de cultivo con medio completo.

### 2.2.3. Contaje celular

El contaje celular se realizó de forma manual con una cámara de Neubauer. A partir de la suspensión celular obtenida tras tripsinizar y centrifugar (1 mL), se toman 10  $\mu\text{L}$  y se diluyen en 90  $\mu\text{L}$  de medio (dilución 1:10). Asimismo, se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de esta dilución y se cargaron en la cámara de Neubauer. Como podemos observar en el esquema de la *Figura 28*, cada cuadrante de la cámara tiene un  $1 \text{ mm}^2$  de área y una profundidad de 0.1 mm.



**Figura 28. Esquema de cuadrantes de una cámara de Neubauer.** Esquema representativo de una cámara de Neubauer, indicando las dimensiones del cuadrante en cuanto a área y a volumen, necesarios para el cálculo posterior de la concentración celular.

A continuación, las células de varios cuadrantes de la cámara fueron contadas, y la concentración celular se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\frac{n^{\circ} \text{ células}}{\text{mL}} = \frac{\sum n^{\circ} \text{ células por cuadrante}}{n^{\circ} \text{ cuadrantes}} \times \text{Volumen cuadrante} \times \text{Factor de dilución}$$

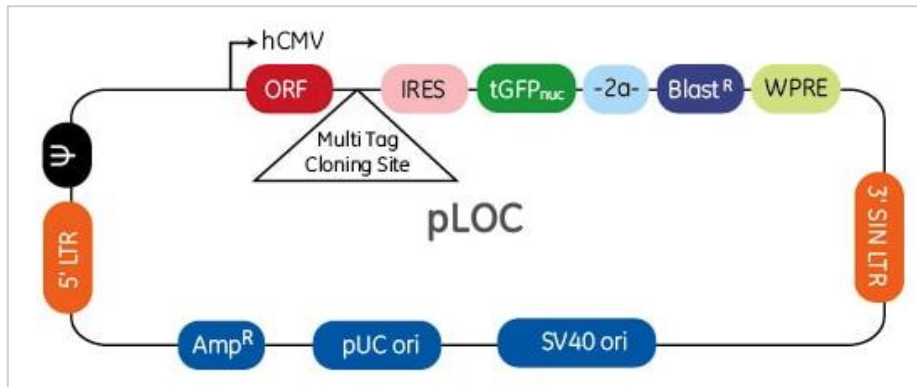
La concentración celular obtenida fue utilizada para realizar los cálculos pertinentes, según las células que necesitemos para llevar a cabo los diferentes ensayos *in vitro*.

### 2.3. OBTENCIÓN DE CÉLULAS CON SOBREENPRESIÓN DE CDK4

La sobreexpresión del gen CDK4 se llevó a cabo mediante el uso de un vector de expresión lentiviral (OHS5898-202622409, Horizon Discovery Ltd) el cual presenta un fragmento de ADNc

con marco abierto de lectura clonado (ORF, del inglés, *Open Reading Frame*) conocido como *Precision LentiORF* (pLOC) (Figura 29).

Los LentiORF de precisión son marcos de lectura abierta (ORF) de ADNc humano clonados en un vector de expresión lentiviral, que se utilizan para sobreexpresar genes y proteínas humanas en células de mamíferos.



**Figura 29. Mapa del vector pLOC.** hMCV: Promotor del citomegalovirus humano; ORF: marco abierto de lectura; tGFP<sub>nuc</sub>: Gen reportero turboGFP nuclear; Blast<sup>R</sup>: Resistencia a Blastidina; WPRE: Regulador postranscripcional de la hepatitis de la marmota. (Extraída de [horizondiscovery.com](http://horizondiscovery.com))

El vector lentiviral contiene el gen turboGFP con expresión nuclear que facilita la trazabilidad de la eficiencia de la infección lentiviral en las células infectadas, ya que habrían de verse verdes al microscopio. También presenta un gen de resistencia a Blastidina, para poder llevar a cabo una selección de las células que han incorporado el plásmido.

Paralelamente, se utilizó el mismo vector lentiviral como control del proceso (OHS5832, Horizon Discovery Ltd), el cual tenía clonado un gen turboRFP en lugar del ORF, con lo cual las células al microscopio también habrían de verse rojas.

Todo el proceso de producción de lentivirus e infección se realiza en cabinas de bioseguridad tipo IIA.

### 2.3.1. Transfección y producción de lentivirus

La producción de partículas lentivirales se realizó mediante la transfección de la línea celular empaquetadora HEK-293T, una línea celular que tienen un crecimiento rápido y que se transfecta generalmente de forma muy óptima.

Las células HEK293T se plantan el día anterior a la transfección a una dilución 1:4. Dichas células se mantienen durante el proceso en medio DMEM sin suplementar, al que se le añaden dos soluciones independientes. La primera solución contiene tres plásmidos en una concentración de 1:1:1, diluidos en NaCl (150 mM): 1) nuestro plásmido de interés/plásmido control; 2) pdPAX2, que permite el empaquetamiento del virus y 3) pMD2G, que contiene las secuencias necesarias para la envuelta viral. La segunda solución se compone de 1 mg/mL de polietilamina (PEI; Sigma-Aldrich®) diluidos en NaCl (150 mM). Tras preparar estas dos soluciones, la segunda solución se añade sobre la primera, mientras que se mezcla con el vórtex durante unos 20-30 segundos. Esta mezcla se deja reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente para que se formen los complejos necesarios para el proceso. Pasado este tiempo, la mezcla se añade gota a gota a la placa de HEK-293T con medio de cultivo sin suplementar, y se mantienen en el incubador a 37 °C durante 4-5 horas. Tras este periodo, el medio se cambia por DMEM completo con 10% FBS y las placas se mantienen en el incubador durante 72 horas.

Transcurrido este tiempo, el medio de las HEK-293T con las partículas virales formadas, se recoge y se centrifuga a 2500 rpm durante 10 minutos. Una vez centrifugado, este medio se filtra con un filtro de 0.45 µm (Merck Millipore), y se almacena hasta su uso a -80°C.

### **2.3.2. Infección lentiviral**

Las células a infectar se plantan en varios pocillos de una placa de 24 pocillos (M24, Falcon® Fischer Scientific) a una razón de 40.000 células/pocillo. Las partículas lentivirales, obtenidas en el paso anterior, se añaden a cada pocillo en medio de cultivo a una dilución 1:3, junto con polibreno (bromuro de hexadimetrina; Sigma-Aldrich®) a una concentración final de 1.75 µg/mL, el cual mejora la eficiencia de la infección. Tras 24 horas en contacto con el virus, se cambia el medio por medio DMEM completo, y las células se dejan crecer para que sobreexpresen el gen de interés.

La única línea celular que permitió realizar todo este proceso fue la línea celular M28, la cual fue infectada tanto con el vector control (M28 Control), como con el vector de sobreexpresión de CDK4 (M28 CDK4 O/E).

### **2.3.3. Trazabilidad de la infección y selección de las células**

Pasados unos días tras la infección, las células se observan en el microscopio para evaluar la eficiencia de la infección según la expresión nuclear del gen GFP que porta el vector lentiviral (también rojo en el caso del vector control). Para enriquecer nuestro cultivo en células que hayan integrado el plásmido, se incuban con Blastidina (Sigma -Aldrich®) a una concentración de 1 µg/µL, diluida en el medio de cultivo, para seleccionar aquellas células que contienen dicho plásmido. Tras 4-6 días de la selección, las células pueden mantenerse normalmente en cultivo, o utilizarse para realizar los ensayos *in vitro* necesarios.

## 3. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

---

### **3.1. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DEL ADN**

#### **3.1.1. Extracción de ADN de la región tumoral de biopsias incluidas en parafina**

En primer lugar, a partir de una tinción de hematoxilina-eosina, se procede a la revisión de la biopsia del tumor, y la región tumoral es seleccionada (*Figura 30*). A continuación, desde el Servicio de Anatomía Patológica del HUAV se realizan varias secciones de 10 µm de la biopsia incluida en parafina, que se colocan en portaobjetos. El número de cortes va a depender del tamaño de la región tumoral, ya que, de esta forma, aumentamos la cantidad de tejido para extraer una concentración óptima de ADN.

A continuación, procedemos a rascar con ayuda de un bisturí la zona tumoral del corte de la biopsia en el portaobjetos. Para ello, nos ayudamos de la HE con la región tumoral marcada, la cual colocaremos debajo del portaobjetos con el corte de la biopsia que quedará superpuesta sobre la HE. A continuación, recogemos el tejido que hemos rascado con el bisturí y lo colocamos en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL (Eppendorf). Realizamos un spin durante unos 15 segundos para que el contenido que ha quedado en la pared del tubo quede recogido en el fondo del mismo.



A continuación, añadimos a cada tubo una mezcla de 20 mL de Proteinasa K (Stock: 20 mg/mL) con 180 mL de Incubation Buffer, ambos reactivos pertenecientes al kit Maxwell® RSC FFPE Plus DNA (Promega). Las muestras son incubadas a 70°C hasta el día siguiente, y a continuación la extracción de DNA propiamente dicha, es llevada a cabo por el Biobanco del IRBLleida utilizando el kit Maxwell® RSC FFPE Plus DNA (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN es eluido en tampón TE (Promega), y cuantificado mediante NanoDrop ND 2000 (ThermoFisher Scientific®).

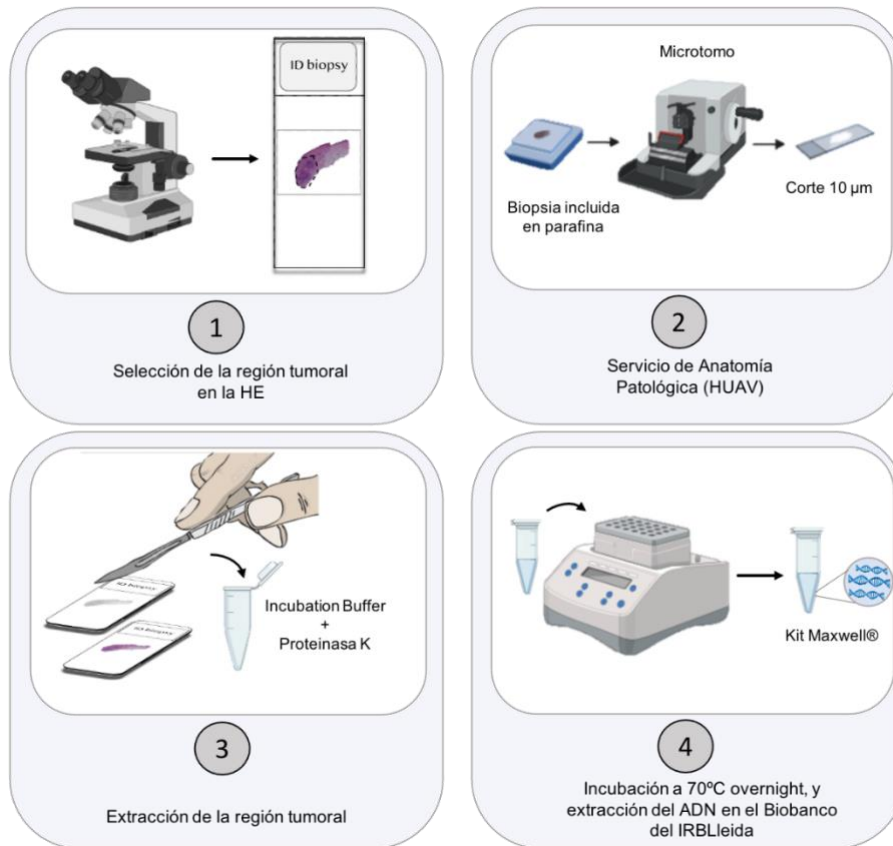


Figura 30. Flujo de trabajo realizado para la extracción de ADN de biopsias incluidas en parafina.

### 3.1.2. Extracción de ADN de las líneas celulares de MLA

Las células son centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos tras ser tripsinizadas. A continuación, el pellet obtenido es lavado con PBS y se centrifuga de nuevo de la misma forma. El sobrenadante es retirado, y dicho pellet es resuspendido en 100 mL de PBS. La extracción de ADN es llevada a cabo por el Biobanco del IRBLleida utilizando el kit Maxwell® RSC Cell DNA Purification (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante, y posteriormente cuantificado mediante NanoDrop.

### 3.1.3. *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA®)*

La amplificación de sondas múltiples dependientes de ligación (MLPA®, del inglés, *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*) es una técnica semicuantitativa y no automatizada que permite analizar simultáneamente **la variación del número de copias** (CNVs) de un conjunto genes.

El fundamento del MLPA está basado en la amplificación de hasta 60 sondas, las cuales pueden detectar de forma individual secuencias específicas de nuestro ADN de interés, de unos 60 nucleótidos (nt) de longitud. Estas sondas hibridan con las secuencias diana, y posteriormente en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*) múltiple son amplificadas. La reacción da lugar a un conjunto de amplicones de PCR únicos con unas longitudes de entre 64-500 nt, los cuales son separados mediante una electroforesis capilar. Es de suma importancia que, en cada experimento que llevemos a cabo, se utilicen varias muestras de referencia (controles no tumorales), ya que las CNVs de nuestras muestras de interés serán calculadas de forma relativa en base a las muestras de referencia. En nuestro caso, añadimos tres **muestras de referencia** por experimento de ADN no tumoral, además de un control negativo sin ADN.

En este trabajo, las CNVs fueron analizadas con el kit de sondas *SALSA P175-Tumor Gain* (MRC Holland) en 24 genes que se encuentran frecuentemente amplificados o con ganancias en varios tipos de tumores, además de la mutación *BRAF<sup>V600E</sup>*. El kit incluye dos sondas por cada gen detectado (48 en total), además de 13 **sondas de referencia** que detectan localizaciones cromosómicas autosómicas que son relativamente estables en la mayoría de tumores, y que sirven para el análisis de los resultados. Conjuntamente con el kit *SALSA P175-Tumor Gain*, fue necesario utilizar un kit con todos los reactivos necesarios para realizar la técnica, el kit *SALSA MLPA Reagent-FAM* (MRC-Holland). Los genes que fueron estudiados se encuentran recogidos en la *Tabla 6* junto a su localización cromosómica.

Gen	Localización cromosómica	Gen	Localización cromosómica
<i>MDM4</i>	1q32.1	<i>ABL1</i>	9q34.12
<i>ALK</i>	2p23.2	<i>MET</i>	9q34.12
<i>MYCN</i>	2p24.3	<i>RET</i>	10q11.21
<i>PDGFRA</i>	4q12	<i>CCND1</i>	11q13.2
<i>KDR</i>	4q12	<i>CCND2</i>	12p13.32
<i>KIT</i>	4q12	<i>ERBB2</i>	17q12
<i>DHFR</i>	5q14	<i>TOP2A</i>	17q21.2
<i>SMO</i>	7q32.1	<i>AURKB</i>	17p13.1
<i>BRAF/BRAF<sup>V600E</sup></i>	7q34/ (c.1799T>A)	<i>CDK4</i>	12q14.1
<i>EGFR</i>	7p11.2	<i>MDM2</i>	12q14.1
<i>FGFR1</i>	8p12	<i>AURKA</i>	20q13.2
<i>MYC</i>	8q24.21	<i>AR</i>	Xq12

**Tabla 6. Genes estudiados a través de la técnica MLPA.** Los genes se encuentran representados junto con su localización cromosómica.

La técnica se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante (MRC-Holland), las cuales abarcaban los siguientes pasos: 1) desnaturalización del ADN genómico e hibridación de las sondas; 2) reacción de ligación; 3) amplificación de los fragmentos mediante PCR; y 4) separación de los fragmentos mediante electroforesis capilar. Por último, los resultados obtenidos de la electroforesis capilar son analizados mediante el software *Coffalyser.Net<sup>TM</sup>*.

- **Paso 1: Desnaturalización del ADN genómico e hibridación con las sondas**

En primer lugar, 5  $\mu$ L (50-100 ng) del ADN extraído de la muestra es desnaturalizado durante 5 minutos a 98°C en un termociclador (Bio-Rad). A continuación, se prepara la mix de hibridación a temperatura ambiente compuesta por *MLPA Buffer* y *MLPA probemix*. Este último reactivo contiene una mezcla de sondas que hibridan con las secuencias de interés de la lista de genes de la *Tabla 6*. Cada sonda del MLPA está formada por dos oligonucleótidos (LPO y RPO). Ambos oligonucleótidos incluyen secuencias de reconocimiento de *primers* de PCR, y regiones de hibridación con el ADN de interés, además el fragmento RPO contiene una secuencia adaptadora que le da una longitud única y concreta a cada sonda que permitirá su distinción. Las dos partes de la sonda hibridan en zonas inmediatamente adyacentes en las secuencias diana del ADN (*Figura 31*).

Tras la desnaturalización se añade la mix de hibridación sobre el ADN desnaturalizado en proporción 1:1, y se deja incubar durante 1 minuto a 95°C. Posteriormente, se mantiene a 60°C durante 16-20 horas para que ocurra el proceso de hibridación sonda-ADN de interés.

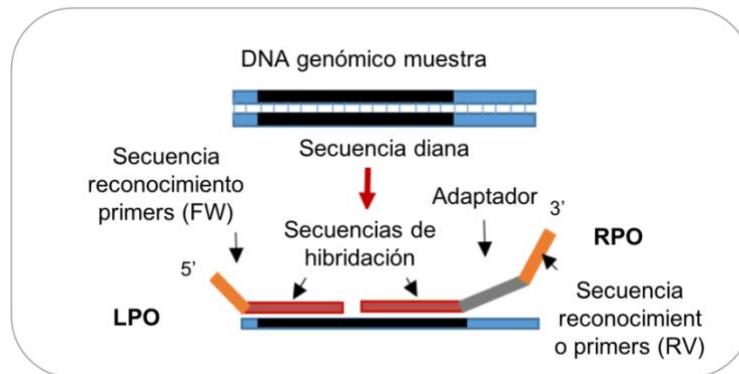


Figura 31. Esquema del paso de desnaturalización e hibridación del ADN genómico de la muestra y los oligonucleótidos (LPO y RPO) de la sonda de la técnica MLPA.

- **Paso 2: Ligación de las sondas**

El segundo paso es la ligación de los oligonucleótidos de la sonda que han hibridado con las secuencias diana adyacentes. Los emparejamientos erróneos entre bases no son permitidos alrededor del sitio de ligación, lo que hace que esta reacción de ligación sea altamente específica (Figura 32).

La temperatura del termociclador es reducida a 54°C, y se le añade la mix de ligación compuesta por agua, *Ligase Buffer A*, *Ligase Buffer B* y *Ligase-65*. Las muestras son incubadas durante 15 minutos a 54°C, y posteriormente la ligasa es inactivada mediante calor, incubando la muestra a 98°C durante 5 minutos. Finalmente, pausamos la reacción a 20°C pasado este tiempo.

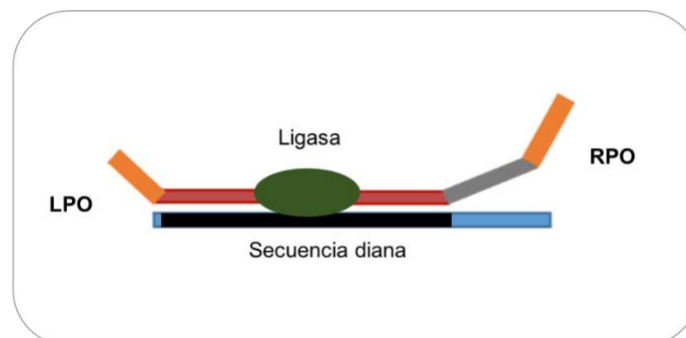


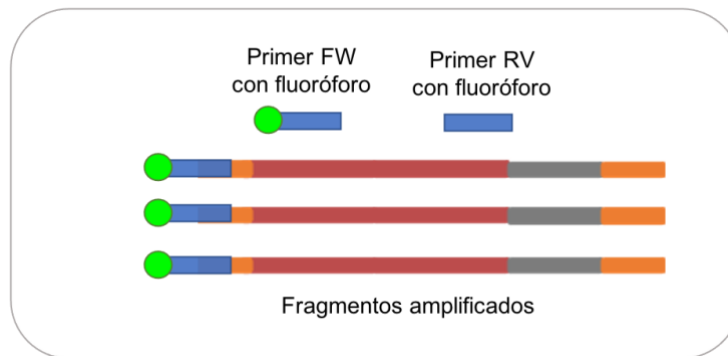
Figura 32. Esquema de la reacción de ligación entre los dos oligonucleótidos que componen la sonda.

- **Paso 3: Amplificación de las sondas ligadas**

En este tercer paso, las sondas que han sido ligadas son amplificadas mediante una PCR múltiple, utilizando un par de *primers* universales. El *primer* FW está marcado con un fluorocromo que permitirá la posterior detección de las sondas. Solo aquellas sondas que se han ligado correctamente serán amplificadas de forma exponencial (*Figura 33*).

La mix de amplificación se prepara con agua, *PCR primer mix* y *SALSA polymerase*, y es añadida a la muestra a temperatura ambiente. A continuación, se programa la reacción de PCR:

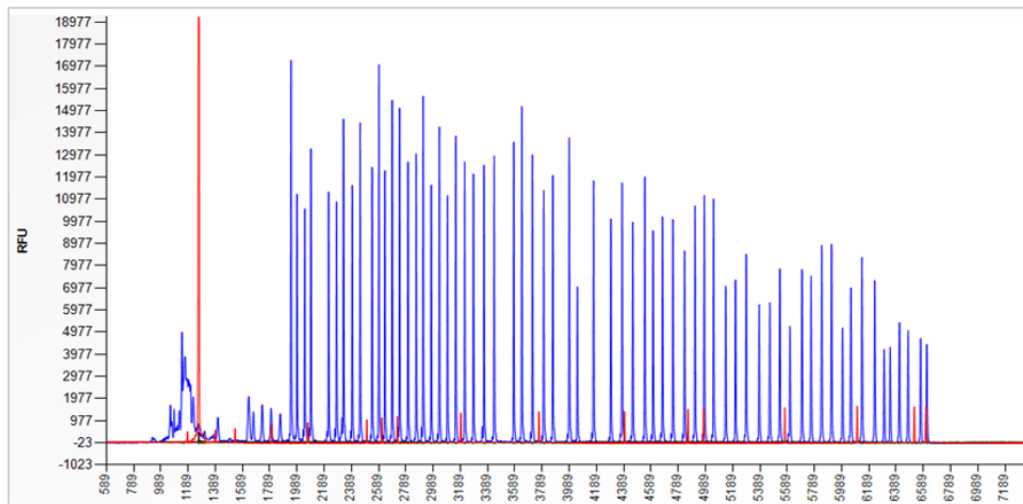
35x (95°C 30 segundos, 60°C 30 segundos, 72°C 60 segundos), 72°C 20 minutos, 15°C pausa.



**Figura 33.** Esquema del proceso de amplificación de las sondas mediante una PCR múltiple. Se utilizan un par de primers universales, en los que el primer FW está marcado con un fluoróforo que permitirá su detección.

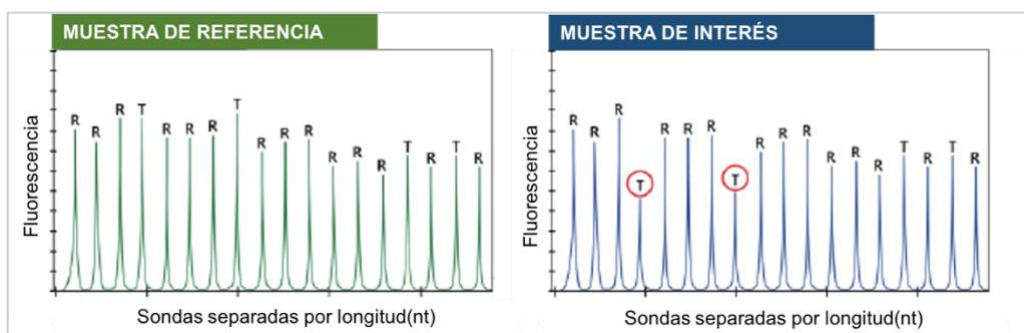
- **Paso 4: Separación de los fragmentos mediante electroforesis capilar**

A continuación, cargamos las muestras junto con el marcador de peso molecular y formamida en el equipo ABI-SeqStudio (Applied BioSystems) para separar los fragmentos por su longitud mediante electroforesis capilar. Cada fragmento detectado corresponde a una sonda específica de MLPA (*Figura 34*).



**Figura 34. Electroferograma obtenido de la electroforesis capilar de los fragmentos.** Cada pico azul representa a una sonda del kit utilizado.

A partir de la electroforesis capilar obtenemos los electroferogramas de cada muestra, en el que cada pico observado corresponderá una sonda. Como hemos mencionado anteriormente, la técnica MLPA es de cuantificación relativa, es decir, cuando se comparan los patrones de picos de diferentes muestras de ADN obtenidos mediante MLPA, solo pueden detectarse diferencias relativas. La altura de cada uno de los picos generados por las sondas en nuestra muestra de interés (tumor), comparada con las alturas de los picos generados por las sondas en varias muestras de ADN de referencia (no tumorales), refleja el número de copias relativas de la secuencia diana en la muestra. Al comparar a simple vista, el electroferograma de una muestra de referencia y de una muestra de interés, podríamos observar un aumento relativo de la altura del pico en nuestra muestra respecto a la de referencia, que indicaría un aumento de copias; o por el contrario un descenso relativo del pico, que indicaría una delección, como podemos observar en la *Figura 35*.



**Figura 35. Representación esquemática de la comparación entre un electroferograma de una muestra de referencia y de una muestra de interés con delecciones.** Se observa un descenso relativo del pico de la muestra de interés respecto a la muestra de referencia, que indica la presencia de una delección en dos de los genes (T) detectados por las sondas. (*Adaptado de MRC-Holland*).

- **Paso 5: Análisis e interpretación de los resultados**

El paso final de la técnica es el análisis de los datos obtenidos mediante el software *Coffalyser.Net*<sup>TM</sup>. Este software realiza un análisis exhaustivo de control de calidad del experimento, así como una serie de pasos de normalización de los datos y posteriores cálculos que da lugar a las ratios finales de las sondas. *Coffalyser.Net* realiza un proceso de **intranormalización** en el que convierte las señales absolutas en valores relativos mediante la normalización de las sondas de interés respecto a las sondas de referencia de una muestra. Durante el proceso de **internormalización**, el programa compara cada muestra con la muestra de referencia. El proceso de normalización se da en dos pasos que se explican a continuación:

**Paso 1:** En este proceso se divide la señal de la sonda de interés 1 ( $SI_1$ ), entre la intensidad de la sonda de referencia 1 ( $SR_1$ ) de nuestra muestra de interés. Este mismo proceso se realiza con la muestra de referencia. A continuación, el valor obtenido de la muestra de interés se divide entre el de la muestra de referencia, realizándose este procedimiento para cada sonda de referencia incluida en la mezcla de sondas, en este caso 13 sondas. A continuación, se calcula la mediana para todas estas relaciones, como se indica en la siguiente ecuación:

$$\text{Mediana} \left( \frac{(SI_1 \text{ en muestra } 1 / SR_1 \text{ muestra } 1)}{(SI_1 \text{ en muestra de ref } 1 / SR_1 \text{ muestra de ref } 1)}, \left( \frac{(SI_1 \text{ en muestra } 1 / SR_n \text{ muestra } 1)}{(SI_1 \text{ en muestra de ref } 1 / SR_n \text{ muestra de ref } 1)} \right) \right)$$

**Paso 2:** El paso anterior se realiza con cada muestra de referencia incluida en el análisis. Esto da lugar a tantos valores medianos como muestras de referencias incluidas, en nuestro caso tres valores. A continuación, el software calcula la media de los valores de las medianas obtenidos. El valor de la media calculado corresponde al valor de la **ratio final** de la  $SI_1$  de la muestra 1. Este procedimiento se repite para cada una de las sondas de interés.

El software genera un gráfico de proporción por muestra, en el que se representan las ratios finales obtenidas del análisis anteriormente explicado, ordenadas según la localización cromosómica, en la que las deleciones se representan en rojo, y las amplificaciones en azul. En la gráfica se establecen dos límites, representados como dos líneas horizontales, una línea azul a una proporción de 1.3 y una línea roja a una proporción de 0.7, a partir de los cuales establecemos que:

- **Final ratio = 0** → delección homocigota (0 copias)
- **Final ratio >0 y <0.7** → delección heterocigota (1 copia)
- **Final ratio >0.7 y <1.3** → diploide (2 copias)
- **Final ratio >1.3** → amplificación (>2 copias)

Además de calcular los ratios finales de las sondas, *Coffalyser.Net*<sup>TM</sup> utiliza la estadística para determinar si un resultado es fiable o no. Para ello, calcula un intervalo de confianza del 95% a partir de las muestras de referencia de cada sonda. Esto representa el intervalo en el que se espera que caiga la proporción de la sonda en 95 de cada 100 muestras de referencia. El intervalo de confianza del 95% de una sonda con respecto a las muestras de referencia, se representa como un diagrama de cajas en el gráfico de proporciones. Por otro lado, también hace una estimación del intervalo de confianza del 95% para cada sonda de una muestra. Este intervalo representa el rango en el que se espera que caiga la proporción de la sonda en 95 de cada 100 experimentos en la muestra. El intervalo de confianza del 95% de una sonda se representa como barras de error de la ratio final de cada sonda.

Teniendo en cuenta que esta técnica es semicuantitativa, su sensibilidad no permite saber el número exacto de copias que se encuentran amplificadas en una muestra, pero sí una

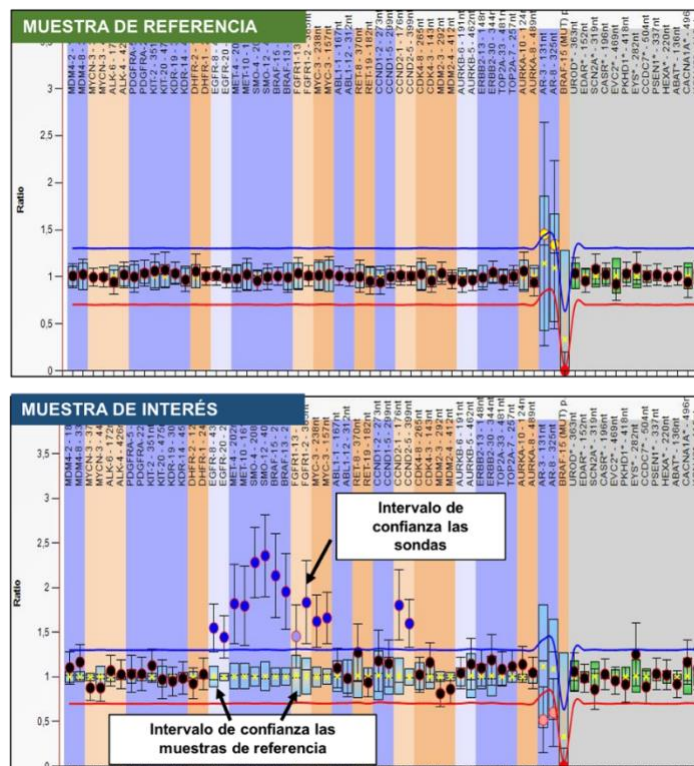


Figura 36. Representación de los gráficos de proporciones obtenidos mediante *Coffalyser.Net* en una muestra de referencia (arriba) y en una muestra de interés (abajo). En el eje horizontal se representan las sondas, y en el vertical las proporciones. Las amplificaciones se representan en azul, las delecciones en rojo y aquellos genes diploides en negro.



estimación. Por lo que se considerará que la muestra presenta 3 copias del gen si se observa una ratio final 1.3 a 2.0, y un número mayor de 4 copias si la ratio es superior a 2.0.

### 3.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DEL ARN

#### 3.2.1. Extracción de ARN

La extracción del ARN se realizó con el kit comercial *SurePrep™ TrueTotal™ RNA Purification Kit* (ThermoFisher Scientific®) a partir de las líneas celulares humanas de MLA o fibroblastos de ratón, según las instrucciones del fabricante. La extracción se hace a partir de una mix de extracción, compuesta por *Lysis buffer* (350 µL) y β-mercaptoetanol (3.5 µL) que se añade a cada muestra. A lo largo de la extracción se utiliza la enzima *DNAsa I*, cuyo papel es eliminar el ADN genómico de la muestra para que no se den interferencias en la señal durante el análisis del ARN. Finalmente, dicho ARN es eluido en H<sub>2</sub>O ARNsa-free, se cuantifica mediante NanoDrop y se conserva a -80°C hasta su uso.

#### 3.2.2. PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Esta técnica permite analizar la **expresión de genes** a partir de ADNc sintetizado a partir del ARN extraído. La RT-qPCR fue realizada con el kit comercial *qPCRBIO Probe 1-Step Go* (PCR Biosystems) según las instrucciones del fabricante. Esta tecnología permitió llevar a cabo la síntesis de ADNc y RT-qPCR en un mismo paso. El ADNc se sintetiza con una **transcriptasa inversa**, y a partir de éste, se realiza una RT-qPCR que, a través del uso de una **sonda específica** para cada gen diana y marcada con un fluorocromo, permite el análisis de la expresión de dicho gen. Este análisis se llevó a cabo mediante el uso del siguiente programa en el termociclador CFX96™ (Bio-Rad):

45°C 10 min, 95°C 2 min, 40x (95°C 5 segundos, 60°C 20 segundos)
--

Las sondas (ThermoFisher Scientific®) que fueron utilizadas en el presente trabajo se encuentran recogidas en la *Tabla 7*:

Gen	Especie	Referencia
<b>ALDH1A1</b>	Humano	Hs00946916_m1
<b>GAPDH</b>	Humano	Hs99999905_m1
<b>Tgfβ1</b>	Ratón	Mm00441724_m1
<b>Vegfa</b>	Ratón	Mm00437304_m1
<b>Il6</b>	Ratón	Mm00446190_m1
<b>Gapdh</b>	Ratón	Mm99999915_g1

**Tabla 7. Sondas utilizadas para el análisis de expresión mediante RT-qPCR.** En la tabla se detalla el gen al que va dirigido cada sonda, la especie y su correspondiente referencia.

Se utilizaron triplicados por cada condición, tanto para las experimentales como para las condiciones control, así como un control negativo sin ARN para descartar la presencia de contaminaciones en las muestras. Tras la finalización del programa de PCR, los resultados son analizados a partir de los **valores de Ct** (del inglés, Cycle Threshold), los cuales indican el ciclo al que los productos de PCR de nuestra muestra comienzan a incrementar de forma exponencial. Con lo cual, cuanto mayor es el valor de Ct, menor cantidad de ARNm se habrá amplificado y, por tanto, la expresión del gen será inferior; lo mismo ocurriría con valores bajos de Ct, pero de forma inversa. Los niveles de expresión calculados, son niveles relativos, ya que la expresión de cada gen es obtenida a partir de la expresión de un **gen control constitutivo o housekeeping**. En el presente trabajo hicimos uso del gen *housekeeping*, *GAPDH*. La fórmula empleada para el cálculo relativo de la expresión fue:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen diana} - Ct \text{ gen housekeeping}$$

Posteriormente, la expresión relativa del gen diana de las condiciones experimentales son relativizadas a partir de las condiciones control con la siguiente fórmula:

$$\Delta(\Delta Ct) = \Delta Ct \text{ condición experimental} - \Delta Ct \text{ control}$$

A partir de estos valores, se calcula  $2^{-\Delta(\Delta Ct)}$  que se corresponde con el nivel relativo de ARNm de la condición experimental respecto al control. Este valor se calcula por cada triplicado, y se realiza la media de todos ellos por condición, calculándose también el error estándar.

## 4. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

---

### 4.1. Western Blot

La técnica de **Western Blot** es una técnica de detección de proteínas que abarca varios pasos, los cuales serán expuestos a continuación:

#### Paso 1: Extracción de proteínas

Para la extracción proteica a partir de células en cultivo, las células se plantan a un 70% de confluencia, y tras 24-48h (según el crecimiento de la línea) se procede a la extracción en frío. Tras este tiempo, el medio de cultivo se aspira y las células se lavan 3 veces con PBS 1X frío. Tras los lavados se añade el buffer de lisis desnaturante compuesto por Tris HCl 50 mM, NaCl 150 mM, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS y EDTA 1 mM, y con ayuda de un raspador se recoge todo el lisado. Este lisado es sonicado haciendo pulsos de 10-15 segundos (3 veces), y a continuación, los restos que no se han lisado son eliminados mediante una centrifugación a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El pellet obtenido es descartado, y los sobrenadantes se almacenan a -20°C hasta su uso.

#### Paso 2: Cuantificación de proteínas y preparación de la muestra

La cuantificación de proteínas fue realizada con el **método Lowry**, un método colorimétrico en el que se añade un reactivo incoloro que forma complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  con las proteínas de la muestra. Estos complejos dan lugar a una reacción colorimétrica medible mediante un espectrofotómetro, siendo la intensidad de color detectada proporcional a la cantidad de proteína de la muestra. La **concentración proteica** se calcula a partir de una recta patrón con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA, del inglés, Bovine, Serum Albumin).

El protocolo se realiza en una placa de 96 pocillos (M96, Falcon® Fischer Scientific) a la que se le añade, por un lado 5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los puntos de la recta patrón, y, por otro lado, 3  $\mu\text{L}$  de las muestras de concentración desconocida; de todas ellas se hicieron triplicados. A continuación, se añaden dos reactivos (Bio-Rad) para la realización del Lowry a cada pocillo, 25  $\mu\text{L}$  del reactivo A y seguidamente, 200  $\mu\text{L}$  del reactivo B, que da lugar a la reacción colorimétrica. La reacción se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente, en agitación y protegido de la luz. Tras la incubación, se analizan los valores de absorbancia a través de un espectrofotómetro (Biotek) a una longitud de onda de 595 nm. A través de los valores de

absorbancia de la BSA, se construye una recta patrón, a la que se extrapolan los valores de las muestras de interés, para obtener la concentración proteica de las mismas.

Tras obtener la concentración proteica, se tomaron 15  $\mu\text{g}$  de proteína de cada muestra, añadiendo a cada una el volumen necesario para alcanzar la cantidad de proteína necesaria en un volumen de 20  $\mu\text{L}$ . A este volumen se le añadió 3.75  $\mu\text{L}$  de buffer de carga (LB, del inglés, *Loading Buffer*), compuesto por un 10% de SDS, 50% de glicerol, 720 nM de  $\beta$ -mercaptoetanol, 250 mM Tris pH 6.8 y azul de bromofenol). Las muestras se incuban a 95°C durante 5 minutos para así terminar de desnaturalizar la proteína.

### Paso 3: Electroforesis mediante gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras preparadas son cargadas en un **gel desnaturalizante de poliacrilamida con SDS**, para separar las proteínas según su peso molecular. El gel que se utiliza es discontinuo, es decir, está formado por dos geles con porcentajes de acrilamida diferentes, un gel superior **apilador o *stacking***, el cual tiene los pocillos donde se cargan las muestras, y que se utiliza para concentrar las proteínas en el frente de migración para que entren a la vez en el gel contiguo. Este gel, es el gel de **separación o *resolving***, que se encarga de separar las proteínas según su peso molecular. Ambos geles fueron preparados con concentraciones diferentes de polímero, a partir de una solución de 39% Acrilamida/1% Bis-acrilamida (Acryl/Bis, Bio-Rad). El gel *stacking* está constituido por un 5% de Acryl/Bis en un tampón con 125  $\mu\text{M}$  de Tris-HCl a pH 6.8; y el de separación por un porcentaje de Acryl/Bis que oscila entre un 7% y un 15%, según el tamaño de las proteínas que queremos detectar, en un tampón de 375  $\mu\text{M}$  de Tris-HCl a pH 8.8. La reacción de polimerización de ambos geles se da mediante el uso de persulfato de amonio como catalizador (Sigma-Aldrich®) al 0.05% y de TEMED al 0.1% como iniciador de la reacción.

Tras la preparación de los geles, estos fueron colocados en el sistema MiniProtean®(Bio-Rad), y las muestras se cargan en los pocillos del *stacking* junto con el marcador de peso molecular *PageRuler* (ThermoFisher Scientific®) en otro pocillo, para poder localizar la presencia de nuestras proteínas de interés. Las muestras migran a través del gel a un voltaje de 120 V en un tampón de migración o *running buffer* compuesto por 25 mM Tris, 1.44% Glicina y un 0.1% de SDS.

#### Paso 4: Transferencia de proteínas a una membrana de PVDF

Una vez las proteínas han sido separadas, éstas son transferidas del gel a una **membrana de PVDF** (Immobilon-P, Merck Millipore) mediante el sistema de transferencia de proteínas MiniProtean®(Bio-Rad). Previa transferencia, es necesario activar la membrana de PVDF con Metanol. La transferencia se realiza a través de la formación de un 'sándwich' sobre el *cassette* de transferencia mediante una esponja, un papel Whatman®(Cytiva), el gel, la membrana de PVDF, otro papel Whatman® y de nuevo una esponja. Todo el conjunto es colocado en la solución de transferencia (25 mM Tris y 192 mM de glicina a pH 8.3) con un bloque de hielo que evita que el conjunto se sobrecaliente. A continuación, se dejan transferir las proteínas del gel a la membrana durante 1 hora a 70V.

Tras acabar la transferencia, la membrana es bloqueada, con el objetivo de evitar las uniones inespecíficas, en una **solución de bloqueo** formada por leche desnatada en polvo al 5% disuelta en tampón TBS-T compuesto por 20 mM de Tris a pH 7.4, 150 mM de NaCl y un 0.1% de Tween-20. La membrana se mantiene en solución de bloqueo durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Los restos de esta solución son eliminados mediante tres lavados de 10 minutos con TBS-T.

#### Paso 5: Detección proteica mediante anticuerpos

En este paso se lleva a cabo la inmunodetección de las proteínas a través de la incubación de la membrana con **anticuerpos primarios** durante 16h a 4°C. Los anticuerpos primarios son preparados en una solución de TBS-T con un 3% de BSA y un 0.02% de Azida Sódica, que permite la reutilización del anticuerpo evitando contaminaciones bacterianas. Tras la incubación, los restos del anticuerpo son eliminados con tres lavados de 10 minutos con TBS-T, y posteriormente incubada con el **anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa de rábano** (HRP, del inglés *Horseradish Peroxidase*) durante 1 hora a temperatura ambiente. Los restos del anticuerpo secundario son eliminados con tres lavados con TBS-T durante 15 minutos. Los anticuerpos para Western Blot utilizados se encuentran recogidos en la *Tabla 8*.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia
Anti-CDK4	Conejo	1:1000	Cell Signaling #12970
Anti-GAPDH	Ratón	1:1000	Santa Cruz Biotechnology sc-32233
Anti-IgG de conejo conjugado con HRP	Cabra	1:10000	Jackson ImmunoResearch 111-035-003
Anti-IgG de ratón conjugado con HRP	Cabra	1:10000	Jackson ImmunoResearch 115-035-003

Tabla 8. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la técnica del Western Blot.

El anticuerpo secundario se encuentra conjugado con la HRP, la cual permite la detección de la señal, siendo esta señal proporcional a la cantidad de proteína de interés en la muestra. Para detectar esta señal, se utiliza el reactivo comercial *Luminata<sup>TM</sup> Forte Western HRP Substrate* (Merck Millipore®), que mediante la catálisis del agua oxigenada y la oxidación del luminol produce un incremento de la quimioluminiscencia. Por último, la membrana se visualiza con el sistema *ChemiDoc<sup>TM</sup> MP Imaging System* (Bio-Rad), y se analiza el software asociado a este equipo, *Image Lab* (Bio-Rad).

#### 4.2. Array de detección de citoquinas

El estudio del perfil de secreción de factores solubles se realizó mediante el *Human Cytokine Array G5-8* (RayBiotech Life, Inc), un **array de citoquinas**, dividido en 8 subarrays, que permitió la detección simultánea de 80 citoquinas en el sobrenadante de las líneas celulares de MLA. El procedimiento fue realizado según las instrucciones del fabricante. Las citoquinas evaluadas en el array se encuentran recogidas en la *Tabla 9*:

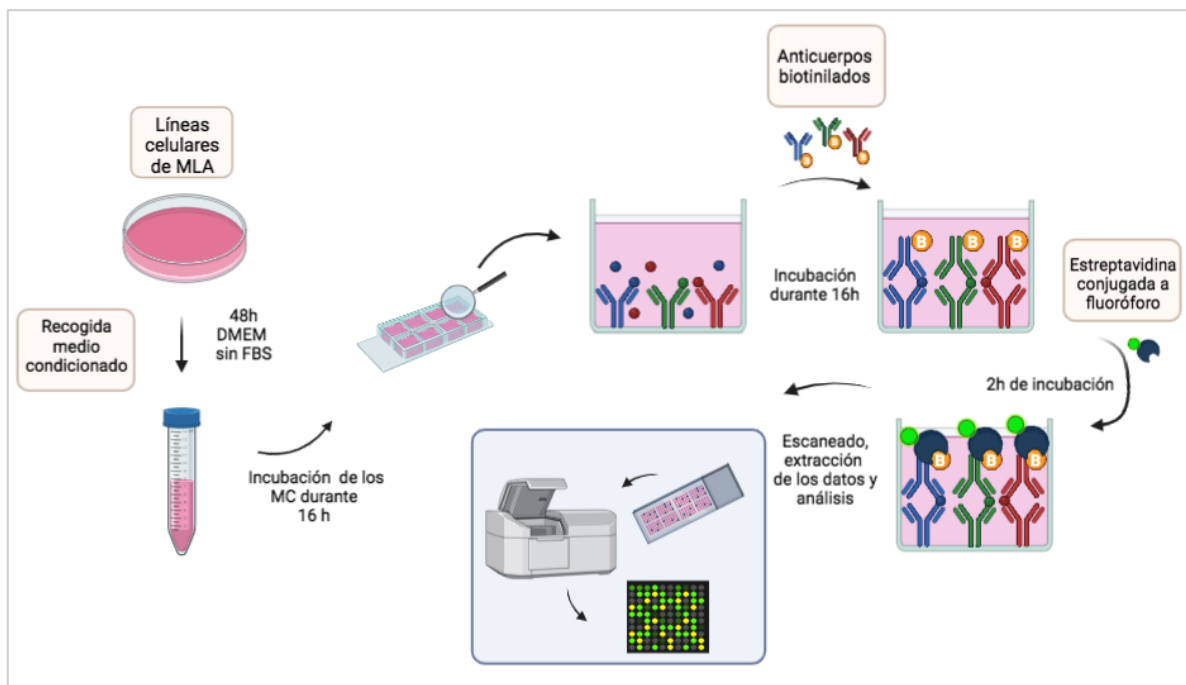
Citoquinas			
Angiogenin	GRO-a	IL-6	NT-4
BDNF	HGF	IL-7	Oncostatin M
BLC	I-309	IL-8	Osteopontin
Ck b 8-1	IFN- g	IP-10	Osteoprotegerin
EGF	IGF-I	Leptin	PARC
ENA-78	IGFBP-1	LIF	PDGF-BB
Eotaxin	IGFBP-2	LIGHT	PIGF
Eotaxin-2	IGFBP-3	MCP-1	RANTES
Eotaxin-3	IGFBP-4	MCP-2	SCF
FGF-4	IL-1 b	MCP-3	SDF-1
FGF-6	IL-10	MCP-4	TARC
FGF-7	IL-12 p70	MCSF	TGF- b 2
FGF-9	IL-13	MDC	TGF- b 3
FIt-3 Ligand	IL-15	MIF	TGF-b1
Fractalkine	IL-16	MIG	Thrombopoietin
GCP-2	IL-1a	MIP-1b	TIMP-1
GCSF	IL-2	MIP-1d	TIMP-2
GDNF	IL-3	MIP-3 a	TNF-a
GM-CSF	IL-4	NAP-2	TNF-b
GRO	IL-5	NT-3	VEGF

**Tabla 9.** Citoquinas evaluadas en el array de citoquinas *Human Cytokine Array G5-8*.

Para el estudio del secretoma, el primer paso fue recoger el medio que se encontraba en contacto con las líneas celulares, también conocido como medio condicionado (MC) (Figura 37). Los medios condicionados se recolectan bajo una serie de condiciones específicas, los cuales contienen citoquinas, factores de crecimiento, proteínas, entre otros metabolitos. El secretoma fue evaluado en las líneas (por duplicado): M28, WM4235, M28 Control y M28 CDK4 O/E. A día 0, se plantaron aproximadamente un  $1 \times 10^6$  células en la placa de cultivo con DMEM completo. El día 3 tras plantar las células, el medio de cultivo es cambiado por DMEM sin FBS. A día 5, es decir tras 48 horas tras el cambio de medio, el medio es recogido y centrifugado a 2000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos para eliminar los restos celulares. A continuación, el medio es alicuotado y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso experimental.

Tras obtener los MCs, colocamos el array de detección en una cabina de flujo laminar durante 2 horas, para secarlo por completo. Tras secar el chip, se incuba con *Blocking Buffer 1X* para evitar las señales inespecíficas. A continuación, se decanta el chip, se eliminan los restos del buffer y se añade la muestra de interés, en este caso los MCs de las líneas de MLA.

El array es incubado con las muestras durante 16h a 4°C en agitación. Pasado este tiempo, se realizan lavados consecutivos con varios buffers indicados en el protocolo de la casa comercial, y se añade a cada sub-array una mezcla de **anticuerpos de detección conjugados a biotina**, los cuales fueron incubados en el array nuevamente durante 16h a 4°C en agitación. Tras lavar secuencialmente con los buffers del kit, eliminamos los restos de los anticuerpos e incubamos durante 2h a temperatura ambiente y en oscuridad, con la **estreptavidina**, la cual se encuentra marcada con un fluoróforo. Finalmente, para eliminar todos los restos y evitar señales inespecíficas, se realizan varias secuencias de lavado con varios buffers del kit comercial, y, por último, el chip se deja secar a temperatura ambiente en una cabina de flujo laminar. El chip es leído con un escáner láser (GenePix®) en el que se utilizó el canal verde o Cy3, con una frecuencia de excitación de 532 nm. La intensidad de fluorescencia observada en cada spot tras escanear el chip es directamente proporcional a la cantidad de citoquina secretada en el MC en cuestión.



**Figura 37. Esquema del flujo de trabajo realizado para el análisis del secretoma mediante un array de citoquinas.**

El array de citoquinas permitió la detección de un conjunto de 80 citoquinas en el MC de las líneas celulares de MLA.

(Creada con BioRender.com).



El análisis de los resultados se realizó a partir de una hoja de cálculo de Microsoft Excel aportada por la casa comercial. Tras el escaneo, obtuvimos las intensidades de cada spot, que correspondían cada uno a una citoquina, y también valores correspondientes al ruido de fondo en torno a cada spot. A cada valor de intensidad se le sustrajo el valor del ruido de fondo, y los datos fueron normalizados a partir de tres spots del array que son controles positivos. El cálculo se realizó con la siguiente fórmula:

$$X(Ny) = X(y) \times \frac{P1}{P(y)}$$

Donde  $P1$  es la intensidad de la señal media de los spots de los controles positivos del array de referencia, siendo el array de referencia predeterminado la Muestra 1 en la hoja de cálculo (en este caso la línea M28);  $P(y)$  es la intensidad de señal media de los puntos de los controles positivo del subarray 'y';  $X(y)$  es la intensidad de la señal media para el spot X del subarray 'y'; y  $X(Ny)$  es el valor de la intensidad de la señal normalizada para el spot X en el subarray 'y'.

Para la **visualización e interpretación de los datos**, los valores obtenidos de las intensidades normalizadas para cada citoquina fueron transformados a valores de Z-score, mediante el cual normalizamos los valores por condición, a valores entre un rango de 1 a -1. Las condiciones fueron analizadas de forma independiente, por un lado, M28 y WM4235, y por otro lado las líneas M28 Control y M28 CDK4 O/E. La fórmula empleada para el cálculo del Z-score por citoquina fue la siguiente

$$Z - score = \frac{(Media X en Y - Media X en todas las muestras)}{Desviación estándar X en todas las muestras}$$

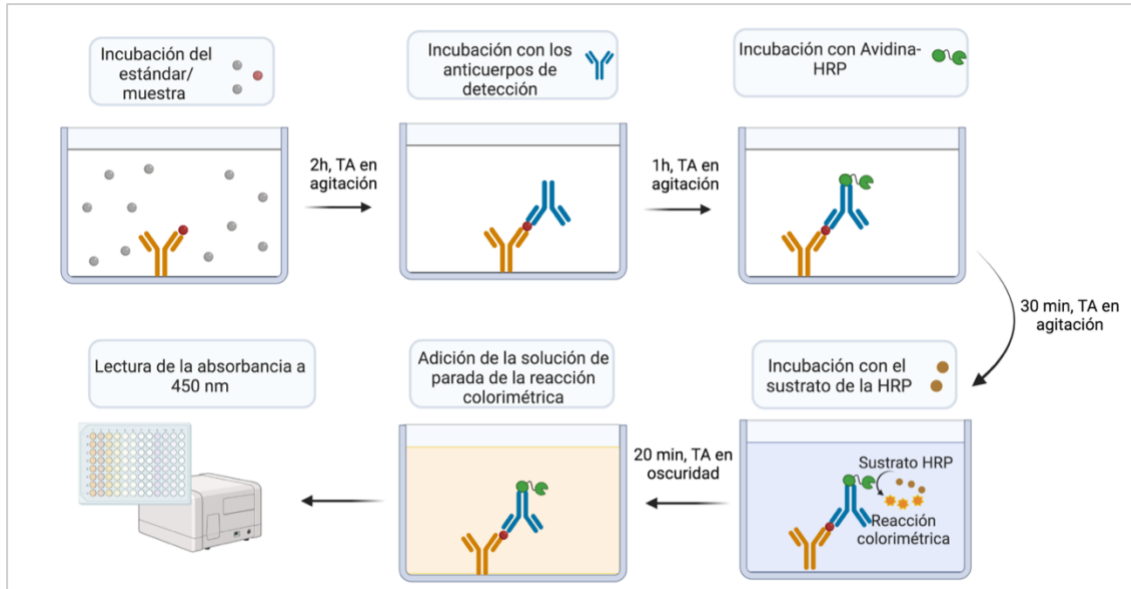
Donde X indica el valor de intensidad normalizado de una citoquina, e Y la muestra para la cual estamos calculando el Z-score.

Posteriormente, a partir del Z-score, los valores fueron representados en mapas de calor, conocidos como *Heatmaps*, realizados mediante la herramienta online Clustvis<sup>121</sup>.

### 4.3. ELISA DE DETECCIÓN DE PARC

La cuantificación de los factores solubles PARC en MCs de las líneas celulares y en plasmas de pacientes se realizó mediante varios kits de ELISA. Se utilizaron el kit PARC/CCL18 ELISA Kit (EHCCL18, Invitrogen, ThermoFisher Scientific®), cuyo procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (*Figura 38*).

En primer lugar, preparamos la **recta patrón** diluyendo la solución estándar de cada citoquina en su buffer correspondiente, siendo la máxima concentración a detectar de 250 pg/mL y la mínima de 3.9 pg/mL. A continuación, se añade a cada pocillo 50 µL de la recta patrón o de la muestra en estudio y se incuba durante 2 horas en agitación a 200 rpm. Posteriormente, descartamos el contenido de la placa y realizamos varios lavados con el buffer de lavado del kit. Tras los lavados, se añaden los **anticuerpos conjugados con Biotina** pertinente en cada caso e incubamos durante una hora, a temperatura ambiente y en agitación. Pasado este tiempo, se llevan a cabo varios lavados con el buffer del kit, y se añade la solución de **Estreptavidina conjugada a HRP**, la cual se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Volvemos a lavar con el buffer del kit, en esta ocasión se realizan lavados de entre 30-60 segundos para reducir el background de la señal. Tras estos últimos lavados, incubamos con 100 µL del **sustrato de la HRP** para obtener la señal e incubamos durante 20 minutos en oscuridad. En este paso los pocillos que contienen IL-10 deberían tornarse azules con una intensidad proporcional a su concentración. Por último, añadimos la **solución de parada** a cada pocillo, mediante la cual debe cambiar el color del pocillo de azul a amarillo. Finalmente, se procede a la lectura de la absorbancia mediante espectrofotómetro (Biotek). El análisis de esta técnica se realizó mediante la creación de una curva con los valores de la recta patrón que permitió extrapolar los valores de nuestras muestras de interés a dicha curva, obteniendo de esta forma la concentración de la citoquina en estudio en cada muestra.



**Figura 38. Esquema del flujo de trabajo seguido para la realización de la técnica ELISA.** El esquema representa los pasos seguidos para la detección y cuantificación de PARC mediante ELISA. TA: temperatura ambiente. (Creado con BioRender.com).

## 5. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

### 5.1. PROCEDIMIENTO

La presencia de marcadores relevantes en las biopsias incluidas en parafina de los pacientes de MLA, se analizó a través de tinción inmunohistoquímica, realizadas en el servicio de Inmunohistoquímica del IRBLLeida. El análisis inmunohistoquímico permite la detección principal de proteínas en las biopsias mediante el uso de anticuerpos específicos que las detectan.

La metodología empleada parte de la realización de cortes de 3  $\mu\text{m}$  a los bloques de parafinas, los cuales son secados a 65°C durante una hora. Posteriormente, se realiza un pretratamiento de **desparafinación y rehidratación** del tejido en estudio. Tras este paso, se realizó la **recuperación antigénica**, cuya función es desenmascarar y exponer los antígenos enmascarados durante la preparación de la muestra. Este proceso consistió en incubar los portaobjetos en un tampón comercial que contiene Tris/EDTA 50X a pH 9, en un módulo de pretratamiento PT-LINK (Dako) a 95°C durante 20 minutos. Después, se bloqueó la peroxidasa endógena de la muestra a través de una incubación de la muestra con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, para reducir el ruido de fondo que se obtiene con los cromógenos empleados. Tras el bloqueo, las muestras se lavaron con PBS

1X en tres ocasiones y fueron incubadas con el anticuerpo primario de interés durante 30 minutos a temperatura ambiente. En el siguiente paso, los lavados con PBS 1X se repitieron, y la muestra fue incubada con el anticuerpo secundario. En el caso de que la señal sea muy fuerte, se utilizan anticuerpos secundarios conjugados con HRP durante 30 minutos a temperatura ambiente; en cambio si la señal es débil, la muestra se incuba con un anticuerpo conjugado a biotina durante 30 minutos a temperatura ambiente, seguida de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente con estreptavidina conjugada con HRP. Finalmente, se aplican los cromógenos para el revelado, y se aplica una contratinción con HE para la visualización de los núcleos de las células de la biopsia. Los cromógenos utilizados fueron diaminobenzimida (DAB, Dako-Agilent) y Magenta (Dako-Agilent). Los anticuerpos utilizados se encuentran recogidos en la *Tabla 10*.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Referencia
Anti-CDK4	Conejo	1:100	Cell Signaling #12970
Anti-EGFR	Ratón	1:100	Diagnostic Biosystems, Mob461
Anti-Ciclina D1	Conejo	1:100	Dako-Agilent, IR083
Anti-E-cadherina	Conejo	1:100	Dako-Agilent, IR059
Anti N-cadherina	Ratón	1:100	Millipore, 04-1126
Anti-ALDH1	Ratón	1:100	BD Biosciences, 611195
Anti-CD163	Ratón	1:100	Bio-Rad, MCA1853

Tabla 10. Anticuerpos primarios utilizados para el análisis inmunohistoquímico.

## 5.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LA TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA

El análisis de la tinción inmunohistoquímica fue realizado a través del software QuPath v.0.3.2<sup>122</sup>. En primer lugar, los cortes de las tinciones fueron escaneados con el escáner Panoramic 250 Flash III (3DHitech), para facilitar la visualización y poder realizar el análisis con el software. Para dicho análisis, se utilizó toda la región tumoral del corte de la biopsia.

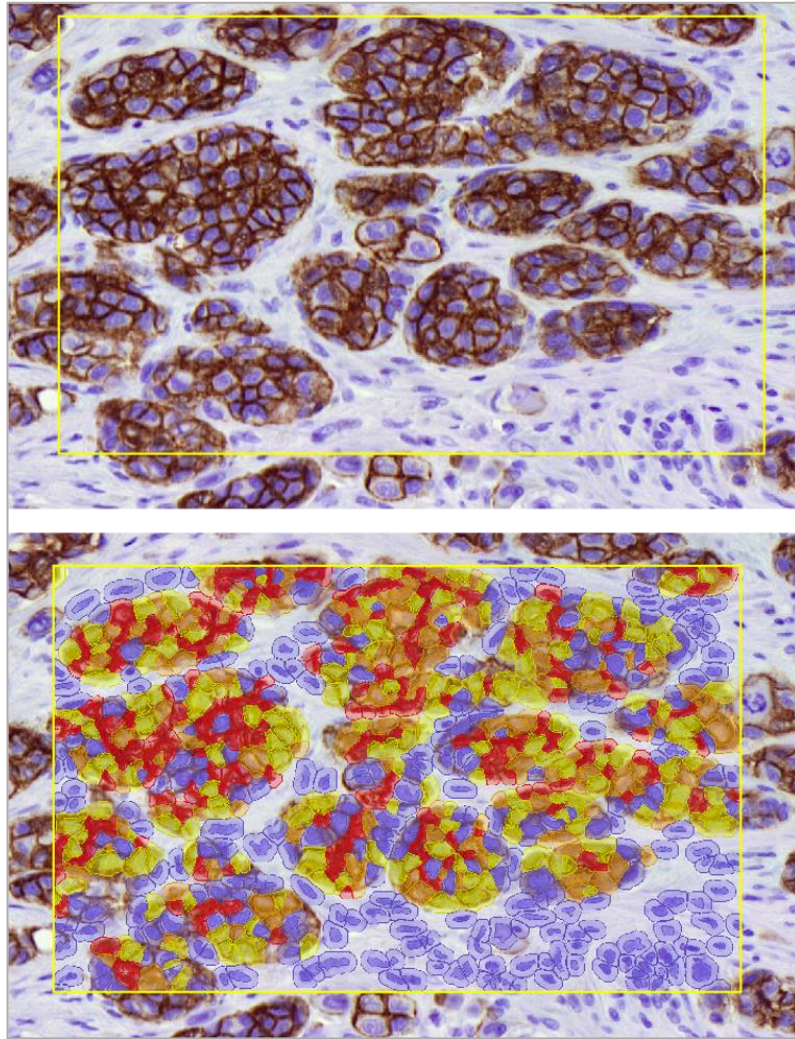
Para cada marcador estudiado, se puso a punto un script automatizado de la biopsia que dependió de la tinción de cada marcador, que incluía tanto el preprocesamiento de la imagen, como la cuantificación de los niveles de tinción.

Para la generación del script, el primer paso fue realizar un preprocesamiento de la imagen de la IHC mediante el comando *Estimate stain vectors*, tomando una pequeña parte de la región tumoral con la herramienta *Rectangle*. El programa denomina a estas segmentaciones como *Annotations*. Tras el preprocesamiento, mediante el comando *Positive Cell Detection*, desplegamos un menú, en el cual debemos especificar los parámetros para que el programa nos detecte aquellas células que expresan el marcador de interés y cuantifique los niveles de expresión. Los parámetros han de reajustarse según el marcador utilizado, y debemos indicar si la tinción es nuclear, citoplasmática o ambas, en el desplegable *Score department*. A continuación, desmarcamos la casilla *Single Threshold* para realizar un análisis a través de la puntuación *Histocore* (H-score).

El **H-score** es una puntuación que oscila entre 0 (ausencia tinción) a 300 (tinción máxima), que tiene en cuenta tanto la **intensidad de la tinción** como el porcentaje de células positivas para cada intensidad de tinción. Las intensidades se clasifican en 3 umbrales de intensidad; 1: tinción ligera; 2: tinción moderada; 3: tinción fuerte. El H-score se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$H - score = 1 \times (\% \text{ tinción ligera}) + 2 \times (\% \text{ tinción moderada}) + 3 \times (\% \text{ tinción fuerte})$$

Tras poner a punto el algoritmo *Positive Cell Detection*, lo ponemos en marcha en la anotación creada con anterioridad, y guardamos los comandos realizados hasta el momento como un *script* que aplicaremos en todas las biopsias sobre anotaciones de la región tumoral completa. Tras el análisis, el programa nos devuelve un documento con datos de cada imagen, junto con el H-score, el número de células negativas, el porcentaje de células positivas, el número de células positivas por mm<sup>2</sup>, entre otros datos. En este trabajo hemos utilizado el H-score para puntuar las tinciones inmunohistoquímicas de CDK4, EGFR, Ciclina D1, E-cadherina, N-cadherina y ALDH1 (*Figura 39*).



**Figura 39. Ejemplo representativo de la función Positive Cell Detection en QuPath.** En primer lugar, se realiza la anotación (arriba), y posteriormente se utiliza la función Positive Cell Detection (abajo) para detectar las células según el H-score en células negativas (violeta), células con tinción débil (amarillo), células con tinción media (naranja) y células con tinción fuerte (rojo).

El análisis del marcador CD163 fue algo diferente ya que se diferenciaron dos partes en la biopsia, el cuerpo del tumor y el frente invasivo, es decir la parte del tumor primario que comienza a invadir. En este caso se realizaron las anotaciones en el frente invasivo, y posteriormente a 200  $\mu\text{m}$  del frente invasivo, hacia la zona tumoral, se realizaron las anotaciones del cuerpo del tumor. Las anotaciones realizadas fueron del mismo tamaño en todas las muestras y en ambas zonas analizadas. Sobre estas anotaciones, aplicamos el comando *Positive Cell Detection*, y no desmarcamos la casilla *Single Threshold*, para que el programa nos calcule un solo umbral y no el H-score. Por último, utilizamos el número de células positivas por  $\text{mm}^2$  que nos calcula el software para los análisis.

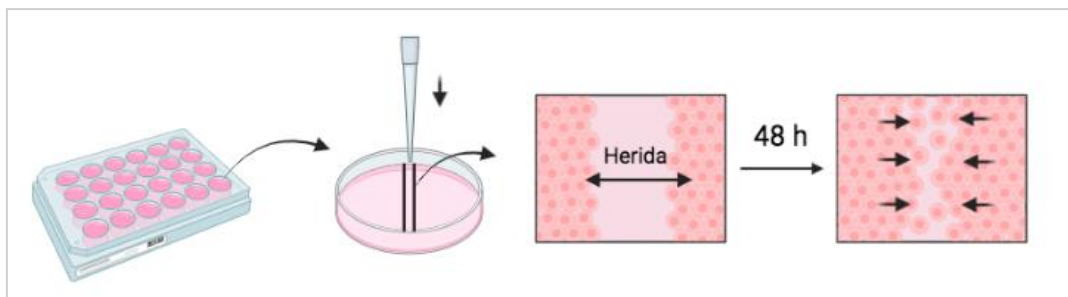
Además, el análisis del infiltrado linfocitario fue analizado mediante el mismo software, a través de la creación de un algoritmo de clasificación para distinguir células tumorales, células inmunitarias y estroma mediante el comando *Train Object Classifier* en las HE. Mediante este algoritmo, el software permitió identificar los porcentajes de cada tipo celular en las biopsias.

## 6. ENSAYOS *IN VITRO* CON LÍNEAS CELULARES DE MLA

### 6.1. ENSAYO DE MIGRACIÓN *WOUND HEALING*

El **ensayo de migración de cierre de herida** o *Wound Healing* se basa en el análisis del comportamiento migratorio de una monocapa celular a máxima confluencia, mediante la evaluación del cierre de una 'herida' que se le ha realizado previamente a dicha monocapa (Figura 40).

Las células se plantan en una M24, realizando triplicados por cada condición y plantando  $6 \times 10^4$  células por pocillo. Cuando las células se encuentran a máxima confluencia, se realiza una herida vertical en el pocillo con la parte más estrecha de una punta de 200  $\mu\text{L}$ . A continuación, los pocillos se lavan con PBS 1X para eliminar los restos celulares que se han originado tras la herida, y se añade medio DMEM completo. El día de la realización de la herida, se toma como día 0, y se toman tres fotografías por pocillo de la herida a diferentes alturas con un microscopio (Leica). La placa se incuba durante 48 horas en el incubador a  $37^\circ\text{C}$  y un 5% de  $\text{CO}_2$ , y pasado este tiempo se vuelven a repetir las fotografías de la misma forma anteriormente indicada (día 2). El análisis fue realizado con el programa *Image J*, mediante el cual calculamos la distancia horizontal existente de un extremo a otro de la herida a día 2, respecto de la distancia existente el día 0. A partir de estos valores, calculamos el porcentaje de cierre de herida tras 48 horas de incubación.

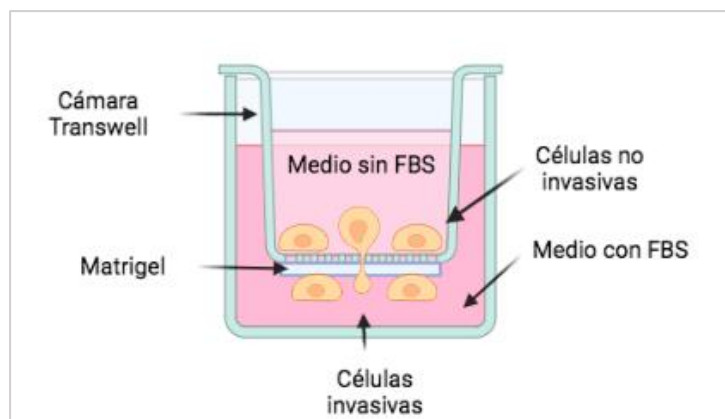


**Figura 40. Esquema representativo del fundamento de la técnica de Wound Healing.** El esquema representa el procedimiento mediante el cual se realiza una herida en la monocapa de células con una punta de pipeta, y como transcurridas 48 horas las células migrarían para cerrar la herida. (Creado con BioRender.com)

## 6.2. ENSAYO DE INVASIÓN DE TRANSWELL

La **capacidad invasiva** de las células fue evaluada mediante un ensayo de transwell realizado en placas de M24 colocando una cámara de transwell (poro 8  $\mu\text{m}$ ; Falcon, ThermoFisher Scientific®) en cada pocillo, cuya membrana fue cubierta previamente con una capa de Matrigel® (Corning®, Sigma-Aldrich®) disuelta en DMEM (1:3) sin FBS. De esta forma, se genera un sistema bicameral que permite evaluar la invasión de las células de una cámara a otra a través de la membrana cubierta de Matrigel (Figura 41).

Las células son plantadas a razón de  $1 \times 10^4$  células/pocillo en la cámara superior del sistema, resuspendidas en 500  $\mu\text{L}$  de medio DMEM sin FBS. En la parte inferior, se añade medio DMEM con un 10% de FBS, el cual fue utilizado como quimioatrayente de las células plantadas en la parte superior. Tras incubar durante 24 horas a 37°C y un 5% de  $\text{CO}_2$ , las células son fijadas en ambos lados de la cámara con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se realizan varios lavados con PBS 1X, y a continuación los núcleos celulares son teñidos con Hoechst (Sigma-Aldrich®) a 5 mg/mL durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, se toman fotografías en un microscopio de epifluorescencia (Leica), antes y después de frotar el interior del inserto con un algodón para eliminar aquellas células que no han invadido. Los resultados son analizados con el software *Image J*, mediante el conteaje de los núcleos con la función *Find Maxima* antes y después del paso del algodón, y a partir de estos datos se calcula el porcentaje de células invasivas.



**Figura 41. Esquema del sistema de doble cámara utilizado para el ensayo de invasión de Transwell.** El sistema de doble cámara está compuesto por una cámara de Transwell con una membrana recubierta con Matrigel, que se inserta en un pocillo mediante el cual se evalúa la capacidad invasiva de las células en estudio. (Creado con BioRender.com)



### 6.3. ENSAYO DE INCORPORACIÓN DE BROMODESOXIURIDINA

La **5-bromodesoxiuridina o BrdU** es un nucleótido modificado análogo a la timidina el cual se utiliza para realizar un seguimiento de la proliferación celular. La síntesis de ADN es requerida para la proliferación celular, por lo que una forma de evaluar esta proliferación sería mediante el análisis de la incorporación del nucleótido BrdU en las cadenas de ADN recién sintetizadas de las células en proliferación.

Para realizar este ensayo, se plantan 2000 células/pocillo en una placa M96, las cuales son incubadas con 3 ng/mL de BrdU (Sigma-Aldrich®) durante 1 hora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Tras este periodo, las células se fijan con PFA al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se procede a desnaturalizar el ADN mediante la incubación con HCl 2M durante 30 minutos a 37°C. Tras la desnaturalización, el HCl es neutralizado con tetraborato de sodio (0.1 M) durante 2 minutos. Las células se lavan dos veces con PBS 1X, y se incuban con solución de bloqueo, compuesta por 5% HS, 5% FBS, 0.2% glicina y 0.1% Triton X-100 en PBS, durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, las células son incubadas con un anticuerpo primario anti-BrdU (Dako-Agilent) diluido en solución de bloqueo (1:100) durante 16 horas a 4°C y en agitación. Posteriormente, los restos del anticuerpo primario son eliminados con 3 lavados con PBS 1X, y las células se incuban con un anticuerpo secundario Anti-IgG Alexa Fluor 594(1:250) y Hoechst (1:100) durante 1 hora a temperatura ambiente, en oscuridad y agitación. Finalmente, se realizan 3 lavados con PBS 1X durante 10 minutos, y se toman fotografías con el microscopio de epifluorescencia. El análisis se realiza con el software *Image J* mediante el conteo de células BrdU-positivas (núcleos marcados de rojo).

### 6.4. ENSAYO DE DUPLICACIÓN DE LA POBLACIÓN CELULAR

El **ensayo de duplicación de la población celular acumulada** permite evaluar el número total de veces en el que las células han duplicado su población desde el día que fueron plantadas.

Para la ejecución de este ensayo, las células se plantaron a razón de 2000 células/pocillo en una placa M6 y se dejaron crecer durante 10 días. Estas células fueron contadas cada día desde el día siguiente de ser plantadas (Día 1) hasta el fin del experimento. El cálculo de la acumulación de la población celular que se ha duplicado se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Población celular duplicada} = (\log_2(n + 1) - \log_2(n))$$

Siendo  $n$  el día previo de conteo, y  $n+1$  el día siguiente, es decir  $n$ = día 1 y  $n+1$ = día 2 de conteo, y así consecutivamente hasta el fin del experimento. La población celular duplicada acumulada se calcula sumando todos los valores obtenidos de aplicar la anterior fórmula.

### 6.5. ENSAYO CLONOGÉNICO

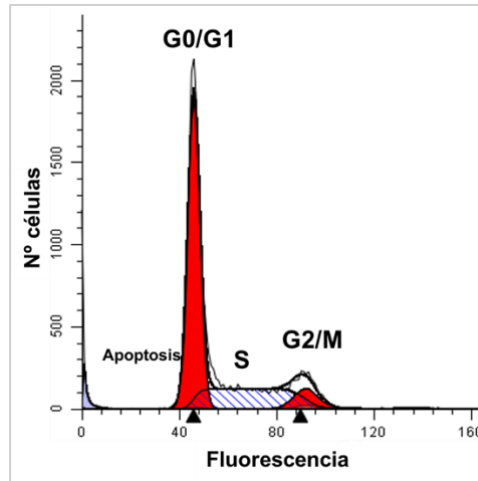
El **ensayo clonogénico** está basado en la capacidad que posee una única célula de formar clones. En este ensayo, se planta una densidad celular de 2000 células/pocillo en una M6, y las células se dejan crecer durante 12 días. Transcurrido este tiempo, se añaden 200  $\mu$ L de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por pocillo, y se deja incubar durante 30-45 minutos a 37°C. A continuación, aspiramos los restos del pocillo, se añaden 1.5 mL de formol y se dejan las placas sin tapar durante 5 minutos a temperatura ambiente. El formol se aspira, y se añaden 2 mL de PBS 1X por pocillo. Finalmente, se realizan fotografías de las condiciones realizadas, y se cuentan las colonias formadas, que ahora estarán teñidas por el MTT.

### 6.6. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR

El **análisis del ciclo celular** se realizó con el fin de determinar el porcentaje de células que se encontraban en cada fase del ciclo mediante la tinción de las células con **yoduro de propidio** y su posterior análisis a través de citometría de flujo. El yoduro de propidio se intercala en el ADN, de forma que según aumenta el contenido de ADN, también aumenta la emisión de fluorescencia de éste. Por lo tanto, las células que se encuentran en fase apoptótica (sub-G1) presentan el ADN fragmentado ( $<2n$ ), y emiten una **fluorescencia baja**; sin embargo, las células que se encuentran en fase G0/G1 aún no han duplicado su material genético ( $2n$ ) y emiten la **mitad de fluorescencia** que las células que se encuentran en fase G2/M, que ya lo han duplicado ( $>2n$ ) y serán las que **más fluorescencia** emitan. En cuanto a las células que se encuentran en fase S, emitirán una fluorescencia intermedia (entre G0/G1 y G2/M), ya que se encuentran en proceso de duplicación del material genético, es decir, unas lo habrán duplicado y otras no, por este motivo presentarán una **fluorescencia intermedia** (Figura 42).

Este ensayo se realiza con  $1 \times 10^6$  células de cada condición, las cuales son fijadas con 1 mL de etanol al 70% frío (-20°C), que se añade a las células en agitación para evitar la formación de agregados. Las células han de ser incubadas con el etanol durante al menos 30 minutos a -20°C. Tras pasar este tiempo, las células son centrifugadas durante 3 minutos a 1000 rpm y se realizan dos lavados con PBS 1X. Tras los lavados, las células se resuspenden en 0.5 mL de solución de yoduro de propidio compuesta por 0.2 mg/mL de yoduro de propidio, 1% de Tritón X-100, 10

mg/mL de ARNasa A (Sigma-Aldrich®) en PBS 1X, y son incubadas durante 15-30 minutos en agitación a 37°C. Finalmente, las muestras son analizadas mediante el citómetro *BD FACSCanto™ II* (Bioscience) a través de la emisión de fluorescencia del ioduro de propidio (562-588 nm) intercalado en el ADN de las células. De esta forma, podemos analizar la distribución del ciclo celular mediante el software *ModFit LT™* (Verity Software House).



**Figura 42.** Distribución de las fases del ciclo celular obtenida tras el análisis del mismo mediante citometría de flujo. En la gráfica se representa un ejemplo interpretativo de los picos obtenidos en el análisis, indicando a qué fase corresponde cada uno de ellos.

## 7. AISLAMIENTO, ESTIMULACIÓN Y FENOTIPAJE DE MONOCITOS HUMANOS

### 7.1. AISLAMIENTO DE MONOCITOS DE SANGRE DE DONANTES SANOS

El **aislamiento de monocitos** humanos se realizó a partir de sangre completa extraída de donantes sanos (*Figura 43*).

En primer lugar, se transfiere la sangre (~20 mL) a un tubo de centrifuga de 50 mL, y se le añade 300 µL del cóctel de depleción de células CD3+, *RosetteSep Human CD3 depletion cocktail* (StemCell Technologies), mezclando ambas partes e incubando durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añaden 5 mL de PBS 1X con un 2% de FBS hasta alcanzar un volumen total de 25 mL. Seguidamente, preparamos un tubo de centrifuga de 50 mL con 20 mL de Ficol (Sigma-Aldrich®) por cada donante, al que le añadimos los 25 mL de suspensión celular lentamente y con el tubo con una inclinación de 45°, preservando de esta forma la interfase entre el Ficol y la suspensión celular. A continuación, se centrifugan los tubos durante 20 minutos a 400 g con una aceleración rápida de 9, y una deceleración lenta de 3, a temperatura ambiente.

Tras la centrifugación, recuperamos el anillo de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) que se encuentra en la interfase entre la fase de plasma y la fase de Ficol con una pipeta Pasteur de plástico (Biosigma), con especial cuidado de no aspirar la parte de debajo del anillo. Posteriormente, añadimos los PBMCs aspirados a un nuevo tubo de 50 mL, y sobre estos 10 mL de PBS al 0.5% de FBS. Seguidamente, centrifugamos las PBMCs durante 5 minutos a 200 g (aceleración/deceleración al máximo), para precipitar los monocitos, y que las plaquetas queden en el sobrenadante. Eliminamos el sobrenadante, y lavamos el pellet con 20 mL de PBS al 0.5% de FBS hasta que quede limpio. Tras cada lavado centrifugamos durante 5 minutos a 400 g, y finalmente resuspendemos el pellet en 5 mL de PBS.

A partir de estos 5 mL, tomamos 25  $\mu\text{L}$ , los cuales son mezclados con 25  $\mu\text{L}$  de *Perfect-count microspheres* (Cytognos, CYT-PCM-50) y con 5  $\mu\text{L}$  de anticuerpo anti-CD14 FITC (BS, 555397) para contabilizar el número de células CD14+. Esta mezcla es fijada con 150  $\mu\text{L}$  de PBS al 1% de PFA, y las células son contadas al citómetro *BD FACSCanto™*. El cálculo de las células/ $\mu\text{L}$  se realiza a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Células}/\mu\text{L} = \frac{\text{Células totales}}{\text{Beads}} \times n^{\circ} \text{ beads del lote} \times \text{Volumen tubo inicial}$$

A continuación, se calcula el nº de células que son necesarias para realizar el experimento teniendo en cuenta que se necesitan  $5 \times 10^5$  células/pocillo en una placa M24 (250  $\mu\text{L}$ /pocillo), y, por tanto, un total de  $2 \times 10^6$  células/mL. Se resuspende el volumen necesario en medio RPMI con un 10% de suero humano AB (hAB, Sigma-Aldrich®) y un 1% de p/s, el cual ha sido previamente filtrado con un filtro de 22  $\mu\text{m}$ . Finalmente, plantamos las células en una placa M24, a razón de 250  $\mu\text{L}$ /pocillo, que se incuba a 37°C al 5% de  $\text{CO}_2$  durante 1 hora, hasta que los monocitos se hayan adherido a la placa. Transcurrido este tiempo, se retira el medio y es reemplazado con RPMI con un 10% de FBS y un 1% de p/s, e incubamos a 37°C durante 24 horas antes de realizar los experimentos.

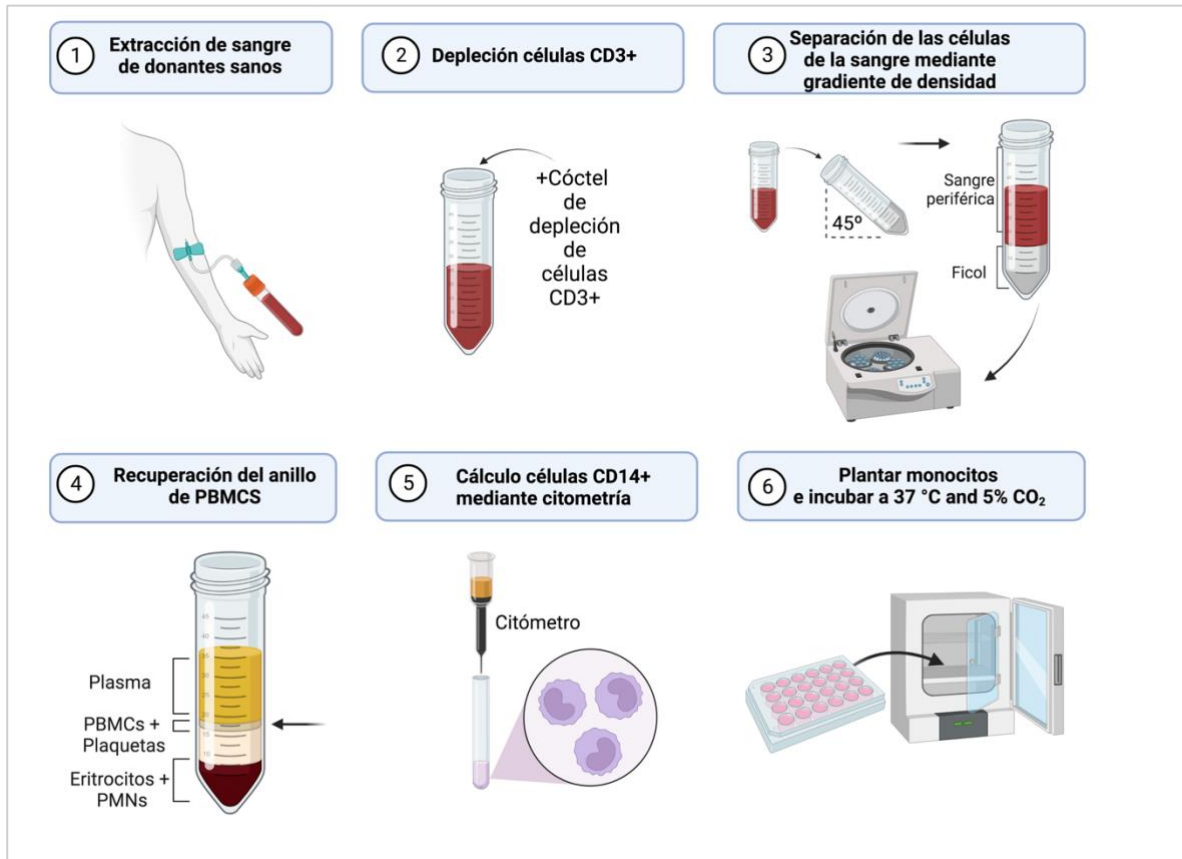


Figura 43. Flujo de trabajo de los principales pasos del aislamiento de monocitos a partir de sangre de donantes sanos. (Creado con BioRender.com).

## 7.2. ESTIMULACIÓN *IN VITRO* DE MACRÓFAGOS UTILIZANDO MCS DE LÍNEAS CELULARES DE MLA

### Obtención de MCs a partir de las líneas celulares de MLA

Para la ejecución del ensayo de polarización de macrófagos *in vitro*, las células de MLA se plantan en una P100 a un 70% de confluencia en medio RPMI con un 10% de FBS y un 1% de p/s, y se mantienen a 37°C a un 5% de CO<sub>2</sub>. Cuando las células alcanzan un 90% de confluencia, se les cambia el medio por RPMI con un 2% de FBS y un 1% de p/s, se incuban con este medio durante 24 horas. Trascendido este tiempo, el medio es centrifugado en tubos de microcentrífuga de 2 mL libres de endotoxinas durante 5 minutos a 14.000 rpm a 4°C de temperatura, para eliminar los restos celulares. Una vez centrifugado, el medio se traspa a un nuevo tubo libre de endotoxinas, y puede ser almacenado a -80°C hasta su uso.

Estimulación *in vitro* de macrófagos con MCs de líneas celulares de MLA

Los monocitos son estimulados con los MCs de las líneas celulares 24 horas después de su aislamiento. El MC de cada línea es añadido a los monocitos, sin aspirar el medio del día anterior, añadiendo 250  $\mu$ L/pocillo de MC en el mismo volumen de medio de cultivo, por lo que el MC quedaría a una dilución 1:2. De esta forma, evitamos que las células se despeguen de la placa de cultivo. Paralelamente, se realizan diferentes estímulos como control positivo del ensayo, diluidos de la misma forma que el MC (1:2), con el medio de cultivo preexistente en el pocillo. Los estímulos utilizados se encuentran recogidos en la *Tabla 11*:

Estímulo	Stock	Dilución	Concentración final	Referencia
IFN- $\gamma$	100 $\mu$ g/mL	1:1000	100 ng/mL	Immunotools, 11343536
LPS	1 $\mu$ g/ $\mu$ L	1:500	200 ng/mL	Invivogen, TLRPS
IL-4	100 $\mu$ g/mL	1:1250	80 ng/mL	Immunotools, 11340043
M-CSF	400 $\mu$ g/mL	1:1000	400 ng/mL	Immunotools, 11343113

**Tabla 11. Estímulos utilizados como control positivo para la polarización de los macrófagos *in vitro*.** En la Tabla se detallan las referencias, el stock, la dilución y la concentración final de los estímulos utilizados.

Además de las condiciones con los MCs, y los controles positivos, se utiliza un pocillo como control negativo, el cual solo contiene RPMI. Finalmente, la placa con los diferentes estímulos es incubada durante 72 horas a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub>.

Tinción y fenotipaje mediante citometría de flujo

La tinción de los marcadores de superficie de los macrófagos es llevada a cabo trascurridas 72 horas de estimulación, tras las que, el sobrenadante de cada pocillo es recogido en tubos de centrífuga de 15 mL (Clearline®, Biosigma) para recoger las células que no se han adherido o se han despegado. A continuación, las células son lavadas con PBS 1X, el cual también es recogido en el mismo tubo. Una vez lavadas, las células son incubadas con 500  $\mu$ L/pocillo de Accutasa (Corning®, Sigma-Aldrich®) durante 20 minutos a 37°C. A continuación, se añaden 500  $\mu$ L/pocillo de PBS sobre la Accutasa, pipeteando en repetidas ocasiones para recoger todas las células del

pocillo. Esta suspensión celular se añade al tubo correspondiente al que hemos añadido previamente el sobrenadante y el PBS. Posteriormente, centrifugamos los tubos durante 5 minutos a 2000 rpm, y descartamos el sobrenadante.

El pellet es lavado en PBS 1X, y es centrifugado de la misma forma, volviendo a descartar el sobrenadante. Seguidamente, resuspendemos el pellet en 50  $\mu\text{L}$  de Blocking Buffer, compuesto por un 10% de suero hAB, un 2% de FBS y un 0.02% de azida sódica en PBS 1X, e incubamos durante 30 minutos a 4°C. Paralelamente a la incubación, preparamos la mix de anticuerpos para la tinción de las células en Blocking Buffer. Los anticuerpos utilizados se recogen en la *Tabla 12*:

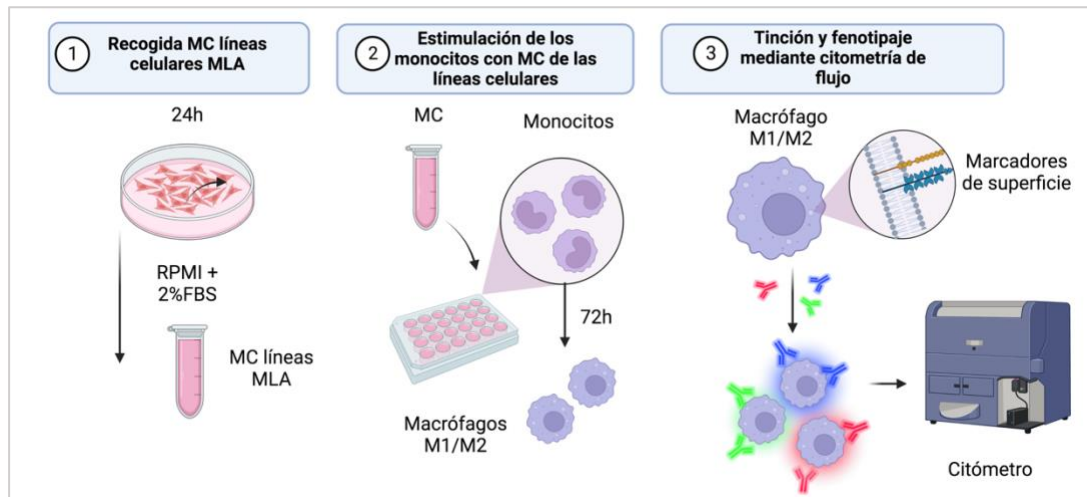
Anticuerpo	Fluorocromo	Volumen/muestra	Referencia
CD80	APC	2.5 $\mu\text{L}$	eBioscience™, Invitrogen™, 17-0809-42
HLA-DR	FITC	2.5 $\mu\text{L}$	eBioscience™, Invitrogen™, 11-9956-42
CD206	eFluor™	2.5 $\mu\text{L}$	eBioscience™, Invitrogen™, 48-2069-42
CD163	PE	2.5 $\mu\text{L}$	eBioscience™, Invitrogen™, 12-1639-42

**Tabla 12.** Anticuerpos utilizados para el análisis del fenotipo de los macrófagos mediante citometría de flujo.

Añadimos 2.5  $\mu\text{L}$  de cada anticuerpo diluido en volumen final de 100  $\mu\text{L}$  por cada muestra, y, a continuación, se incuba dicha mezcla con las muestras durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. Trascurrido este tiempo, las muestras son centrifugadas durante 5 minutos a 2000 rpm a temperatura ambiente, y posteriormente, lavamos el pellet con Washing Buffer, compuesto por un 2% de FBS y un 0.02% azida sódica en PBS. Tras el lavado, se centrifuga de nuevo y se elimina el sobrenadante. Finalmente, las muestras son fijadas en paraformaldehído al 1%, y se mantienen en oscuridad hasta el momento de ser analizadas mediante citometría de flujo.

A partir del análisis de los resultados de citometría obtuvimos los valores de **intensidad** de las células para cada marcador, así como los **porcentajes de células positivas** para estos mismos marcadores.

El flujo de trabajo explicado en este apartado se recoge en la *Figura 44*.



**Figura 44. Flujo de trabajo de la estimulación de los monocitos con MCs de líneas de MLA y fenotipaje mediante citometría de flujo.** El esquema del flujo de trabajo representa la obtención de MCs de las líneas de MLA, la estimulación de los monocitos con estos MCs, tinción de marcadores de superficie y posterior fenotipaje mediante citometría de flujo. (Creado con BioRender.com).

## 8. AISLAMIENTO Y ESTIMULACIÓN DE CÉLULAS ESTROMALES DE RATÓN

### 8.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

Los modelos murinos utilizados en este apartado estuvieron alojados en instalaciones convencionales, y fueron sometidos a procedimientos libres de patógenos. Los animales se han mantenido a una temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  con una humedad relativa del  $50 \pm 5\%$ , con ciclos de 12 horas de luz/oscuridad, teniendo un acceso *ad libitum* a agua y comida.

El experimento realizado en este apartado con ratones ha sido regido por las siguientes legislaciones:

- En el marco legislativo europeo, la Directiva 63/2010/UE, que deroga a la Directiva 86/609/CEE, de 22 de septiembre del Consejo de Europa sobre la protección de los vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos.
- Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia, completada con la modificación de la Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio, mediante la Ley 6/2013, de 11 de junio.



- Real Decreto 1386/2018, de 19 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.
- Ley 5/1995, de 21 de junio, de la Generalitat de Cataluña sobre Protección de los Animales utilizados para experimentación y otras finalidades científicas.
- Decreto 214/1997, de 30 de julio, de la Generalitat de Cataluña por el que se regula la utilización de animales para experimentación y para otras finalidades científicas.
- Decreto 286/1997, de 31 de octubre, de la Generalitat de Cataluña de modificación del Decreto 214/1997, de 30 de julio, por el que se regula la utilización de animales para experimentación y para otras finalidades científicas
- Decreto 164/98, de 8 de julio, de la Generalitat de Cataluña que modifica el Decreto de 30 de julio de 1997.

Los procedimientos realizados fueron supervisados por el personal del centro, respetando las directrices legales y éticas dispuestas en la legislación vigente.

## 8.2. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE FIBROBLASTOS DE RATÓN

El **aislamiento de células estromales** es realizado a partir de ratones silvestres (WT), que fueron sacrificados mediante dislocación cervical y a los cuales se les escindieron las orejas (*Figura 45*). Las orejas se fragmentaron en varios trozos para facilitar la digestión con un 1% de tripsina (GIBCO™, ThermoFisher Scientific®) en *Hank's balanced salt solution* (HBSS; ThermoFisher Scientific®) durante 1 hora a 4°C en agitación y, seguidamente, durante 45 minutos a temperatura ambiente, nuevamente en agitación. Posteriormente, la tripsina se inactivó con DMEM con un 10% de FBS. A continuación, con un bisturí se arrastra cuidadosamente la capa epitelial de las orejas en una placa de Petri, para quedarnos únicamente con la parte estromal. Tras este paso, los trozos se lavan con PBS 1X y se centrifugan durante 3 minutos a 1000 rpm, para seguidamente ser incubados con una solución al 1% de colagenasa IA (200 mg/mL; Worthington Biochemical Corporation) en DMEM con FBS al 10% durante 2 horas a 37°C a 700 rpm de agitación. El paso siguiente consiste en filtrar la solución anterior con los restos de orejas a través de un Sterile Cell Strainer de 40 µm (Fisherbrand™, Fisher scientific).

Las células aisladas se plantaron en una placa P100 con medio DMEM completo. Tras 24 horas, estas células se lavaron con PBS 1X y se les volvió a añadir medio de cultivo para mantenerlas en el incubador a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>.

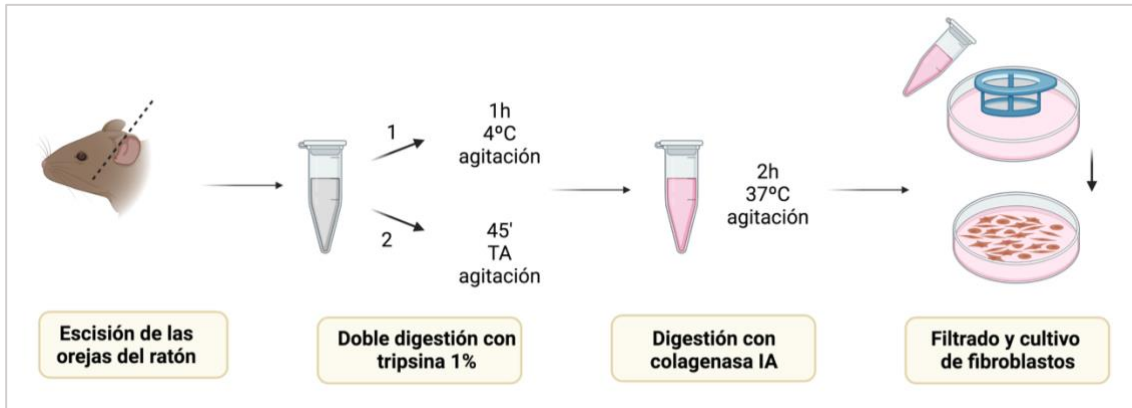


Figura 45. Esquema del flujo de trabajo para el aislamiento de células estromales de ratón. (Creada con BioRender.com).

### 8.3. ESTIMULACIÓN DE LOS FIBROBLASTOS DE RATÓN CON MCs DE LÍNEAS CELULARES DE MLA

La **evaluación de la activación** de los fibroblastos de ratón a CAFs por parte del secretoma de las líneas de MLA, fue realizado a través del tratamiento de dichas células estromales con MCs de las líneas celulares de MLA.

#### Obtención de MCs de las líneas celulares de MLA

Los MCs de las líneas celulares de MLA para este ensayo se obtuvieron tras plantar las células al 70% de confluencia con DMEM completo. Al día siguiente, este medio es cambiado por DMEM completo fresco y recogido a las 48 horas de estar en contacto con las células. Transcurrido este tiempo, el medio se centrifuga durante 3 minutos a 1000 rpm, y pueden ser guardados a -80°C hasta su uso.

#### Estimulación de los fibroblastos de ratón con los MCs de las líneas celulares de MLA

Los fibroblastos extraídos en el punto 8.2 se plantan a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/pocillo en una placa de M6 con DMEM completo. Al día siguiente, los medios de cultivo son repuestos por los MCs de las líneas celulares, exceptuando el medio del pocillo de la condición control. Las

células son incubadas durante 48 horas a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Trascurrido este tiempo, evaluamos la posible activación de los fibroblastos mediante RT-qPCR (apartado 3.2.2), previa extracción de ARN (apartado 3.2.1).

## 9. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y ESTADÍSTICO

---

### 9.1. ANÁLISIS DE ENRIQUECIMIENTO DE CONJUNTOS DE GENES (GSEA)

El análisis de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA, del inglés, Gene Set Enrichment Analysis) es una herramienta que implementa un método computacional para determinar si un conjunto de genes predefinido presenta diferencias significativas entre dos conjuntos de datos<sup>123,124</sup>.

En el presente trabajo, realizamos el GSEA a partir de los valores de secreción de las líneas celulares de MLA que se obtuvieron a partir del array de citoquinas. Los valores se agruparon en las condiciones establecidas, por un lado, M28 vs WM4235 y, por otro lado, M28 Control vs M28 CDK4 O/E, y se compararon con los conjuntos de genes predefinidos dentro de la categoría de ontología de genes de procesos biológicos (GO Biological Process Ontology; GO\_BP). A partir de esta comparativa se obtuvo una clasificación de aquellos conjuntos de genes en los que existían diferencias significativas al comparar los valores de secreción de las condiciones anteriormente mencionadas.

### 9.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico y la representación gráfica de los resultados fue realizado mediante los softwares Graphpad Prism 9 y SPSS. En todos los análisis estadísticos del presente estudio se fijó un nivel de significancia estadística de  $p=0.05$ ; y se realizaron al menos 3 réplicas independientes de cada experimento. Los valores de 'p' se indican en las figuras mediante asteriscos que se corresponden con: \* $p$ -valor $<0.05$ ; \*\* $p$ -valor $<0.01$  y \*\*\* $p$ -valor $<0.001$ .

El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher para las variables de 2x2 categorías, y Chi-cuadrado de Pearson para el resto, cuya representación gráfica se realizó a través de gráficos de barras agrupadas de las frecuencias absolutas de cada variable. En cuanto a la supervivencia específica de MLA y de la

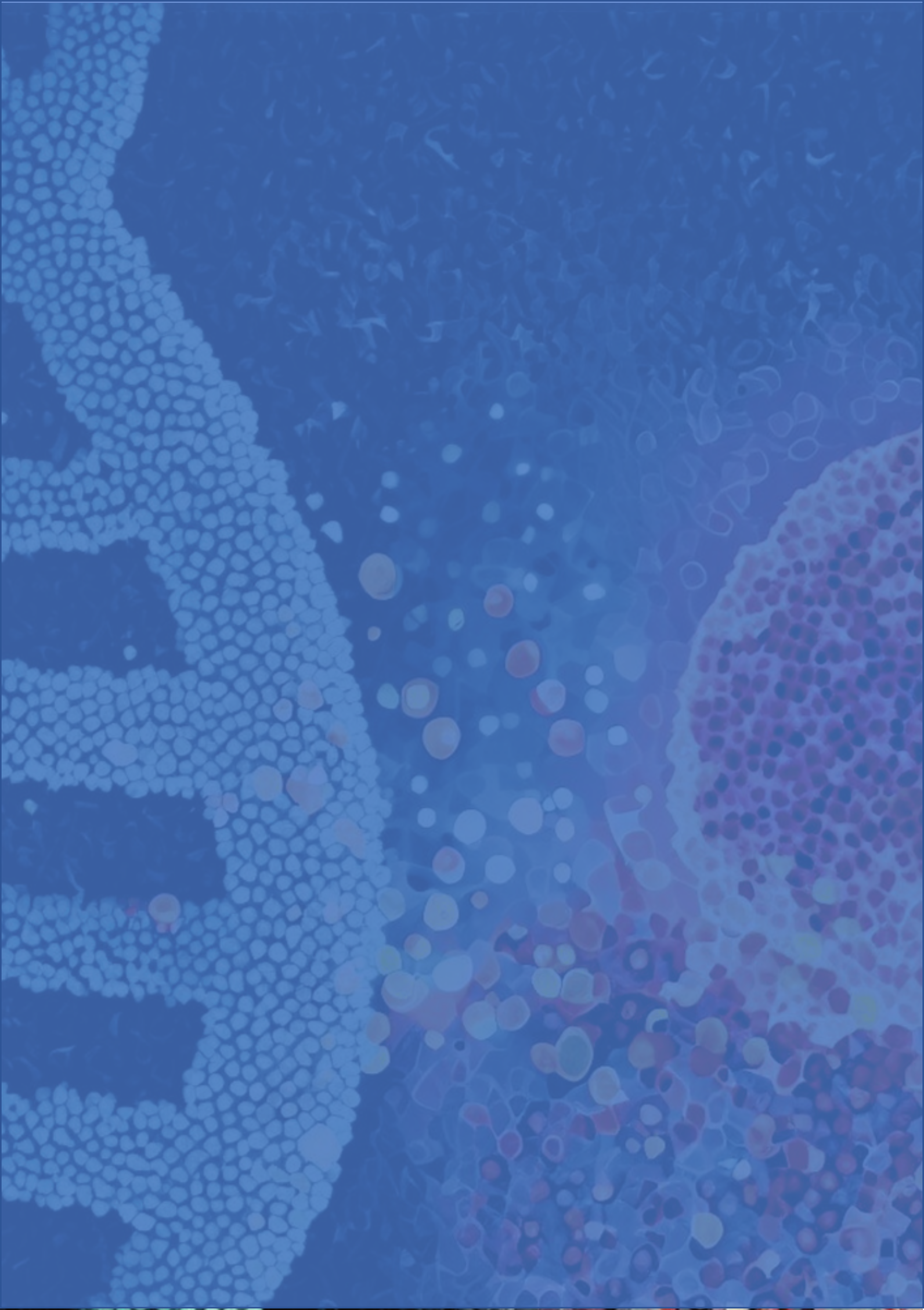
supervivencia libre de enfermedad, los resultados fueron representadas mediante el modelo Kaplan-Meier y analizado mediante Log-Rank test (Prueba de Mantel-Cox).

Por otro lado, el análisis estadístico paramétrico de las medias de grupos independientes fue realizado mediante T-test no pareado (2 variables) o mediante la prueba One-way ANOVA (más de 2 variables) y las comparaciones múltiples mediante el test de Tukey. En los gráficos se representaron las medias  $\pm$  la desviación estándar (DS) a través de histogramas. En cuanto a las medias de 2 grupos relacionados o dependientes, su análisis paramétrico se realizó mediante T-test pareado.

Para evaluar el efecto principal de cada variable independiente sobre una variable dependiente continua, así como la interacción entre ellas se utilizó la prueba Two-Way ANOVA, seguido de una corrección con una prueba post-hoc Bonferroni. El análisis de correlación fue realizado mediante un test de correlación de Pearson con un intervalo de confianza del 95%.

Los valores de H-score fueron representados mediante diagrama de cajas y bigotes con la mediana, el valor mínimo y máximo.





---

# RESULTADOS

---





# **PRIMERA PARTE**

---

**ESTUDIO DEL PERFIL GENÉTICO,  
MICROAMBIENTE TUMORAL Y  
SECRETOMA DEL MELANOMA  
LENTIGINOSO ACRAL**



## 1. ESTUDIO DEL PERFIL GENÉTICO DEL MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL

---

### 1.1. ESTUDIO DEL PERFIL GENÉTICO EN UNA COHORTE DE PACIENTES DE MLA

#### 1.1.1. Descripción clinicopatológica de la cohorte

El presente estudio se realizó a partir de 33 biopsias de tumores primarios procedentes de una cohorte de 33 pacientes de MLA diagnosticados y seguidos por el Servicio de Dermatología del HUAV durante el periodo 2008-2021 (*Tabla 13*). Dicha cohorte se compuso de un 45.5% (15/33) de hombres y un 54.5% de mujeres (18/33), con una mediana de edad de 75 (IQR: 54-83) años teniendo en cuenta a ambos sexos.

El 75.8% (25/33) de los tumores fueron diagnosticados en el pie, de los cuales el 24.2% (8/33) tuvieron localización subungueal, el 33.3% (11/33) en el talón, el 9.1% en el dedo y el 6.1% en la zona lateral (2/33). Por otro lado, un 24.2% (8/33) de los tumores fueron diagnosticados en la mano, de los cuales el 18.2% (6/33) fueron subungueales y el 6.1% (2/33) localizados en el dedo. La media del índice de Breslow de nuestra cohorte fue de 4.2 ( $\pm 3,9$ ) mm y la mediana de 2.7 (IQR: 0.89-7.9) mm; la ulceración estuvo presente en 60.6% de los pacientes y el índice mitótico fue igual o superior de 1 mitosis/mm<sup>2</sup> en el 63.6% (21/33) de los melanomas diagnosticados.

En cuanto a la clasificación por estadios de la 7ª edición de la AJCC, un 15.2% (5/33) de los pacientes presentó estadio 0, un 12.1% (4/33) estadio IA y un 9.1% (3/33) estadio IB. En cuanto al estadio II, un 9.1% (3/33) fue diagnosticado en estadio IIA, un 9.1% (3/33) en IIB y un 27.2% (9/33) en estadio IIC. Por otro lado, un 3% (1/33) presentó estadio IIIB, un 6.1% (2/33) estadio IIID, y por último un 9.1% (3/33) presentaron estadio IV.

En lo que se refiere a la supervivencia, un 48.4% (16/33) de los pacientes resultaron vivos y un 39.4% (13/33) fallecieron específicamente por MLA durante el periodo de estudio, siendo la supervivencia media de 42.8 ( $\pm 35.1$ ) meses y la mediana de 39 (IQR: 19.9-61.3) meses. Las recaídas en nuestra cohorte fueron de un 36.3% (12/33) durante el periodo de estudio, excluyendo de este porcentaje a los pacientes que fueron diagnosticados de metástasis a distancia en el momento del diagnóstico, resultando la supervivencia libre de enfermedad media de 40.9 ( $\pm 36.1$ ) meses y la mediana de 37 (IQR: 12.3-49.6).

CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS (n=33)		
<b>Sexo n (%)</b>		
	<b>Hombre</b>	15 (45,5)
	<b>Mujer</b>	18 (54,5)
<b>Edad (años)</b>		
	<b>Media (±DS)</b>	70,2 (±15,9)
	<b>Mediana (IQR)</b>	75 (54-83)
<b>Localización tumor primario</b>		
	<b>Manos n (%)</b>	8 (24,2)
	Subungueal	6 (18,2)
	Dedo	2 (6,1)
	<b>Pies n (%)</b>	25 (75,8)
	Subungueal	8 (24,2)
	Talón	11 (33,3)
	Dedo	3 (9,1)
	Lateral	2 (6,1)
	N/A	1 (3,0)
<b>Breslow (mm)</b>		
	<b>Media (±DS)</b>	4,2 (±3,9)
	<b>Mediana (IQR)</b>	2,7 (0,89-7,9)
<b>Ulceración n (%)</b>		
	<b>Sí</b>	20 (60,6)
	<b>No</b>	13 (39,4)
<b>Índice mitótico n (%)</b>		
	<b>&lt;1/mm<sup>2</sup></b>	6 (18,2)
	<b>≥ 1/mm<sup>2</sup></b>	21 (63,6)
	<b>N/A</b>	6 (18,2)

Estadio AJCC 7ª edición n (%)		
	<b>0</b>	5 (15,2)
	<b>IA</b>	4 (12,1)
	<b>IB</b>	3 (9,1)
	<b>IIA</b>	3 (9,1)
	<b>IIB</b>	3 (9,1)
	<b>IIC</b>	9 (27,2)
	<b>IIIA</b>	0 (0,0)
	<b>IIIB</b>	1 (3,0)
	<b>IIIC</b>	2(6,1)
	<b>IIID</b>	0 (0,0)
	<b>IV</b>	3 (9,1)
Supervivencia específica de MLA n (%)		
	<b>Vivo</b>	16 (48,4)
	<b>Muerte específica por melanoma</b>	13(39,4)
	<b>Muerte por otras causas</b>	4 (12,1)
Supervivencia específica de MLA (meses)		
	<b>Media (±DS)</b>	42,8 (±35,1)
	<b>Mediana (IQR)</b>	39 (19,9-61,3)
Recaída n (%)		
	<b>Sí</b>	12 (36,3)
	<b>No</b>	18 (54,5)
	<b>Metástasis a distancia en diagnóstico</b>	3 (9,1)
Supervivencia libre de enfermedad (meses)		
	<b>Media (±DS)</b>	40,9(±36,1)
	<b>Mediana (IQR)</b>	37 (12,3-49,6)

Tabla 13. Características clinicopatológicas de los pacientes de la cohorte de MLA del HUAV diagnosticados y seguidos durante el periodo de 2008-2021. DS: Desviación estándar; IQR: Rango intercuartílico; N/A: Valores perdidos.

### 1.1.2. Análisis de la supervivencia específica de MLA y la supervivencia libre de enfermedad en función de las características clinicopatológicas de la cohorte

A partir de las características demográficas y del tumor de los pacientes del estudio, se realizó un análisis de la supervivencia específica de MLA en función de dichas características (Tabla 14). En el caso de las variables continuas, como son la edad y el índice Breslow, fueron dicotomizadas siendo el valor de corte para separar ambos grupos el valor aproximado de la mediana. Los pacientes que fallecieron por causas diferentes a MLA (n=4), no fueron incluidos en este análisis.

		Pacientes (n)	% Supervivencia específica MLA al año ( $\pm$ SEP)	% Supervivencia específica MLA a los 3 años ( $\pm$ SEP)	$\chi^2$ (Log-Rank test)	p-valor
Sexo	Hombre	14	78( $\pm$ 11)	52( $\pm$ 14)	1,137	0,286
	Mujer	15	94( $\pm$ 6)	81( $\pm$ 10)		
Edad (años)	$\leq$ 75	17	88( $\pm$ 8)	74( $\pm$ 11)	1,896	0,169
	$>$ 75	12	85( $\pm$ 10)	60( $\pm$ 14)		
Breslow (mm)	$\leq$ 3	15	100( $\pm$ 0)	93( $\pm$ 7)	12,505	<b>&lt;0,001***</b>
	$>$ 3	14	71( $\pm$ 12)	41( $\pm$ 13)		
Ulceración	Sí	19	78( $\pm$ 10)	54( $\pm$ 12)	9,244	<b>0,002**</b>
	No	10	100( $\pm$ 0)	90( $\pm$ 9)		
Mitosis	$<$ 1 mm <sup>2</sup>	5	100( $\pm$ 10)	80( $\pm$ 18)	3,487	0,062
	$\geq$ 1 mm <sup>2</sup>	19	78( $\pm$ 10)	60( $\pm$ 12)		
	N/A	5	-	-		
Localización	Subungueal	14	60( $\pm$ 14)	60( $\pm$ 14)	0,009	0,924
	Otra	15	94( $\pm$ 6)	74( $\pm$ 11)		

**Tabla 14. Análisis de la supervivencia específica de MLA en función de las características demográficas y patológicas del tumor.** Representación porcentual de los pacientes que sobreviven tras 1 y 3 años de seguimiento. El análisis estadístico de la supervivencia específica de MLA entre los grupos de cada variable fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor $<$ 0.05; \*\*p-valor $<$ 0.01; \*\*\*p-valor $<$ 0.001). SEP: error estándar de la proporción; N/A: valores perdidos.

Las variables en las que se observaron diferencias estadísticamente significativas, tras el análisis de supervivencia fueron el índice Breslow ( $p < 0.001$ ) y la ulceración ( $p = 0.002$ ). En el caso del grosor del tumor, pudimos observar que la supervivencia es de un 100% durante el primer año, descendiendo a un 93% ( $\pm 7$ ) tras el tercer año de seguimiento en el grupo con Breslow igual o inferior a 3 mm. Sin embargo, en el grupo con índices superiores a 3 mm, tras el primer año posterior al diagnóstico, la supervivencia es de un 71% ( $\pm 12$ ), decayendo hasta el 41% ( $\pm 13$ ) al tercer año. Respecto a la presencia de ulceración, el 78% ( $\pm 10$ ) de los pacientes con el tumor ulcerado sobrevivieron tras el primer año, descendiendo a un 54% ( $\pm 12$ ) al tercer año de seguimiento. En el caso de los pacientes sin ulceración, la supervivencia fue del 100% el primer año y de un 90% ( $\pm 9$ ) al tercer año tras el diagnóstico.

Posteriormente, el estadio AJCC fue agrupado según su riesgo para facilitar el manejo de los pacientes, siendo las categorías utilizadas: *in situ* (estadio 0), riesgo bajo (estadio IA y IB), riesgo intermedio (estadio IIA), riesgo alto (estadio IIB, IIC, IIIA, IIIB, IIIC y IIID) y metástasis a distancia (estadio IV). Asimismo, para facilitar el análisis del riesgo, se agrupó a su vez en 3 grupos: *in situ*/riesgo bajo; riesgo intermedio; y riesgo alto/metástasis a distancia. En cuanto a la supervivencia específica de MLA en función del riesgo se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.002$ ) entre las diferentes categorías (Tabla 15). En el caso del grupo de pacientes con tumores *in situ*/riesgo bajo, la supervivencia fue del 100% durante los tres primeros años; y en los pacientes con estadio intermedio la supervivencia fue del 100% el primer año, descendiendo a un 50% ( $\pm 35$ ) al tercer año de seguimiento. Por último, los pacientes con riesgo alto/metástasis a distancia, la supervivencia fue de un 76% ( $\pm 10$ ) durante el primer año, descendiendo a un 51% ( $\pm 12$ ) al tercer año de seguimiento.

		Pacientes (n)	% Supervivencia específica MLA al año ( $\pm$ SEP)	% Supervivencia específica MLA a los 3 años ( $\pm$ SEP)	Chi-cuadrado (Log-Rank test)	p-valor
Riesgo	In situ/Riesgo bajo	10	100( $\pm$ 0)	100( $\pm$ 0)	12,718	0,002**
	Riesgo intermedio	2	100( $\pm$ 0)	50( $\pm$ 35)		
	Riesgo alto/metástasis a distancia	17	76( $\pm$ 10)	51( $\pm$ 12)		

**Tabla 15. Análisis de la supervivencia específica de MLA en función del riesgo.** Representación porcentual de los pacientes que sobreviven tras 1 y 3 años de seguimiento. El análisis estadístico de la supervivencia específica de MLA entre los diferentes grupos del riesgo fue realizado mediante Log-Rank test (\* $p$ -valor $<0.05$ ; \*\* $p$ -valor $<0.01$ ; \*\*\* $p$ -valor $<0.001$ ). SEP: error estándar de la proporción.

Por otro lado, también realizamos un análisis de la supervivencia o progresión libre de enfermedad de los pacientes en función de las características demográficas y del tumor, para evaluar las recaídas del MLA a lo largo del periodo de estudio (Tabla 16). Los pacientes que presentaron metástasis a distancia (estadio IV) en el momento del diagnóstico fueron excluidos del análisis (n=3).

		Pacientes (n)	% Supervivencia libre de enfermedad al año ( $\pm$ SEP)	% Supervivencia libre de enfermedad a los 3 años ( $\pm$ SEP)	Chi-cuadrado (Log-Rank test)	p-valor
Sexo	Hombre	13	76( $\pm$ 12)	49( $\pm$ 15)	1,888	0,169
	Mujer	17	88( $\pm$ 8)	82( $\pm$ 9)		
Edad (años)	$\leq$ 75	15	86( $\pm$ 9)	71( $\pm$ 12)	0,851	0,356
	$>$ 75	15	80( $\pm$ 10)	66( $\pm$ 12)		
Breslow (mm)	$\leq$ 3	18	100( $\pm$ 0)	94( $\pm$ 6)	14,076	<b>&lt;0,001***</b>
	$>$ 3	12	58( $\pm$ 14)	33( $\pm$ 14)		
Ulceración	Sí	17	82( $\pm$ 9)	64( $\pm$ 12)	0,224	0,636
	No	13	84( $\pm$ 10)	75( $\pm$ 12)		
Mitosis	$<$ 1 mm <sup>2</sup>	7	86( $\pm$ 13)	86( $\pm$ 13)	2,254	0,133
	$\geq$ 1 mm <sup>2</sup>	17	82( $\pm$ 9)	61( $\pm$ 12)		
	N/A	5	-	-		
Localización	Subungueal	13	76( $\pm$ 12)	76( $\pm$ 12)	0,473	0,492
	Otra	17	88( $\pm$ 8)	65( $\pm$ 12)		

**Tabla 16. Análisis de la supervivencia libre de enfermedad en función de las características demográficas y patológicas del tumor.** Representación porcentual de los pacientes que se mantienen sin recaer tras 1 y 3 años de seguimiento. El análisis estadístico de la supervivencia libre de enfermedad entre los grupos de cada variable fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor $<$ 0.05; \*\*p-valor $<$ 0.01; \*\*\*p-valor $<$ 0.001). SEP: error estándar de la proporción; N/A: valores perdidos.

En este análisis solo obtuvimos diferencias estadísticamente significativas (p $<$ 0.001) en el índice Breslow. Los pacientes con un grosor del tumor igual o inferior a 3 mm se mantuvieron sin recaer durante el primer año en un 100% del total, y al tercer año en un 94% ( $\pm$ 6). Sin embargo, en el grupo de pacientes con tumores de Breslow superior a 3 mm, no recayeron un 58% ( $\pm$ 14) durante el primer año, descendiendo esta cifra a un 33% ( $\pm$ 14) tras tres años del primer diagnóstico.



También se realizó un análisis de la supervivencia libre de enfermedad en función del riesgo asociado al estadio AJCC durante los tres primeros años de seguimiento (Tabla 17), observándose diferencias significativas ( $p=0.002$ ) en cuanto a recaídas entre los diferentes estadios. En primer lugar, ningún paciente del grupo de tumores *in situ*/riesgo bajo recayeron durante los tres primeros años tras el diagnóstico. Por otro lado, un 100% de los pacientes con riesgo intermedio se mantuvieron sin recaídas durante el primer año, y un 67% ( $\pm 27$ ) tras el tercer año de seguimiento. Finalmente, el 67% ( $\pm 12$ ) de los pacientes con riesgo alto/metástasis a distancia se mantuvieron sin recaer durante el primer año, descendiendo a un 46% ( $\pm 13$ ) al tercer año tras el diagnóstico.

		Pacientes (n)	% Supervivencia libre de enfermedad al año ( $\pm$ SEP)	% Supervivencia libre de enfermedad a los 3 años ( $\pm$ SEP)	Chi-cuadrado (Log-Rank test)	p-valor
Riesgo	In situ/Riesgo bajo	12	100( $\pm 0$ )	100( $\pm 0$ )	12,741	0,002**
	Riesgo intermedio	3	100( $\pm 0$ )	67( $\pm 27$ )		
	Riesgo alto/metástasis a distancia	15	67( $\pm 12$ )	46( $\pm 13$ )		

**Tabla 17. Análisis de la supervivencia libre de enfermedad en función del riesgo.** Representación porcentual de los pacientes que se mantienen sin recaer tras 1 y 3 años de seguimiento. El análisis estadístico de la supervivencia libre de enfermedad entre diferentes grupos del riesgo fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001). SEP: error estándar de la proporción.

**1.1.3. Estudio de la profesión como factor de riesgo de la cohorte de pacientes de MLA**

La profesión de los pacientes fue recogida por parte del Servicio de Dermatología del HUAV para realizar una descripción de esta variable como factor de riesgo de MLA, y observar si existía algún patrón en relación a la ocupación en los pacientes de nuestra cohorte. Solo se pudieron obtener datos de profesión de un 69.7% (23/33) del total de pacientes

Las profesiones más representativas fueron las relacionadas con el sector de la agricultura y la ganadería (27.2%), la construcción (12.1%) y la limpieza (12.1%). El resto de pacientes (18.1%) no se pudieron categorizar dentro de ninguno de los grupos mencionados (Figura 46).

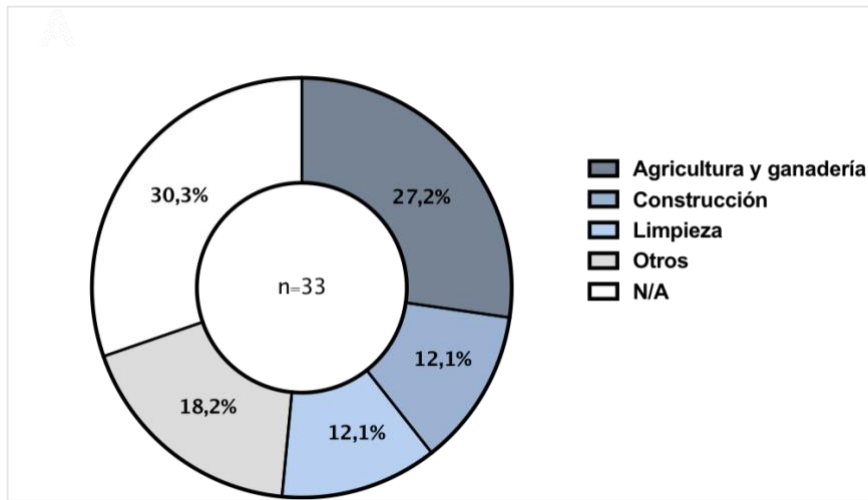


Figura 46. Representación gráfica de los grupos de profesiones más representativos dentro de la cohorte de pacientes de MLA. N/A: Valores perdidos.

Sobre el total de profesiones recogidas, observamos un patrón en el que la mayoría de ocupaciones de los pacientes podían estar relacionadas con la exposición a químicos (sector agropecuario y limpieza) y/o a traumatismos (sector agropecuario, construcción, mecánicos). Por lo tanto, realizamos dos diferenciaciones independientes, por un lado, agrupamos a los pacientes según si su profesión estaba relacionada con la exposición a químicos (48.5%), o con la exposición a traumatismos (21.2%) (Figura 47).

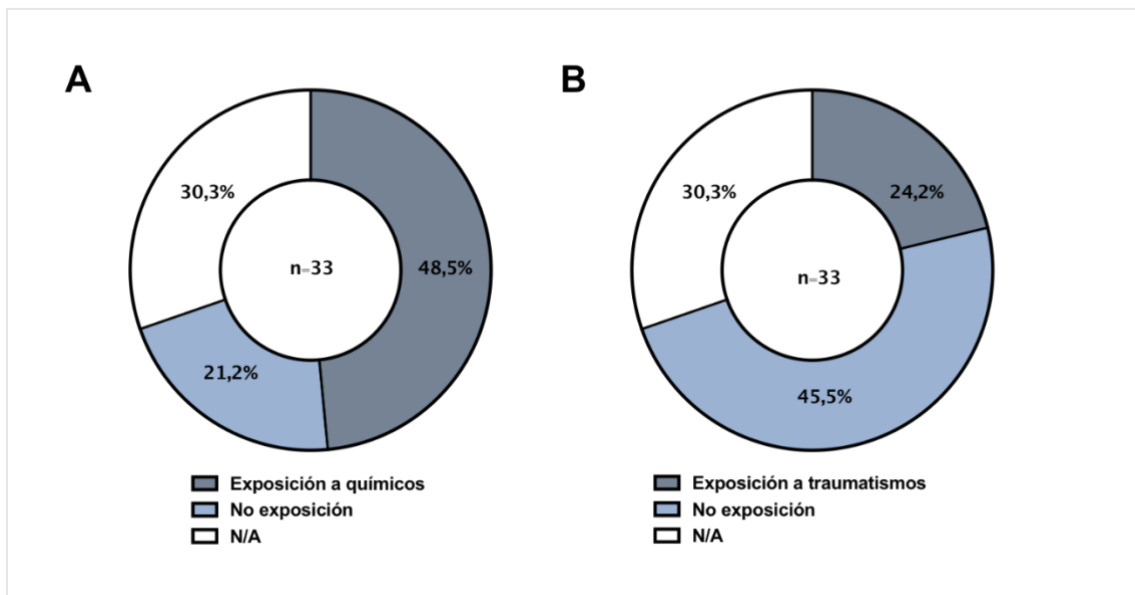


Figura 47. Representación gráfica de los pacientes agrupados según su exposición a químicos (A) o a traumatismos (B) según la profesión ejercida. N/A: valores perdidos.

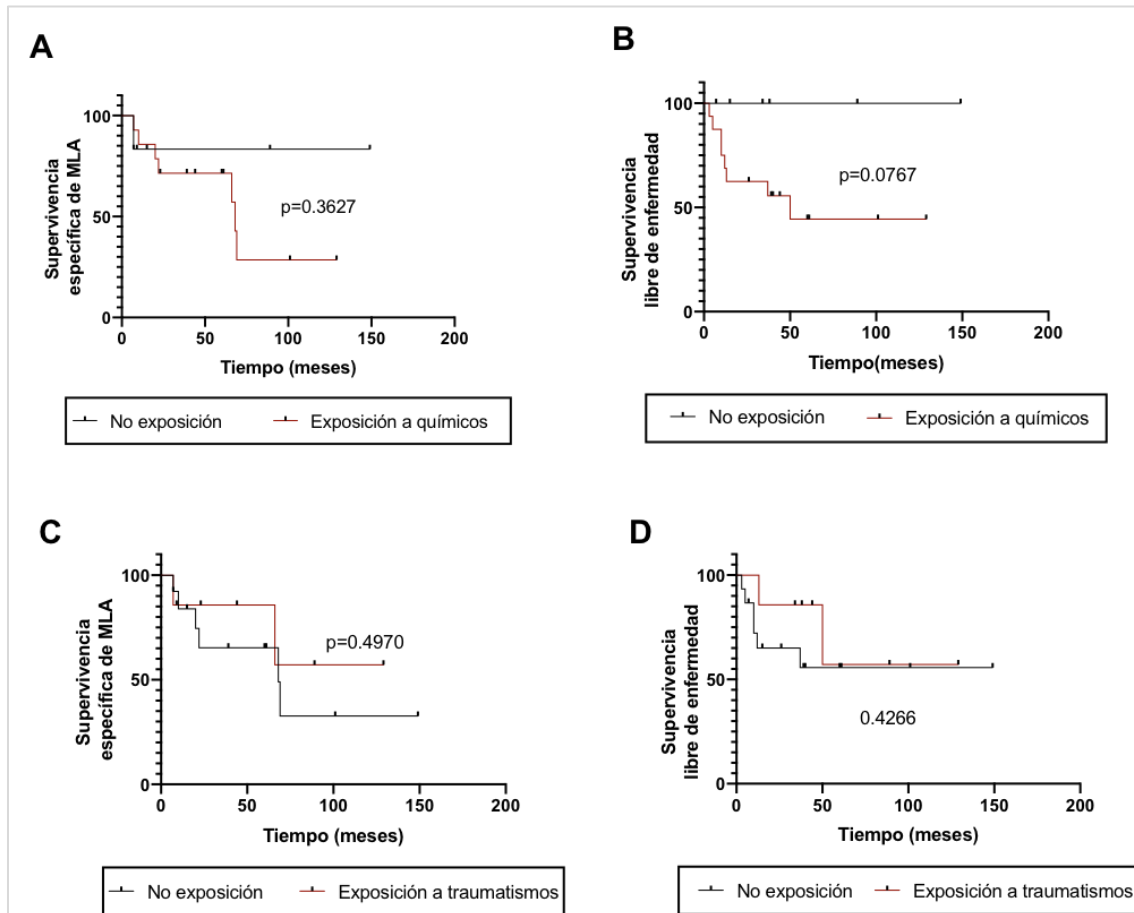
A partir de esta clasificación, estudiamos si existía asociación entre las características del tumor primario (Breslow, ulceración y mitosis), la localización y el riesgo asociado al estadio de los pacientes, en función de la exposición a químicos o traumatismos según sus ocupaciones (Tabla 18).

		No exposición	Exposición a químicos	p-valor	No exposición	Exposición a traumatismos	p-valor
<b>Breslow (mm)</b>	≤3	5	8	0,405	9	6	0,685
	>3	2	8		6	4	
<b>Ulceración</b>	Sí	4	10	>0,99	7	7	0,086
	No	3	6		8	1	
<b>Mitosis</b>	<1 mm <sup>2</sup>	1	5	0,613	5	1	0,354
	≥1 mm <sup>2</sup>	5	9		8	6	
<b>Localización</b>	Subungueal	6	4	0,019*	7	3	>0,99
	Otra	1	12		8	5	
<b>Riesgo</b>	In situ/Riesgo bajo	4	5	0,391	7	2	0,583
	Riesgo intermedio	0	2		1	1	
	Riesgo alto/Metástasis a distancia	3	9		7	5	

**Tabla 18. Análisis de la asociación entre las características clinicopatológicas en función de la exposición a químicos o a traumatismos según la profesión de los pacientes de la cohorte.** El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher para las variables de 2x2 categorías, y Chi-cuadrado de Pearson para el resto (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

Tras el análisis realizado, solo existieron diferencias significativas en la variable localización (p=0.019) del tumor respecto a la exposición a químicos, observándose que, a la mayoría de los pacientes expuestos a químicos (12/16), se les había diagnosticado el tumor primario en una localización diferente a la subungueal, respecto a los no expuestos que mayoritariamente presentaron localización subungueal (6/7). Por otra parte, analizamos la supervivencia específica de MLA, así como la supervivencia libre de enfermedad respecto a la exposición de químicos o a traumatismos para comprobar si existían diferencias significativas entre la

exposición a estos agentes y la ausencia de exposición (Figura 48). Los resultados obtenidos en cuanto a supervivencia no resultaron significativos en ninguno de los casos analizados.



**Figura 48. Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a la exposición de químicos o traumatismos.** (A) Kaplan-Meier de la supervivencia específica de MLA y (B) supervivencia libre de enfermedad según la exposición a químicos. (C) Kaplan-Meier de la supervivencia específica de MLA y la (B) supervivencia libre de enfermedad según la exposición a traumatismos. El análisis estadístico de la supervivencia entre los grupos de cada variable fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

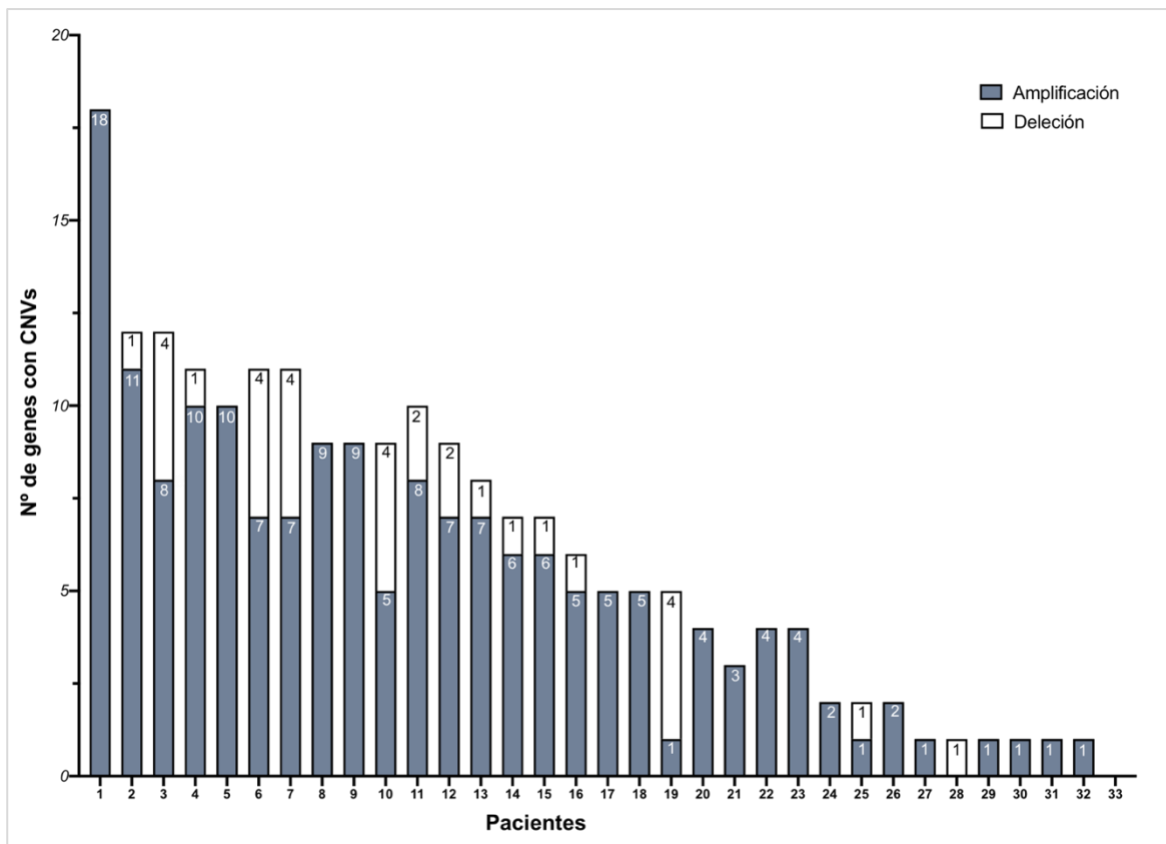
#### 1.1.4. Estudio de la dosis génica oncogénica en la cohorte de pacientes de MLA

El MLA se caracteriza por tener un perfil genético diferente al resto de MCs, como ya hemos mencionado en apartados anteriores, ya que tiene como rasgo característico un bajo número de mutaciones puntuales o SNVs, y un incremento de reordenamientos estructurales y CNVs de genes.

Por lo tanto, con el objetivo de estudiar la dosis génica del MLA, es decir, el incremento (amplificaciones) o descenso (deleciones) en el número de copias de oncogenes relevantes en el proceso tumoral, llevamos a cabo la técnica MLPA. Esta técnica nos permitió realizar un

análisis de las alteraciones en el número de copias en un total de 24 oncogenes, así como de la presencia de la mutación puntual *BRAF<sup>V600E</sup>*.

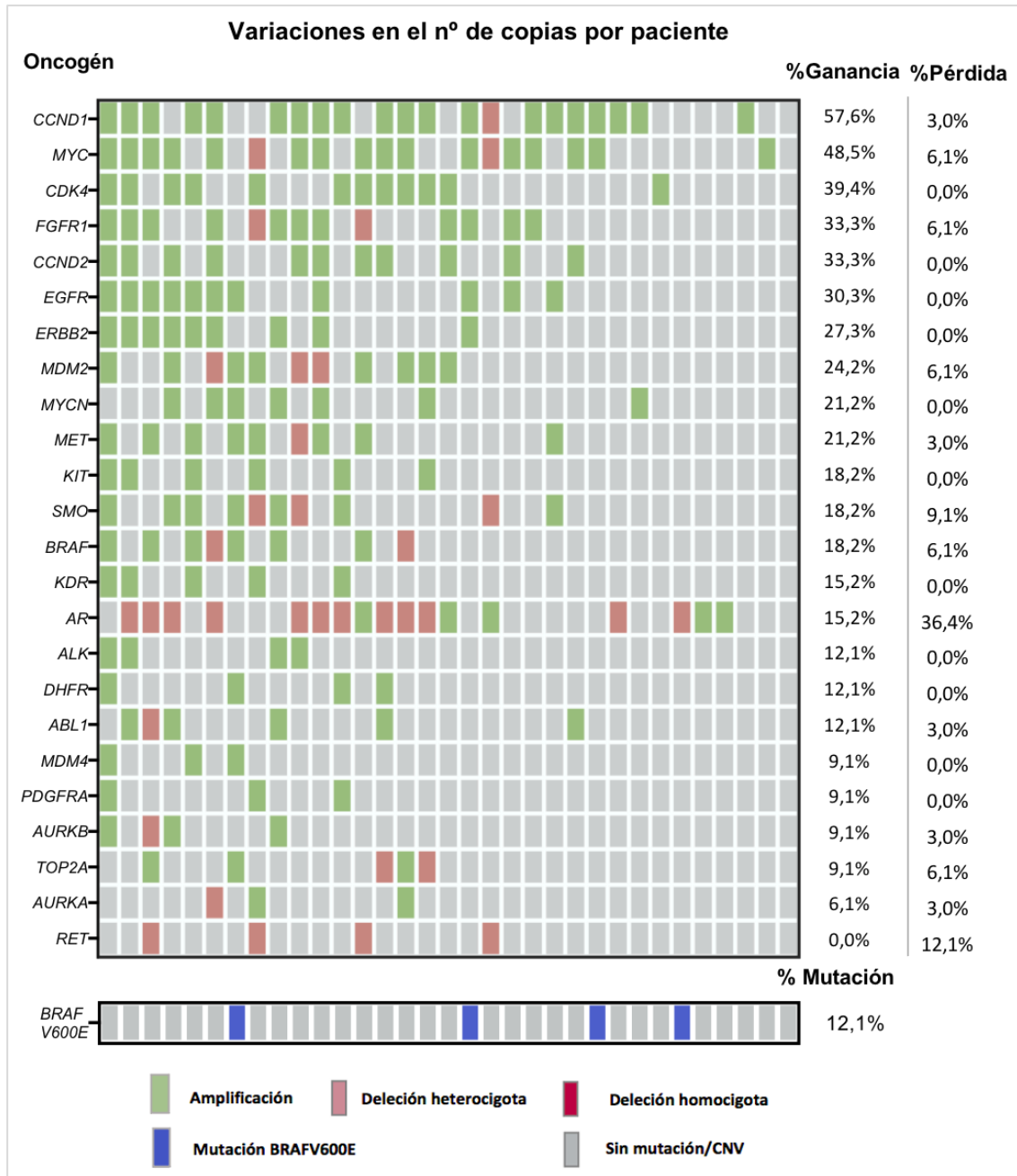
Tras el análisis mediante MLPA, observamos que un 97% (32/33) de los pacientes de nuestra cohorte presentaron algún tipo de alteración (amplificación/delección) en al menos un gen del total de oncogenes estudiados (*Figura 49*). En cuanto al total de CNVs encontradas en todos los pacientes, un 84.1% fueron ganancias, y un 15.9% resultaron ser pérdidas. La mediana de las alteraciones encontradas por paciente fue de 5, con un mínimo de 0 y un máximo de 18 alteraciones.



**Figura 49.** Gráfica del número de oncogenes alterados (amplificaciones y/o delecciones) por paciente de MLA tras el análisis de la dosis génica mediante MLPA. Los pacientes fueron ordenados de mayor a menor según la frecuencia de amplificación.

Todos los genes estudiados presentaron alteraciones en la dosis génica, ya fuese a nivel de ganancia o de pérdida (*Figura 50*). Como hemos mencionado anteriormente, las amplificaciones fueron predominantes en el total de genes estudiados, siendo el gen más amplificado *CCND1* (57.6%), seguido de *MYC* (48.5%) y *CDK4* (39.4%). Las delecciones fueron minoritarias y todas ellas fueron heterocigotas, es decir, afectaron a solo una de las copias del gen, siendo el gen con más pérdidas el gen *AR* (36.4%), seguido de *RET* (12.1%) y *SMO* (9.1%). El gen *AR* codifica para

el receptor de andrógenos, cuya localización cromosómica corresponde al cromosoma X, por lo que en condiciones normales los hombres ya tienen una sola copia de este gen, como ocurre en nuestra cohorte. Por lo tanto, las alteraciones detectadas en este gen como ‘pérdidas’, no las consideramos como deleciones en el posterior análisis. En cuanto a la mutación *BRAF<sup>V600E</sup>*, fue detectada en un 12.1% de los pacientes de nuestra cohorte.



**Figura 50.** Heatmap de las CNVs detectadas por paciente en los oncogenes analizados mediante MLPA. El heatmap muestra la detección de ganancias y/o pérdidas en los genes estudiados (filas) por paciente (columnas), así como de la mutación *BRAF<sup>V600E</sup>* (abajo). Los genes se encuentran ordenados en orden decreciente según el porcentaje de ganancia o amplificación (derecha).

A partir de los datos obtenidos del MLPA, además de la presencia categórica de amplificación o deleción, calculamos el número de copias en los que variaba la dosis génica (Figura 51). La sensibilidad de la técnica permitió detectar si los pacientes no tenían ninguna copia del gen (deleción homocigota), 1 copia (deleción heterocigota), 2 copias (diploides), 3 copias del gen (ganancia de 1 copia), o si tenían un número igual o superior a 4 copias (ganancia de 2 o más copias) del gen.

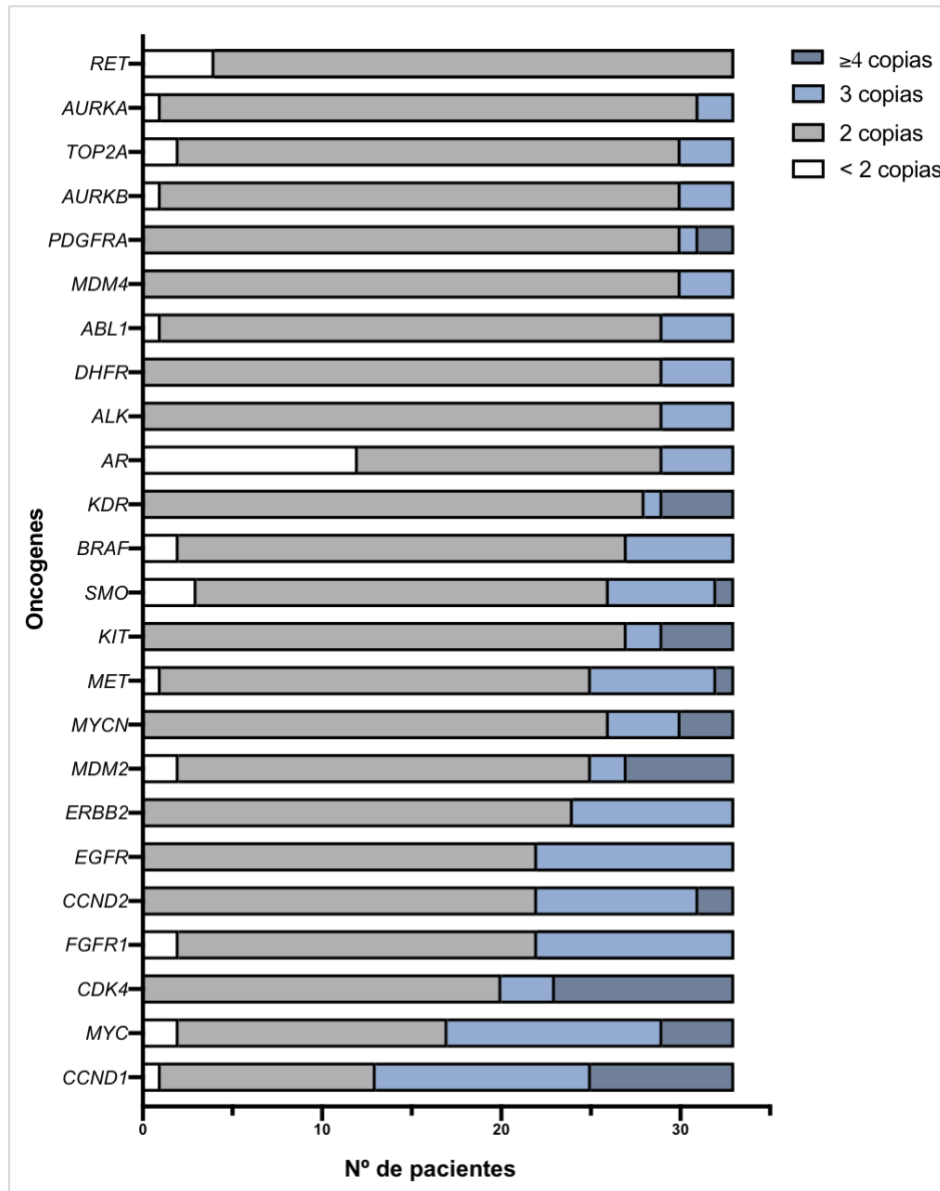


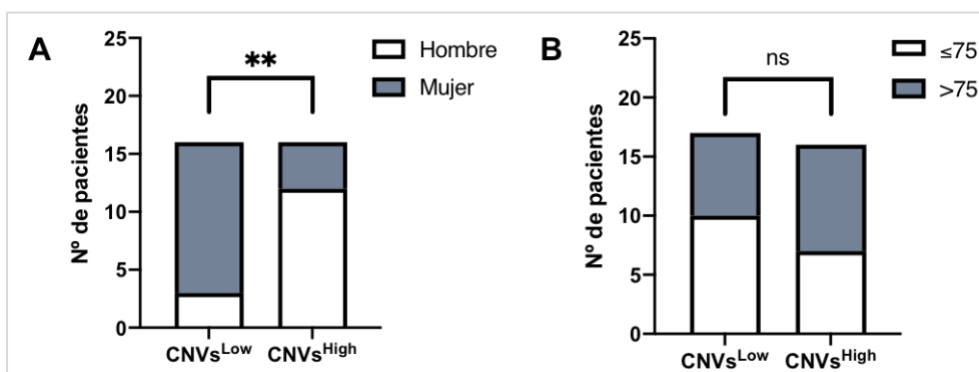
Figura 51. Gráfica representativa del número de copias detectado de cada oncogén estudiado en las biopsias de MLA mediante MLPA. Los pacientes se encuentran agrupados según el número de copias en los grupos: < 2 copias (deleción), 2 copias (diploide), 3 copias (ganancia de 1 copia) y ≥4 copias.

Por lo tanto, del total de amplificaciones detectadas, éstas fueron en su mayoría de 3 copias del gen (64.3% del total de amplificaciones), y en menor medida de  $\geq 4$  copias (35.7%). El gen que presentó una mayor frecuencia de la categoría de  $\geq 4$  copias fue el gen *CDK4* (30.3% del total de pacientes), seguido de *CCND1* (24.2%) y de *MDM2* (18.1%).

#### 1.1.4.1. Análisis de la relación entre las CNVs y las características clinicopatológicas de la cohorte

A partir de los resultados obtenidos del MLPA, analizamos la correlación entre el total de alteraciones o CNVs (amplificaciones y deleciones) detectadas por paciente, y sus características clinicopatológicas. Para ello, dividimos la cohorte en dos grupos, tomando el valor de la mediana del total de CNVs/paciente como punto de corte para diferenciar ambos grupos. Como indicamos en el apartado anterior, el valor de la mediana fue de 5 CNVs/paciente, por lo que las biopsias con un valor  $\leq 5$  CNVs fue categorizado como grupo de 'bajo número de CNVs (CNVs<sup>Low</sup>)' y las biopsias con valores  $>5$  como grupo de 'alto número de CNVs (CNVs<sup>High</sup>)'. En esta división, no se tuvieron en cuenta las pérdidas del gen *AR*, ya que como comentamos anteriormente, no eran pérdidas 'reales' de copias de este oncogén.

En primer lugar, analizamos la relación entre las características intrínsecas del paciente (edad y sexo) con el número de CNVs que fueron detectadas en las biopsias (Figura 52). En cuanto al sexo de los pacientes, observamos que de forma significativa ( $p=0.0038$ ) el grupo de pacientes con CNVs<sup>High</sup> mayoritariamente eran de sexo masculino (12/16) y el grupo de pacientes con CNVs<sup>Low</sup> de sexo femenino (13/16); sin embargo, no encontramos diferencias significativas en relación a la edad.

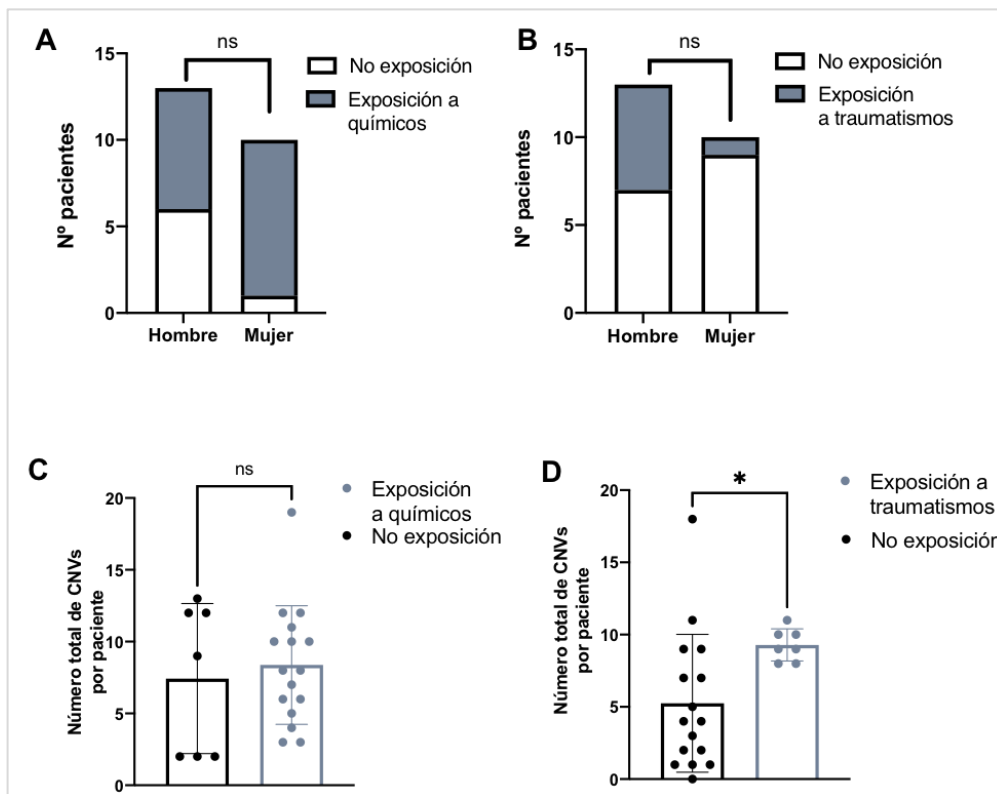


**Figura 52. Análisis de la correlación entre las características intrínsecas de los pacientes de MLA respecto al total de CNVs por paciente.** (A) Correlación entre el sexo y el número total de CNVs/paciente. (B) Correlación entre la edad y el número total de CNVs/paciente. El análisis estadístico realizado partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher (\* $p$ -valor $<0.05$ ; \*\* $p$ -valor $<0.01$ ; \*\*\* $p$ -valor $<0.001$ ).



Además, estudiamos la relación entre la exposición a químicos o a traumatismos y el número de CNVs, para estudiar si la asociación hallada entre el sexo masculino y las CNVs<sup>High</sup> podría relacionarse con la ocupación ejercida (Figura 53).

Los resultados obtenidos en la correlación entre el sexo y la exposición a químicos o a traumatismos no resultaron estadísticamente significativas, aunque si que se observó que la mayoría de mujeres estaban expuestas a químicos (9/10) y no a traumatismos (1/10) en sus ocupaciones (Figura 52A y 52B). En segunda instancia, analizamos la variable del total de CNVs de forma continua (no dicotomizada), respecto la exposición a químicos o a traumatismos como grupos independientes. Se encontraron diferencias significativas en el caso de la exposición a traumatismos ( $p < 0.05$ ), en la que los pacientes que estuvieron expuestos a este agente de estrés presentaron un mayor número de CNVs que aquellos que no tuvieron exposición en relación a su profesión (Figura 53C y 53D).



**Figura 53. Análisis de la correlación entre sexo y el total de CNVs respecto a la exposición a químicos o a traumatismos en función de la profesión.** (A) Correlación entre el sexo de los pacientes respecto y la exposición a químicos según la profesión. (B) Correlación entre el sexo de los pacientes respecto y la exposición a traumatismos según la profesión. (C) Análisis del número total de CNVs por paciente según la exposición a químicos. (D) Análisis del número total de CNVs por paciente según la exposición a traumatismos. El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher (A y B) y el análisis de las medias de grupos independientes mediante T-test no pareado (C y D) (\* $p$ -valor $<0.05$ ; \*\* $p$ -valor $<0.01$ ; \*\*\* $p$ -valor $<0.001$ ).

Posteriormente, se estudiaron las características del tumor (índice Breslow, ulceración, índice mitótico y localización) respecto al número total de CNVs/paciente (Figura 54). De forma significativa, el grupo de pacientes con CNVs<sup>High</sup> presentó mayoritariamente índices de Breslow iguales o superiores a 3 mm (11/16;  $p=0.0149$ ), así como mayor presencia de ulceración (14/16;  $p=0.039$ ) e índice mitótico superior (15/16;  $p=0.0019$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la variable localización subungueal o no del tumor respecto al total de CNVs.

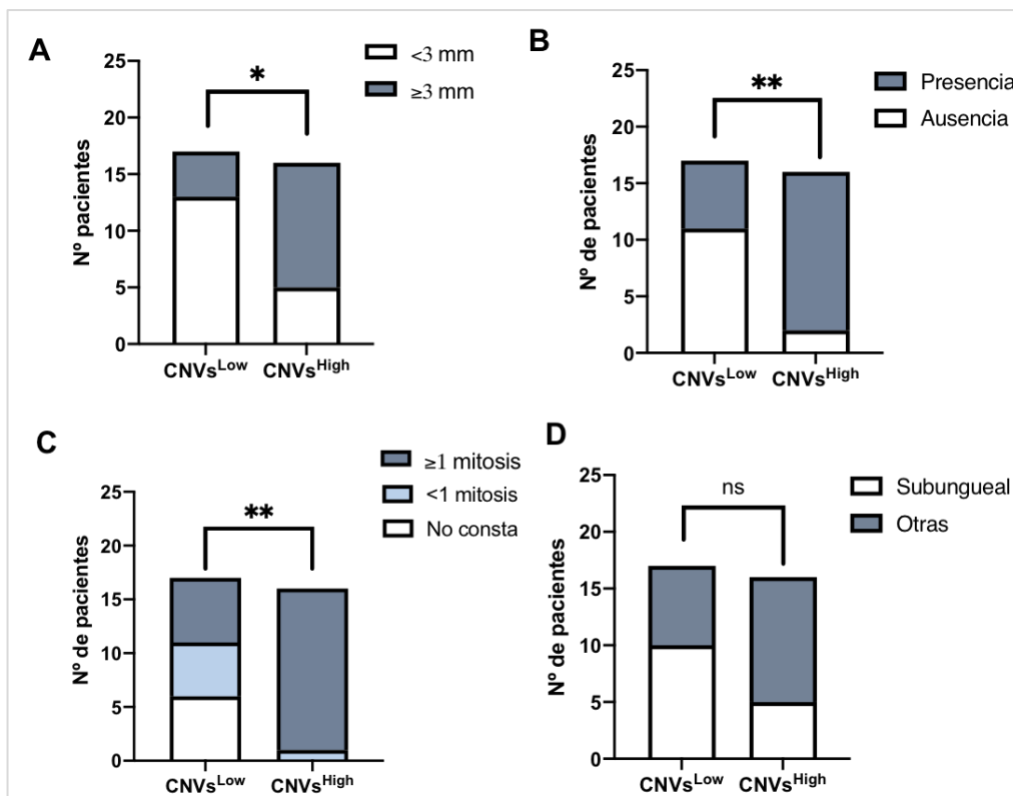
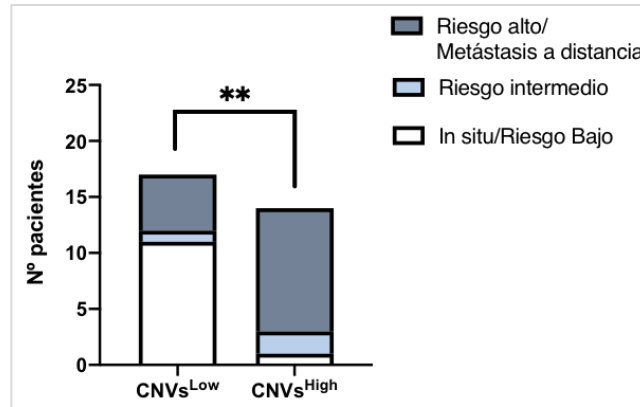


Figura 54. Análisis de la correlación entre las características del tumor respecto al total de CNVs por paciente. (A) Correlación del índice Breslow, (B) la ulceración, (C) el índice mitótico y (D) la localización del tumor primario respecto al número de CNVs/paciente. El análisis estadístico realizado partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher (\* $p$ -valor<0.05; \*\* $p$ -valor<0.01; \*\*\* $p$ -valor<0.001).

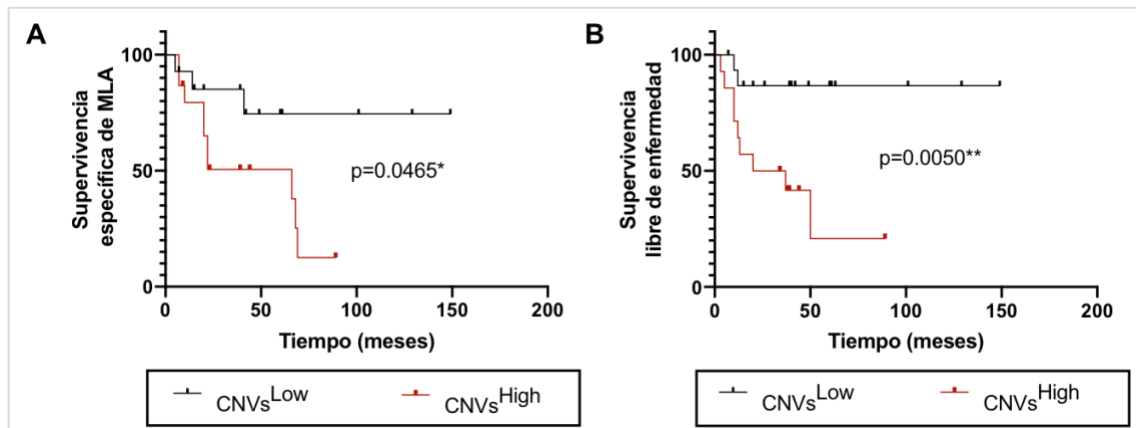
El riesgo asociado al estadio AJCC también fue analizado en función de las CNVs (Figura 55), observándose que la mayoría de pacientes con tumores *in situ* o riesgo bajo se distribuyeron significativamente ( $p=0.0047$ ) en su mayoría en el grupo de CNVs<sup>Low</sup> (11/12), y aquellos con riesgo alto/metástasis a distancia en el grupo de CNVs<sup>High</sup> (11/16).



**Figura 55. Análisis de la correlación entre el riesgo asociado al estadio AJCC respecto al total de CNVs por paciente.** El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante Chi-cuadrado de Pearson (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

Finalmente, se realizó un análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad en función del total de CNVs. La supervivencia específica de MLA en el grupo con CNVs<sup>Low</sup> fue del 93% ( $\pm 7$ ) el primer año de seguimiento, y del 85% ( $\pm 10$ ) tras el tercero, sin embargo, en el grupo con CNVs<sup>High</sup> fue del 80% ( $\pm 10$ ) durante el primer año, descendiendo a un 52% ( $\pm 13$ ) (Figura 56A). Además, la supervivencia fue significativamente inferior ( $p=0.0465$ ) en el grupo de pacientes con CNVs<sup>High</sup>, con una media de supervivencia de 44.6 meses (95% IC, 28.8-60.4 meses), respecto al grupo de CNVs<sup>Low</sup> que tuvo una supervivencia media de 116.7 meses (95% IC, 84.9-148.7 meses).

En cuanto a la supervivencia libre de enfermedad (Figura 56B), los pacientes con CNVs<sup>Low</sup> se mantuvieron sin recaer en un 94% ( $\pm 6$ ) durante el primer año y un 86% ( $\pm 9$ ) en el tercero. Por otro lado, un 71% ( $\pm 12$ ) de los pacientes con CNVs<sup>High</sup> se mantuvieron sin recaer durante el primer año, descendiendo al 50% ( $\pm 13$ ) el tercer año tras ser diagnosticados. Asimismo, el grupo de pacientes con CNVs<sup>High</sup> presentó una supervivencia libre de enfermedad significativamente inferior ( $p=0.005$ ) que el grupo de CNVs<sup>Low</sup>, con periodos medios de supervivencia en ausencia de recaídas de 37.2 meses (95% IC, 18.5-56.0 meses) y de 130.6 meses (95% IC, 106.9-154.3 meses), respectivamente.



**Figura 56. Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto al total de CNVs por paciente.** (A) Kaplan-Meier de la supervivencia específica de MLA y la (B) supervivencia libre de enfermedad respecto al total de CNVs/paciente. El análisis estadístico de la supervivencia entre los grupos fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

#### 1.1.4.2. Análisis de la relación entre los oncogenes con mayor número de amplificaciones y las características clinicopatológicas de la cohorte

Tras el análisis conjunto del total de CNVs por paciente, procedimos a realizar un análisis en el que nos centramos únicamente en las amplificaciones de los genes con mayor porcentaje de amplificación de nuestra cohorte, ya que, al tratarse de oncogenes, un incremento de copias en estos podría tener un mayor impacto en el inicio, desarrollo y progresión tumoral

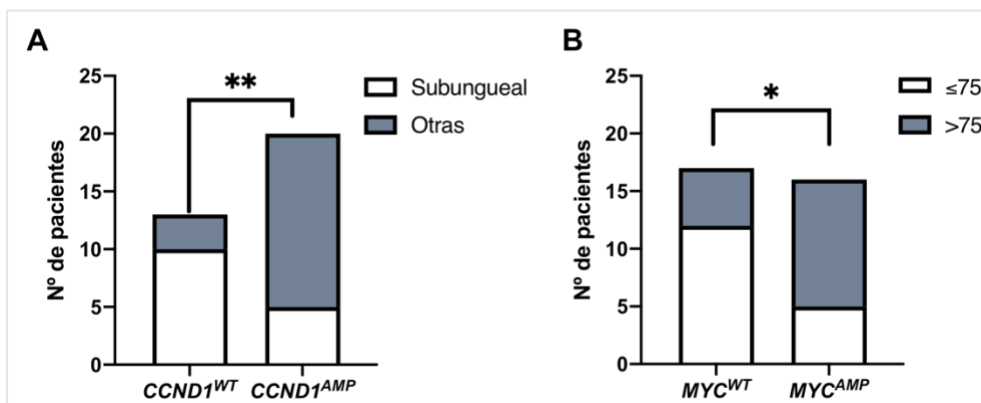
Los oncogenes con mayor porcentaje de amplificación (AMP), representado con anterioridad en la *Figura 32*, fueron *CCND1* (57.6%), *MYC* (48.5%), *CDK4* (39.4%), *FGFR1* (33.3%), *CCND2* (33.3%), *EGFR* (30.3%), *ERBB2* (27.3%) y *MDM2* (24.2%). La presencia o ausencia de amplificación en estos ocho genes se correlacionó con las variables clinicopatológicas (*Tabla Anexa 1*), así como, se estudió cómo influían estas amplificaciones a la supervivencia específica de MLA (*Tabla Anexa 2*) y a la supervivencia libre de enfermedad (*Tabla Anexa 3*).

Se encontraron diferencias significativas en variables relacionadas con *CCND1*, *MYC*, *EGFR*, *MDM2* y *CDK4* (*Tabla 19*).

<i>CCND1</i>	<i>MYC</i>	<i>EGFR</i>	<i>MDM2</i>	<i>CDK4</i>
Localización (**)	Edad (*)	Riesgo (*) Supervivencia libre de enfermedad (*)	Supervivencia específica de MLA (*) Supervivencia libre de enfermedad (*)	Breslow (**) Ulceración (*) Riesgo (*) Supervivencia específica de MLA (*) Supervivencia libre de enfermedad (*)

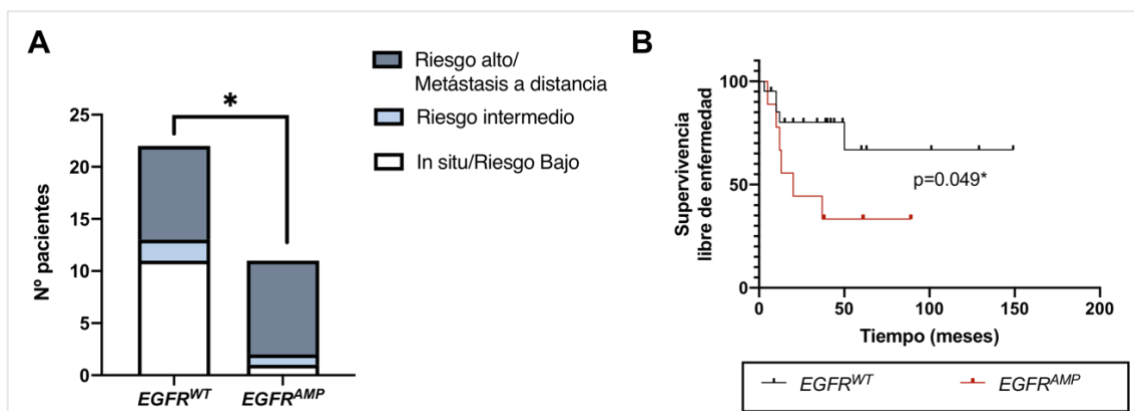
**Tabla 19. Resumen de las variables clinicopatológicas, de supervivencia específica de MLA y de supervivencia libre de enfermedad significativas en relación a la presencia/ausencia de amplificación en los genes con mayor porcentaje de amplificación.** El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher para las variables de 2x2 categorías, y Chi-cuadrado de Pearson para el resto (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

En el grupo de pacientes con *CCND1* silvestre o *wildtype* (WT), se observó una localización del MLA significativamente mayor (p=0.003) a nivel subungueal (10/13), respecto a los pacientes que presentaron *CCND1*<sup>AMP</sup> (5/20), que en su mayoría presentaron localizaciones diferentes a la subungueal (Figura 57A). En el caso del gen *MYC*, los pacientes que presentaron esta amplificación (11/16) tenían edades significativamente superiores (p=0.038) a aquellos que presentaron *MYC*<sup>WT</sup> (5/17) (Figura 57B).



**Figura 57. Gráficas representativas de las correlaciones significativas entre las variables clinicopatológicas y los genes *CCND1* y *MYC*.** (A) Representación de la correlación entre la localización según la presencia/ausencia de amplificación en *CCND1*. (B) Correlación entre la edad según la presencia/ausencia de amplificación en el gen *MYC*. El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher para las variables de 2x2 categorías (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

En cuanto al gen *EGFR*, se observaron diferencias significativas en la variable riesgo ( $p=0.048$ ), en la que los pacientes con tumores *in situ*/riesgo bajo fueron mayoritariamente *EGFR*<sup>WT</sup> (11/12), sin embargo, los pacientes con riesgo alto/metástasis a distancia presentaron de forma equitativa *EGFR*<sup>WT</sup> o *EGFR*<sup>AMP</sup> (9/18) (Figura 58A). También se observaron diferencias a nivel de la supervivencia libre de enfermedad, en la que un 85% ( $\pm 8$ ) de los pacientes con *EGFR*<sup>WT</sup> no se tuvieron recaídas durante el primer año, descendiendo a un 80% ( $\pm 9$ ) al tercer año de seguimiento, sin embargo, un 78% ( $\pm 14$ ) de los que presentaron *EGFR*<sup>AMP</sup> se mantuvieron sin recaídas durante el primer año, disminuyendo a un 44% ( $\pm 17$ ) al tercer año de seguimiento. La supervivencia media sin recaer fue de 92.4 (95% IC, 58.2-126.6) meses para el grupo *EGFR*<sup>WT</sup> y de 43.5 (95% IC, 9.6-24.6) meses para el grupo de pacientes *EGFR*<sup>AMP</sup> (Figura 58B).

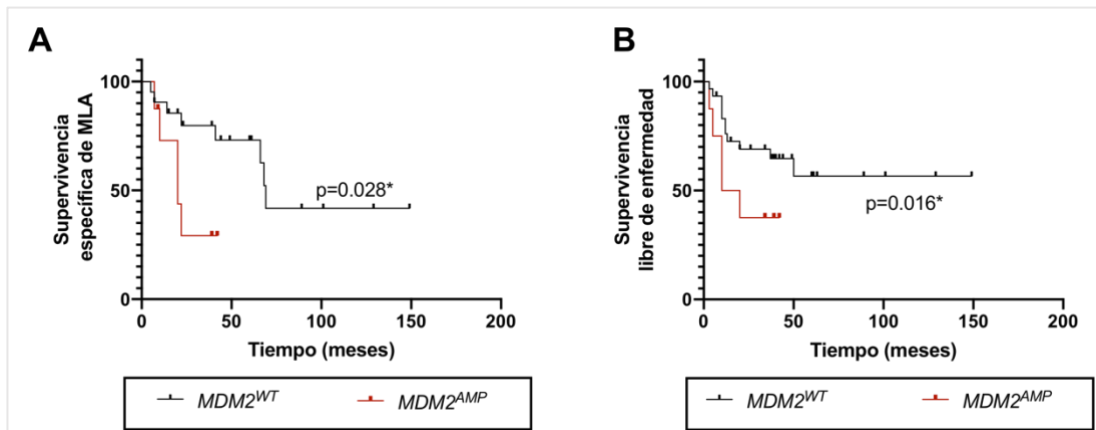


**Figura 58.** Gráficas representativas de las correlaciones entre la variable riesgo y la supervivencia libre de enfermedad respecto al gen *EGFR*. (A) Representación de la correlación entre el riesgo y la presencia/ausencia de amplificación en *EGFR*. (B) Kaplan-Meier de la supervivencia libre de enfermedad respecto la presencia/ausencia de amplificación en *EGFR*. El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante Chi-cuadrado de Pearson(A), y el análisis de la supervivencia(B) entre los grupos fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001) (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

Los pacientes con *MDM2*<sup>WT</sup> presentaron una supervivencia específica de MLA del 90% ( $\pm 7$ ) durante el primer año tras el diagnóstico, disminuyendo a un 79% ( $\pm 9$ ) al tercer año; sin embargo, un 73% ( $\pm 16$ ) de los pacientes con *MDM2*<sup>AMP</sup> se mantuvieron con vida durante el primer año de seguimiento, disminuyendo a un 29% ( $\pm 17$ ) durante el tercero, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.028$ ) (Figura 59A). La supervivencia específica de MLA media fue de 88.7 (95% IC, 59.6-117-82) meses para los pacientes con *MDM2*<sup>WT</sup> y de 23.6 (95% IC, 14.1-33.1) meses para aquellos con *MDM2*<sup>AMP</sup>.

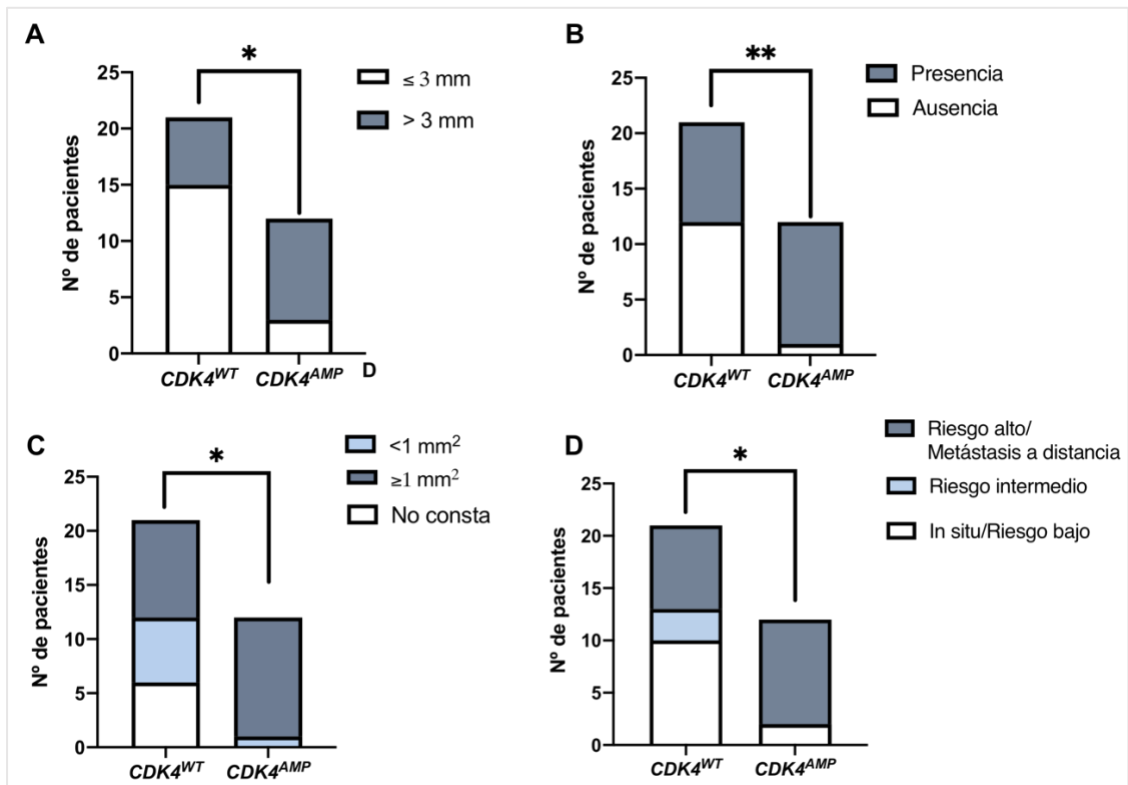
En cuanto a la supervivencia libre de enfermedad, también se observaron diferencias significativas ( $p=0.016$ ), en la que, durante el primer año de seguimiento, un 95% ( $\pm 5$ ) de los pacientes con *MDM2*<sup>WT</sup> se mantuvieron sin recaer, disminuyendo esta cifra al 80% ( $\pm 9$ ) tras el

tercer año; por otro lado, un 50% ( $\pm 18$ ) de los pacientes con  $MDM2^{AMP}$  no recayeron durante el primer año, disminuyendo esta cifra al 38% ( $\pm 17$ ) al tercer año tras el diagnóstico (Figura 59B). El periodo medio de supervivencia sin tener recaídas fue de 107.1 (95% IC, 78.8-135.4) meses en el grupo de  $MDM2^{WT}$ , y de 21.8 (95% IC, 10.4-33.1) meses en los pacientes con  $MDM2^{AMP}$ .



**Figura 59. Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto al gen  $MDM2$ .** (A) Kaplan-Meier de la supervivencia específica de MLA y la (B) supervivencia libre de enfermedad respecto a la presencia/ausencia de amplificación en el gen  $MDM2$ . El análisis estadístico de la supervivencia entre los grupos fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

En lo referido a la amplificación en el oncogén  $CDK4$ , fue la amplificación oncogénica con la que mayor correlación obtuvimos respecto a las variables clinicopatológicas de nuestra cohorte (Figura 60). Los pacientes con  $CDK4^{WT}$  presentaron en su mayoría ( $p=0.010$ ) índices de Breslow inferiores a 3 mm (15/21) en relación a los pacientes  $CDK4^{AMP}$ , los cuales presentaron principalmente grosores iguales o superiores a 3 mm (9/12). Además, de forma significativa la mayoría de pacientes con  $CDK4^{AMP}$  se caracterizaron por presentar ulceración ( $p=0.009$ ; 11/12) e índices mitóticos superiores o iguales a 1 mitosis/ $mm^2$  ( $p=0.019$ ; 11/12). En cuanto al riesgo, los pacientes  $CDK4^{AMP}$  fueron clasificados principalmente ( $p=0.037$ ) en el grupo de riesgo alto/metástasis a distancia (10/12), por otro lado, los pacientes clasificados con tumores *in situ*/riesgo bajo (10/12) o de riesgo intermedio (3/3) fueron en su mayoría  $CDK4^{WT}$ .



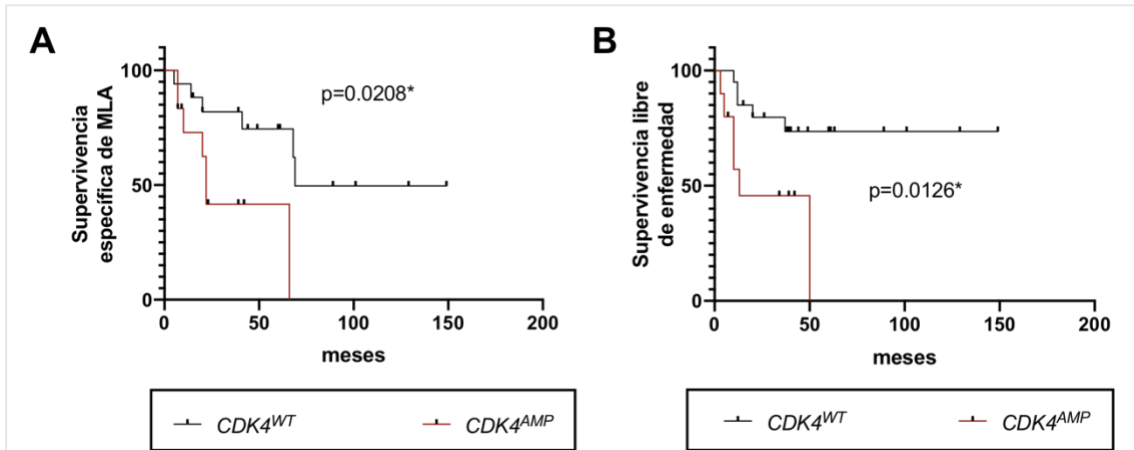
**Figura 60.** Gráficas representativas de las correlaciones entre las variables clinicopatológicas significativas respecto al gen *CDK4*. (A) Correlación del índice Breslow, (B) la ulceración, (C) el índice mitótico y (D) el riesgo asociado al estadio AJCC respecto a la presencia/ausencia de amplificación en el gen *CDK4*. El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher para las variables de 2x2 categorías, y Chi-cuadrado de Pearson para el resto (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

También se observaron diferencias significativas en la supervivencia específica de MLA ( $p=0.021$ ), en la que un 94% ( $\pm 6$ ) de los pacientes con *CDK4*<sup>WT</sup> sobrevivieron al cabo de un año de seguimiento, descendiendo a un 82% ( $\pm 10$ ) tras tres años; a diferencia del grupo con *CDK4*<sup>AMP</sup>, de los cuales sobrevivieron un 73% ( $\pm 16$ ) a lo largo del primer año y un 39% ( $\pm 10$ ) al tercer año de seguimiento (Figura 61A). La supervivencia específica de MLA media fue de 96.42 (95% IC, 64.9-127.9) meses en el grupo de *CDK4*<sup>WT</sup>, y de 36.4 (95% IC, 19.4-53.3) meses en los pacientes *CDK4*<sup>AMP</sup>.

En cuanto a la supervivencia libre de enfermedad (Figura 61B), un 95% ( $\pm 5$ ) de los pacientes *CDK4*<sup>WT</sup> se mantuvieron sin recaer durante el primer año, y un 79% ( $\pm 9$ ) al tercer año de seguimiento; por otro lado, un 58 ( $\pm 16$ ) del grupo *CDK4*<sup>AMP</sup> se mantuvo libre de recaídas durante el primer año, descendiendo a un 46% ( $\pm 16$ ) al tercer año tras el diagnóstico, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.0126$ ). La supervivencia libre de enfermedad

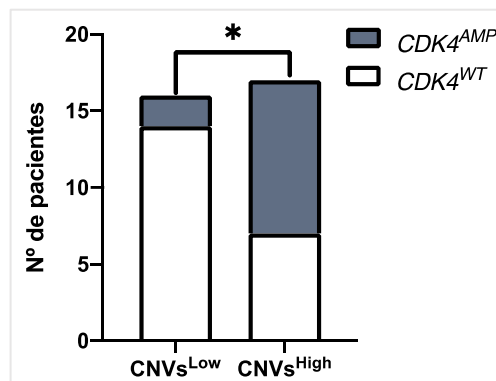


media fue de 114.6 (95% IC, 88.6-140.6) meses para los pacientes  $CDK4^{WT}$  y de 27.4 (95% IC, 12.6-42.3) meses para los pacientes  $CDK4^{AMP}$ .



**Figura 61. Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto al gen  $CDK4$ .** (A) Kaplan-Meier de la supervivencia específica de MLA y la (B) supervivencia libre de enfermedad respecto a la presencia/ausencia de amplificación en el gen  $CDK4$ . El análisis estadístico de la supervivencia entre los grupos fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

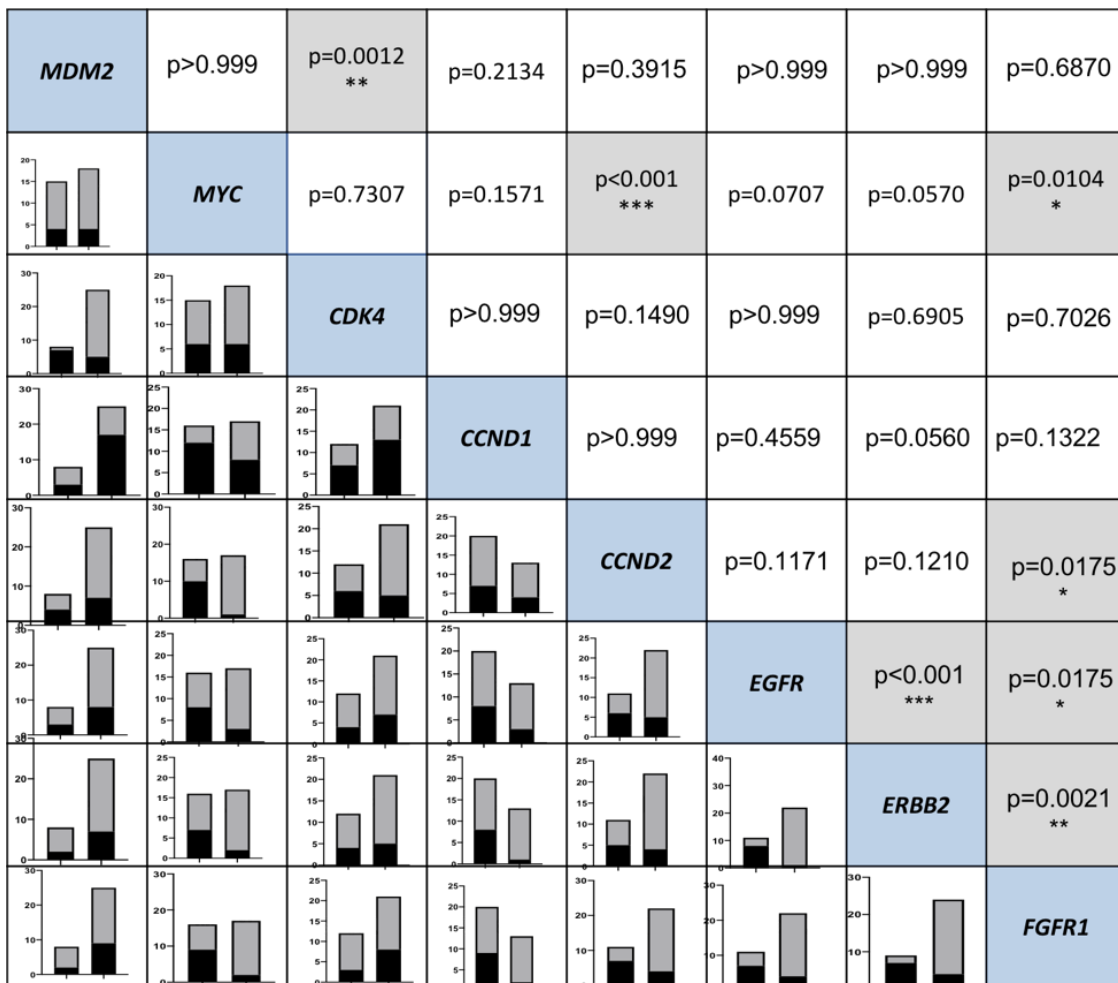
Tras observar paralelamente, por un lado, la correlación significativa entre la amplificación de  $CDK4$  con el pronóstico de los pacientes, y por otro lado la presentación de CNVs<sup>High</sup> (apartado anterior) también con dicho pronóstico, analizamos la relación entre el total de CNVs por paciente, y la presencia/ausencia de amplificación de  $CDK4$  (Figura 62). Observamos que, de forma significativa ( $p=0.010$ ) la mayoría de pacientes  $CDK4^{AMP}$  (10/12) pertenecían al grupo de CNVs<sup>High</sup>, y la mayoría de  $CDK4^{WT}$  (14/21) al grupo de CNVs<sup>Low</sup>. Además, observamos que, todos los pacientes con CNVs<sup>High</sup> que no presentaban amplificación en  $CDK4$ , tenían amplificado el gen  $CCND1$ , excepto uno que tenía amplificado el gen  $MDM2$ , estando ambos genes implicados junto con  $CDK4$  en la transición de fase G1 a S en el ciclo celular.



**Figura 62. Análisis de la correlación entre el total de CNVs por paciente y la presencia o ausencia de amplificación del gen  $CDK4$ .** El análisis estadístico realizado a partir de una tabla de contingencia fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher. (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

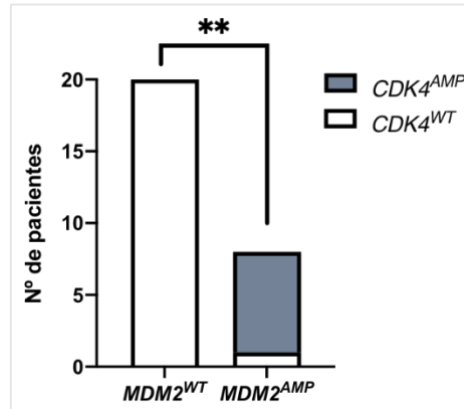
**1.1.4.3. Análisis de la relación entre la presencia conjunta de amplificaciones en los oncogenes con más ganancias de la cohorte**

Además de la relación de los oncogenes con mayor número de amplificaciones respecto a las características clinicopatológicas de los pacientes, se realizaron 64 correlaciones por pares entre la ausencia/presencia de amplificaciones de dichos oncogenes para analizar si existía algún patrón de amplificación conjunta. Las correlaciones se encuentran representadas junto a su p-valor correspondiente en la *Figura 63*.



**Figura 63. Matriz de correlación entre los oncogenes con mayor número de amplificaciones.** Representación de la relación entre los oncogenes con mayor número de amplificaciones (diagonal) junto con el p-valor (mitad diagonal superior) y la gráfica de correlación representativa correspondiente (mitad diagonal inferior). El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher. (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

Tras este análisis, nos centramos en la relación entre los genes *MDM2-CDK4*, ya que de ambos genes por separado obtuvimos diferencias significativas a nivel de supervivencia específica de MLA y de supervivencia libre de enfermedad al relacionarlo con la clínica de los pacientes (Figura 64). Observamos de forma significativa ( $p=0.0012$ ), que la mayoría de pacientes con *MDM2<sup>AMP</sup>* (7/8) tenían también el gen *CDK4<sup>AMP</sup>*.



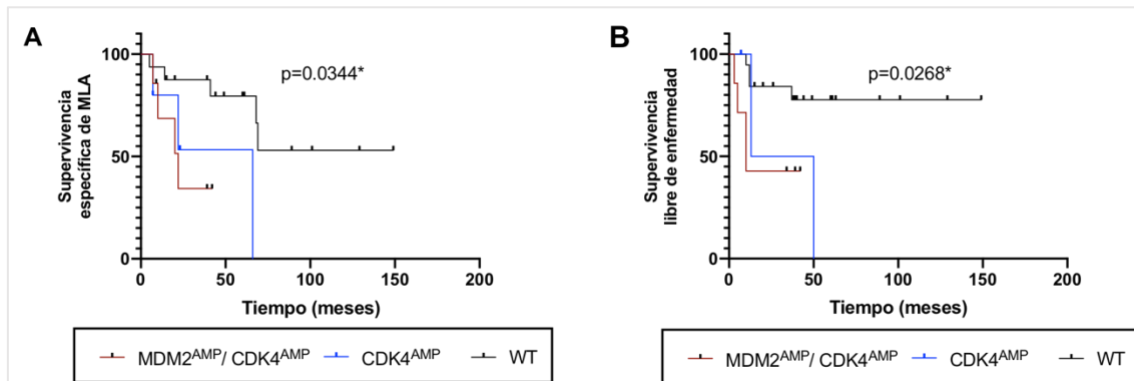
**Figura 64. Gráfica representativa de la relación entre la presencia de amplificación en el gen MDM2 y en CDK4.** Relación entre la presencia de amplificación en el gen MDM2 respecto a la presencia de amplificación en el gen CDK4. El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher. (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

A partir de estos resultados, dividimos a los pacientes en tres grupos, un grupo con ambos genes amplificados (*MDM2<sup>AMP</sup>-CDK4<sup>AMP</sup>*), otro grupo con solo (*CDK4<sup>AMP</sup>*) y un último grupo con ninguno de los genes amplificados (*MDM2<sup>WT</sup>-CDK4<sup>WT</sup>*) para así evaluar cómo afectaba la amplificación conjunta a la supervivencia específica de MLA y a la supervivencia libre de enfermedad. Como dato, hubo un paciente con solo *MDM2<sup>AMP</sup>*, que fue descartado del análisis (Figura 65).

En la supervivencia específica de MLA ( $p=0.0344$ ), un 94% ( $\pm 6$ ) de los pacientes *MDM2<sup>WT</sup>-CDK4<sup>WT</sup>*, un 78% ( $\pm 20$ ) de los *CDK4<sup>AMP</sup>* y un 71% ( $\pm 17$ ) de los *MDM2<sup>AMP</sup>-CDK4<sup>AMP</sup>* sobrevivieron durante el primer año, descendiendo a un 88% ( $\pm 8$ ), un 47% ( $\pm 27$ ) y un 43% ( $\pm 19$ ), respectivamente, a los tres años de seguimiento. La supervivencia específica de MLA media fue de 101.6 (95% IC, 69.1-133.6) meses para el grupo *MDM2<sup>WT</sup>-CDK4<sup>WT</sup>*, de 42.5(95% IC, 23.6-72.3) meses para los *CDK4<sup>AMP</sup>* y de 24.3(95% IC, 13.4-35.2) meses para los *MDM2<sup>AMP</sup>-CDK4<sup>AMP</sup>*.

En cuanto a la supervivencia libre de enfermedad ( $p=0.0268$ ), un 95% ( $\pm 5$ ) de los pacientes *MDM2<sup>WT</sup>-CDK4<sup>WT</sup>*, un 100% ( $\pm 0$ ) de los *CDK4<sup>AMP</sup>* y un 43% ( $\pm 19$ ) de los *MDM2<sup>AMP</sup>-CDK4<sup>AMP</sup>* se mantuvieron sin recaídas durante el primer año, descendiendo a un 84% ( $\pm 9$ ), a un 50% ( $\pm 35$ ) y manteniéndose 43% ( $\pm 19$ ), respectivamente, a los tres años de seguimiento. La supervivencia libre de enfermedad media fue de 120.0 (95% IC, 94.8-145.2) meses para el grupo *MDM2<sup>WT</sup>-*

$CDK4^{WT}$ , de 31.5(95% IC, 0.0-67.7) meses para los  $CDK4^{AMP}$  y de 22.0 (95% IC, 9.1-35.0) meses para los  $MDM2^{AMP}-CDK4^{AMP}$ .



**Figura 65. Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a la combinación de la amplificación de MDM2 y CDK4.** (A) Kaplan-Meier de la supervivencia específica de MLA y la (B) supervivencia libre de enfermedad respecto a los grupos de pacientes con *MDM2* y *CDK4* amplificados, con solo *CDK4* amplificados, y con ambos genes sin amplificar. El análisis estadístico de la supervivencia entre los grupos fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

## 1.2. ESTUDIO DEL PERFIL GENÉTICO EN LÍNEAS CELULARES DE MLA

### 1.2.1. Estudio de la dosis génica oncogénica en líneas celulares de MLA

La dosis génica de oncogenes y la mutación *BRAF*<sup>V600E</sup> se estudió en ocho líneas celulares humanas de MLA mediante la técnica MLPA, de la misma forma que en las biopsias de la cohorte de pacientes.

A partir de los resultados obtenidos mediante MLPA, observamos que un 87.5% (7/8) de las líneas estudiadas presentaron algún tipo de alteración (amplificación/delección) en al menos un gen del total de oncogenes estudiados (Figura 66). Respecto al total de CNVs encontradas en todas las líneas, un 87.5% fueron ganancias, y un 12.5% pérdidas. La mediana de alteraciones encontradas por línea fue de 7, con un mínimo de 0 y un máximo de 15 alteraciones.

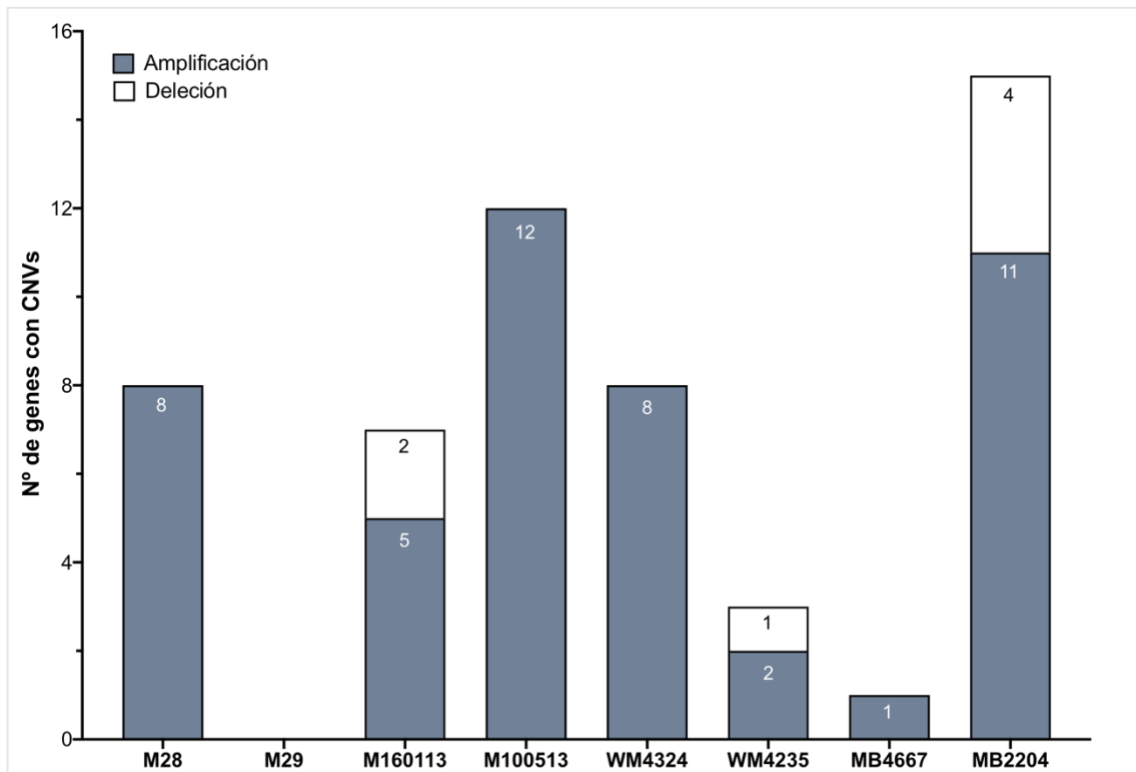


Figura 66. Gráfica del número de oncogenes alterados (amplificaciones y/o deleciones) por línea celular de MLA tras el análisis de la dosis génica mediante MLPA.

El 91.6% (22/24) de oncogenes presentaron algún tipo de alteración entre el total de las líneas, ya fuese a nivel de ganancia o pérdida (Figura 67). Las amplificaciones fueron predominantes en el total de genes estudiados, siendo el gen más amplificado *BRAF* (50.0%), seguido de *SMO* (50.0%), *MDM2* (37.5%), *CCND1* (37.5%), *EGFR* (37.5%), *AURKA* (37.5%), *CDK4* (37.5%) y *CCND2* (37.5%). Las deleciones fueron minoritarias en las líneas celulares, ocurriendo solo en 7 de los oncogenes estudiados, los cuales fueron *RET* (12.5%), *KDR* (12.5%), *KIT* (12.5%), *PDGFRA* (12.5%), *ABL 1* (12.5%), *AURKB* (12.5%) y *DHFR* (12.5%). En cuanto a la mutación *BRAF*<sup>V600E</sup>, fue detectada en un 12.5% de las líneas celulares.

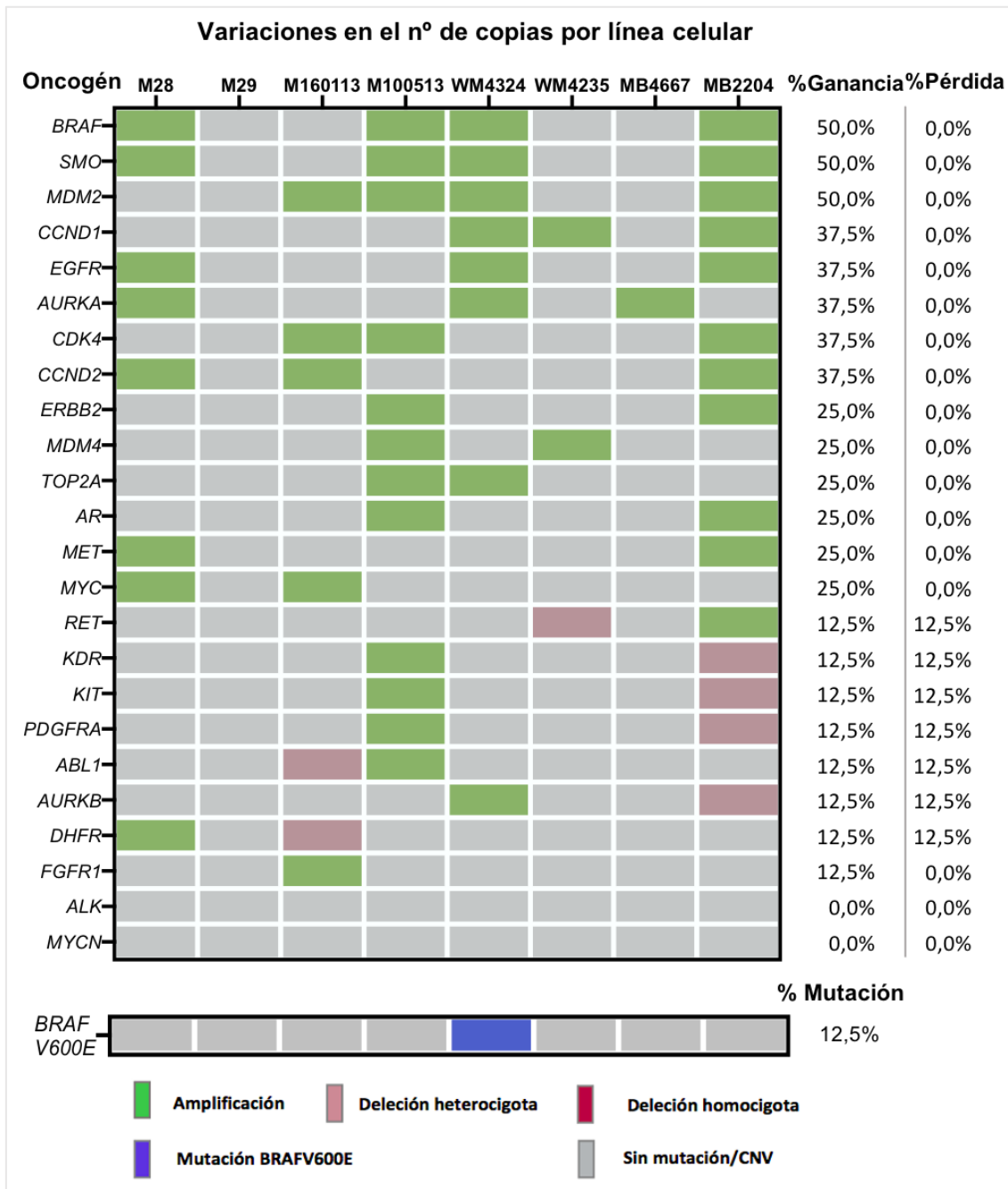
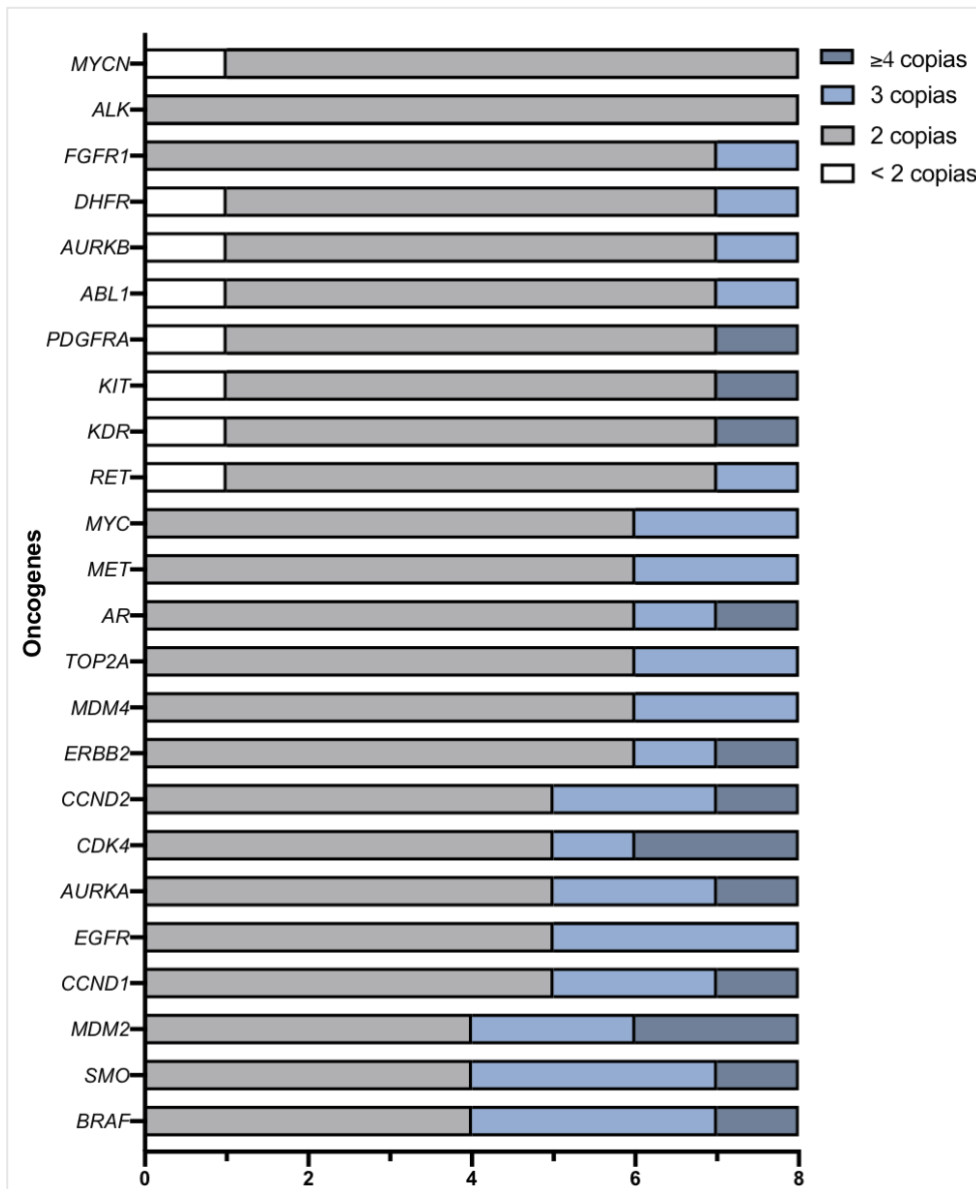


Figura 67. Heatmap de las CNVs detectadas por línea celular en los oncogenes analizados mediante MLPA. El heatmap muestra la detección de ganancias y/o pérdidas en los genes estudiados (filas) por línea celular (columnas), así como de la mutación *BRAF<sup>V600E</sup>* (abajo). Los genes se encuentran ordenados en orden decreciente según el porcentaje de ganancia o amplificación (derecha).

Además de la ausencia o presencia de amplificación por oncogenes, calculamos el número de copias en los que variaba la dosis génica (Figura 68). Al igual que en la cohorte de pacientes la técnica nos permitió detectar si los pacientes no tenían ninguna copia del gen (delección homocigota), 1 copia (delección heterocigota), 2 copias (diploides), 3 copias del gen (ganancia de 1 copia), o si tenían un número igual o superior a 4 copias (ganancia de 2 o más copias) del gen.



**Figura 68.** Gráfica representativa del número de copias detectado de cada oncogén estudiado en las líneas celulares de MLA mediante MLPA. Las líneas celulares se encuentran agrupadas según el número de copias en los grupos: <math>< 2</math> copias (delección), 2 copias (diploide), 3 copias (ganancia de 1 copia) y <math>\geq 4</math> copias.

Del total de amplificaciones detectadas, éstas fueron en su mayoría de 3 copias del gen (70.2% del total de amplificaciones), y en menor medida de <math>\geq 4</math> copias (29.8%). Los genes que presentaron una mayor frecuencia de la categoría de <math>\geq 4</math> copias fueron los genes *CDK4* (25% del total de pacientes) y *MDM2* (25%).

### 1.2.2. **Caracterización de la migración, invasión y proliferación de las líneas celulares de MLA en función de su perfil genético**

La caracterización *in vitro* se realizó a partir de los resultados obtenidos del análisis genético de la cohorte de pacientes en comparación con sus correspondientes características clinicopatológicas, en el cual obtuvimos que los pacientes con CNVs<sup>High</sup> y con *CDK4*<sup>AMP</sup> presentaban un peor pronóstico que los pacientes CNVs<sup>Low</sup> y *CDK4*<sup>WT</sup> respectivamente. Por lo tanto, en función de los resultados del MLPA de las líneas, éstas fueron clasificadas según el total de CNVs, y según la ausencia o presencia de amplificación en el gen *CDK4*.

Por un lado, las líneas celulares se clasificaron en dos grupos según el total de CNVs/línea. Las líneas con  $\leq 5$  CNVs fueron categorizadas como líneas con CNVs<sup>Low</sup>, y las líneas celulares con valores  $>5$  CNVs como líneas con CNVs<sup>High</sup>, según lo establecido en el análisis de la cohorte de pacientes en el apartado 1.1.4.1. Las líneas con CNVs<sup>Low</sup> fueron la línea celular M29, WM4235 y MB4667; y las líneas con CNVs<sup>High</sup> fueron M28, M160113, M100513, WM4324 y MB2204. Por otro lado, las líneas también se agruparon según la ausencia/presencia de amplificación del gen *CDK4*, siendo las líneas con amplificación en dicho gen, la línea M160113, M100513 y MB2204.

En general, el mantenimiento de las células en cultivo fue complejo, ya que la mayoría de ellas acabaron muriendo al cabo de un bajo número de pases (M29, WM4324, MB4667 y MB2204), o, en el caso de las líneas derivadas de tumores primarios (M160113 y M100513), se dio un sobrecrecimiento paralelo de fibroblastos que les impidió proliferar de forma normal. Las únicas líneas que logramos mantener fueron la línea celular M28 (CNVs<sup>High</sup>- *CDK4*<sup>WT</sup>) y la línea celular WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>- *CDK4*<sup>WT</sup>). Aunque el lento crecimiento de ésta última, y su sensibilidad ante cualquier cambio en las condiciones ambientales, imposibilitó realizar la mayoría de ensayos *in vitro*. Por lo tanto, los resultados de este apartado se centrarán en la línea celular M28.

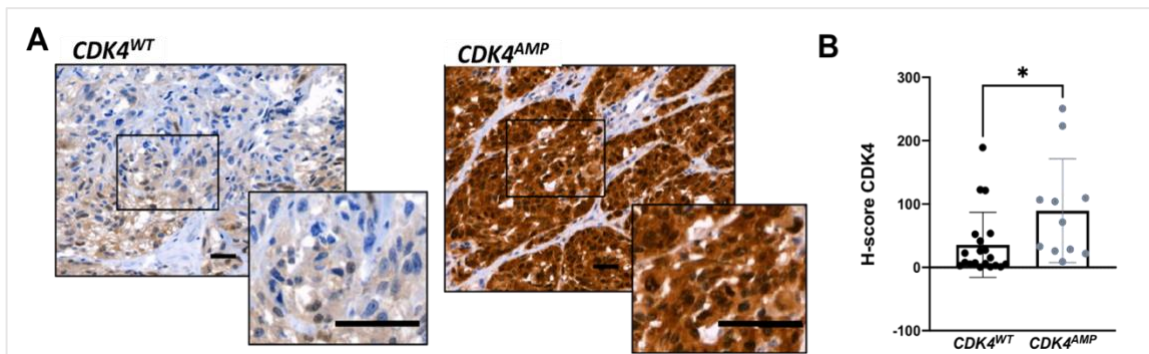
#### 1.2.2.1. **Estudio de la migración, invasión y proliferación en función de la expresión de CDK4**

La caracterización de las líneas celulares en función de la amplificación del gen *CDK4*, se vio dificultada ante la imposibilidad de mantener alguna línea con dicha amplificación. Para generar un modelo *in vitro* que se asemejase a lo que ocurría en los tumores de los pacientes, decidimos sobreexpresar *CDK4* en la línea celular M28. De forma previa a la sobreexpresión del gen en nuestra línea, comprobamos mediante tinción inmunohistoquímica si la presencia de



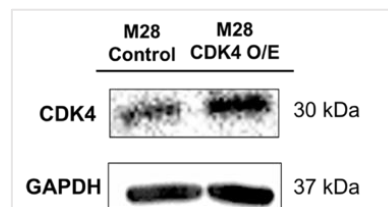
amplificación de *CDK4* correlacionaba con el incremento de la expresión del mismo en las biopsias de los pacientes.

Los valores de H-score obtenidos tras el análisis inmunohistoquímico de la expresión de *CDK4* se separaron en dos grupos según la ausencia o presencia de la amplificación en el gen, cuyas medias fueron comparadas entre sí (Figura 69). Obtuvimos que el grupo de pacientes con *CDK4<sup>AMP</sup>* presentaban de forma significativa un mayor H-score, es decir, una mayor expresión del gen respecto al grupo con *CDK4<sup>WT</sup>*.



**Figura 69. Análisis de la expresión de *CDK4* respecto a la presencia de amplificación del mismo en el tumor.** (A) Imágenes representativas de la detección de la expresión de *CDK4* mediante tinciones inmunohistoquímicas (DAB) en secciones seriadas de las biopsias de MLA, según la ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de amplificación del gen *CDK4*. Barra de escala: 100  $\mu$ m (B) Gráfica representativa del H-score obtenido del análisis inmunohistoquímico de *CDK4* respecto a los grupos de pacientes con *CDK4<sup>WT</sup>* o *CDK4<sup>AMP</sup>*. El análisis estadístico de las medias de grupos independientes fue realizado mediante T-test no pareado (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

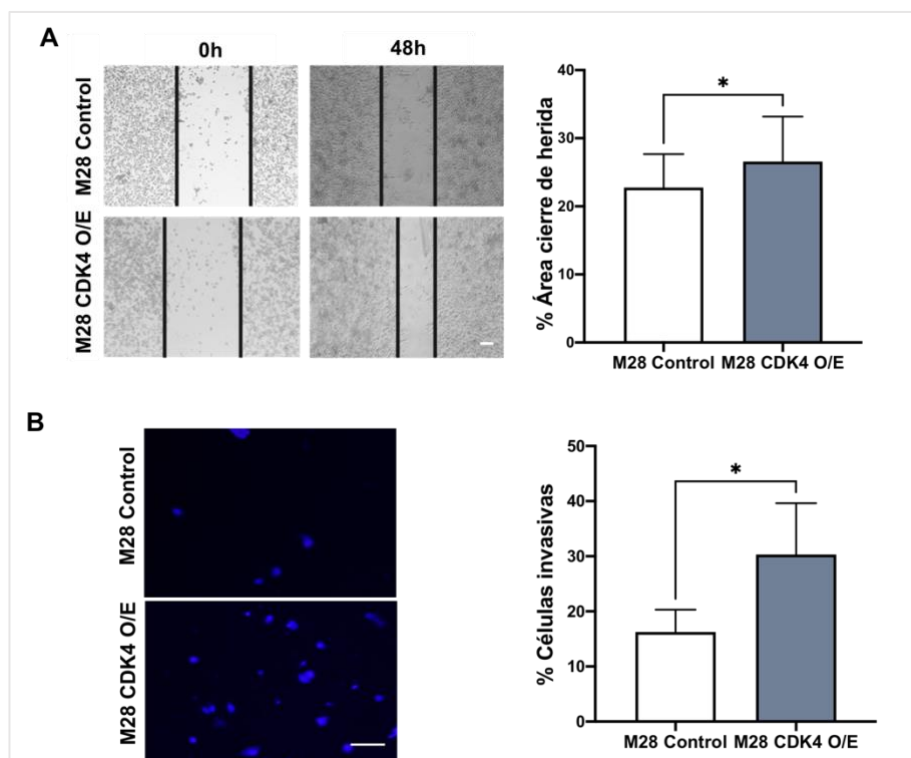
Por lo tanto, a partir de este resultado, decidimos sobreexpresar *CDK4* en la línea celular M28 mediante un vector lentiviral de sobreexpresión (pLOC) para *CDK4*. Asimismo, se utilizó el mismo vector lentiviral vacío, como control de la infección. En primer lugar, tras la estabilización de la infección, comprobamos mediante Western Blot si las células sobreexpresaban *CDK4* (M28 *CDK4* O/E) en comparación con el control (M28 Control) para evaluar la eficiencia de la infección (Figura 70). Tras el experimento, observamos que en la línea M28 *CDK4* O/E se producía un incremento de los niveles de expresión de *CDK4* respecto a la línea M28 Control.



**Figura 70. Análisis de la expresión de *CDK4* en la línea celular M28 Control y M28 *CDK4* O/E.** Imágenes representativas del análisis mediante Western Blot del nivel de expresión de *CDK4* (30 kDa) en la línea M28 infectada con el vector de sobreexpresión para *CDK4* (M28 *CDK4* O/E), respecto a la misma línea infectada con el vector vacío (M28 Control). La proteína GAPDH (37 kDa) fue utilizada como control de carga del Western Blot.

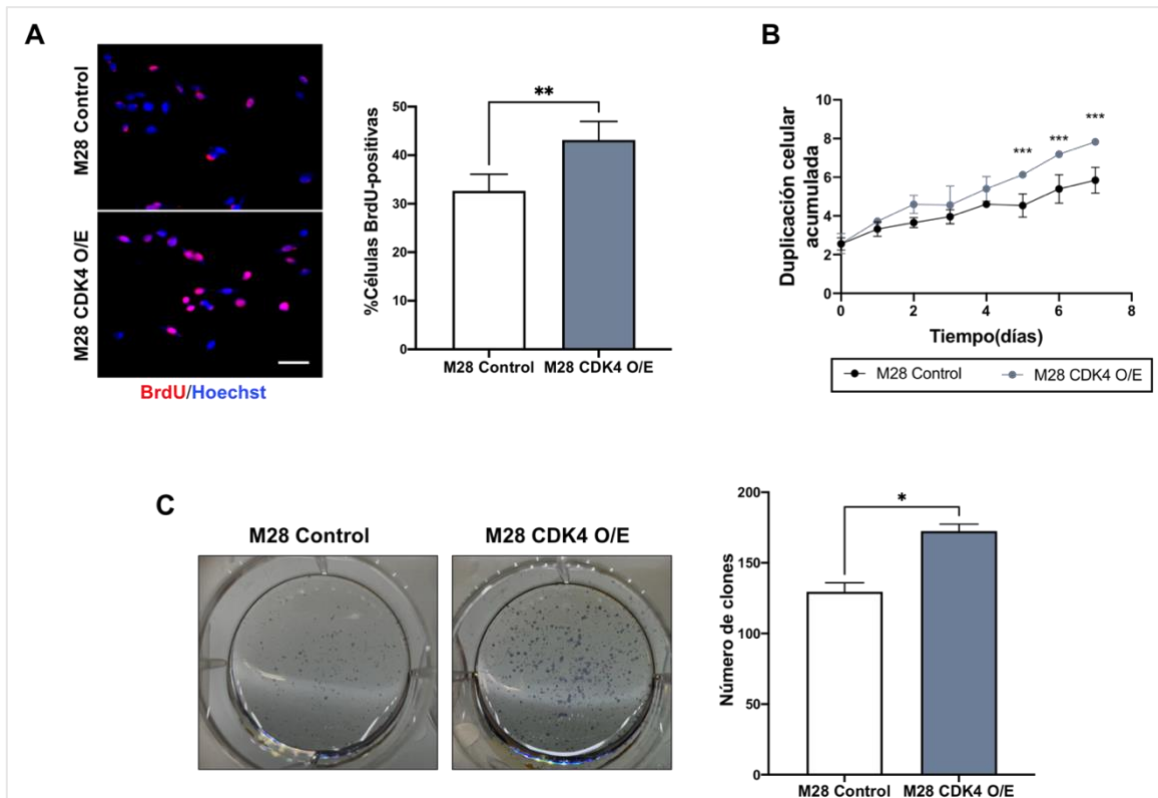
Tras corroborar el incremento de la expresión de CDK4 en la línea infectada con el vector de sobreexpresión, realizamos ensayos de migración, invasión y proliferación para caracterizar nuestro modelo.

En primer lugar, evaluamos el efecto de la sobreexpresión de CDK4 a nivel de migración e invasión en nuestras células de MLA. En el ensayo de migración *Wound Healing*, se observó un incremento significativo ( $p=0.0489$ ) de la migración celular con la sobreexpresión de CDK4. A este incremento de las capacidades migratorias por parte de la línea M28 CDK4 O/E, se sumó un aumento significativo ( $p=0.0148$ ) de las capacidades invasivas de la línea, analizado mediante ensayos de invasión de *Transwell* (Figura 71).



**Figura 71. Análisis de la migración e invasión del modelo *in vitro* de MLA según la expresión de CDK4.** (A) Imágenes representativas (izquierda) del ensayo de migración de *Wound Healing* a tiempo 0 y tras 48 horas de ensayo en las líneas M28 Control y CDK4 O/E, junto con la cuantificación del porcentaje del área de cierre de herida (derecha). Barra de escala: 100  $\mu$ m. (C) Imágenes representativas de la tinción nuclear con Hoechst (izquierda) del ensayo de invasión de *Transwell* en las líneas M28 Control y CDK4 O/E, junto con la cuantificación de células invasivas (derecha) tras 24 horas de ensayo. Barra de escala: 25  $\mu$ m. El análisis estadístico fue realizado mediante T-test no pareado (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

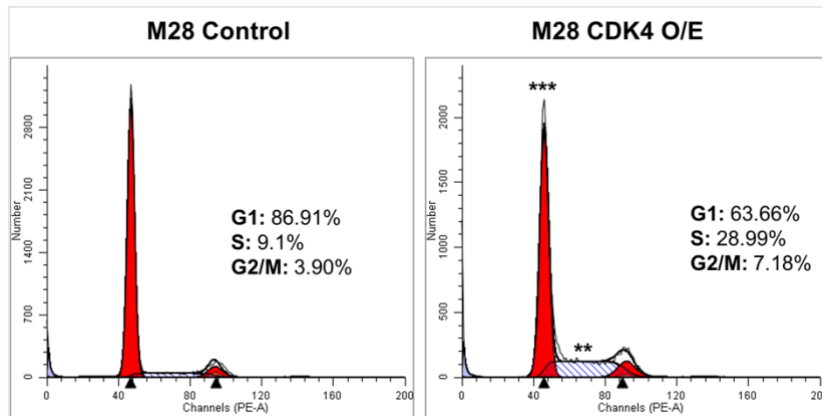
Posteriormente, procedimos a evaluar el efecto a nivel proliferativo de la sobreexpresión de CDK4 en nuestro modelo *in vitro*. En el ensayo de incorporación de BrdU, observamos una modificación al alza de la proliferación ( $p=0.0066$ ) de la línea M28 CDK4 O/E, dándose un incremento del porcentaje de células BrdU-positivas respecto al control (Figura 72A). Asimismo, la línea con CDK4 sobreexpresado mostró un aumento significativo ( $p<0.001$ ) de la ratio de proliferación a partir del quinto día del ensayo de duplicación celular acumulada (Figura 72B). Por otro lado, observamos una capacidad clonogénica significativamente superior ( $p=0.0171$ ) en la línea M28 CDK4 O/E respecto al control, tras doce días de ensayo (Figura 72C).



**Figura 72. Análisis de la proliferación del modelo *in vitro* de MLA según la expresión de CDK4.** (A) Imágenes representativas (izquierda) de los núcleos celulares teñidos con Hoechst (azul) y de las células positivas para BrdU (rojo) en las líneas M28 Control y CDK4 O/E, junto con la cuantificación del porcentaje de células BrdU-positivas (derecha). Barra de escala: 25 $\mu$ m. (B) Curva de la duplicación celular acumulada de las líneas M28 Control y CDK4 O/E. (C) Imágenes representativas del ensayo clonogénico de las líneas M28 Control y CDK4 O/E, junto con la cuantificación del número de clones tras doce días de ensayo. El análisis estadístico fue realizado mediante T-test no pareado (A y C), y mediante Two-way ANOVA (B), seguido de una prueba post-hoc de Bonferroni (\* $p$ -valor $<0.05$ ; \*\* $p$ -valor $<0.01$ ; \*\*\* $p$ -valor $<0.001$ ).

Finalmente, se realizó un análisis mediante citometría de flujo del perfil del ciclo celular de la línea M28 CDK4 O/E respecto al control, a través de la tinción de las células con yoduro de propidio (PI) (Figura 73). De esta forma, evaluamos si la sobreexpresión de CDK4 daba lugar a un incremento de la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Los resultados mostraron de forma significativa un aumento de la transición de fase G1 a S en la línea M28 CDK4 O/E,

observando un menor recuento de células en fase G1 ( $p < 0.001$ ) y un incremento de células en fase S ( $p = 0.002$ ), respecto al control. No se observaron diferencias significativas entre las fases G2/M de ambas líneas.



**Figura 73. Análisis del perfil del ciclo celular en el modelo in vitro de MLA según la expresión de CDK4.** Gráfica representativa de la distribución de las células en las distintas fases del ciclo celular en la línea infectada M28 Control (vector vacío) y M28 CDK4 O/E (vector de sobreexpresión lentiviral para CDK4). El análisis estadístico fue realizado mediante Two-way ANOVA, seguido de una prueba post-hoc de Bonferroni (\* $p$ -valor $<0.05$ ; \*\* $p$ -valor $<0.01$ ; \*\*\* $p$ -valor $<0.001$ ).

## 2. ESTUDIO DEL SECRETOMA Y DEL MICROAMBIENTE TUMORAL EN EL MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL

---

A lo largo del presente trabajo, hemos llevado a término la caracterización del perfil genético del MLA, así como de la expresión de diferentes marcadores relevantes para el proceso tumoral. En el primer apartado de este trabajo, presentamos los resultados acerca de la caracterización del perfil genético del MLA, y su relación con las características clinicopatológicas y con el pronóstico de nuestra cohorte de pacientes, observando un peor pronóstico en los pacientes que tenían un alto número de CNVs, y también en aquellos que presentaban amplificación en el gen *CDK4*. A nivel *in vitro*, tuvimos muchas dificultades en el mantenimiento de las líneas de MLA, lo que nos llevó a pensar, que las células de este tumor podrían ser altamente dependientes del TME. A partir de estos resultados, decidimos proseguir con la caracterización del MLA, mediante la evaluación de las implicaciones del perfil genético de este tumor en el TME y en el secretoma del mismo

El TME es esencial en el proceso tumoral, ya que proporciona un soporte que favorece el crecimiento y supervivencia del tumor, la invasión local y la diseminación del tumor hacia otros tejidos. Por lo que, la caracterización del microambiente tumoral y del secretoma en el MLA podría proporcionar biomarcadores útiles para la mejora del diagnóstico y pronóstico de los pacientes, para su uso como dianas terapéuticas, así como para la monitorización de las respuestas ante los tratamientos<sup>96,97</sup>.

### 2.1. ESTUDIO DEL SECRETOMA Y DEL TME EN LÍNEAS CELULARES DE MLA

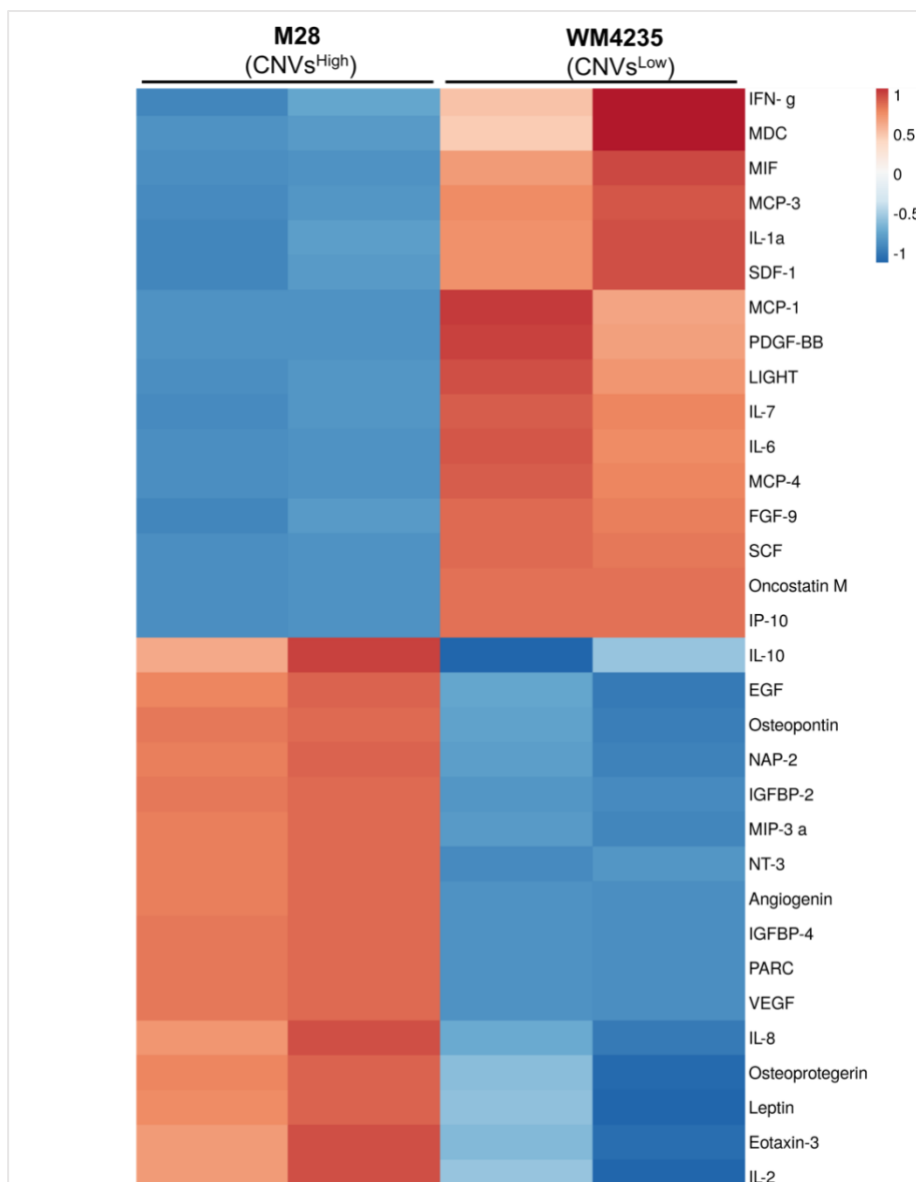
#### 2.1.1. *Análisis del secretoma de las líneas celulares de MLA según su perfil genético*

Los factores solubles secretados al TME (citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento) por parte de los componentes celulares del mismo, son una fuente importante de marcadores y reguladores clave en el proceso tumorigénico. El secretoma abarca todos estos factores, los cuales pueden promover un entorno antitumoral o protumoral, dependiendo de las funciones que lleven a término<sup>98,99</sup>.

Dados los resultados obtenidos hasta el momento, decidimos estudiar el secretoma de las líneas celulares de MLA, por un lado, según el total de CNVs (M28 vs WM4235) y, por otro lado, según la sobreexpresión de *CDK4* (M28 control vs M28 *CDK4* O/E). Para el estudio del secretoma,

utilizamos un array de detección de citoquinas con el que analizamos de forma simultánea un total de 80 factores solubles en los medios condicionados (MC) procedentes de las líneas celulares de MLA. A partir de las detecciones obtenidas tras escanear el array, seleccionamos solo aquellos factores de los que obtuvimos señal para realizar un análisis preliminar.

En este análisis preliminar, por un lado, comparamos las intensidades de detección por citoquina entre la línea M28 (CNVs<sup>High</sup>) y WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>), obteniendo diferencias significativas (T-test no apareado) en cuanto a secreción en un total de 32 citoquinas (*Tabla Anexa 4*), las cuales utilizamos para realizar el análisis principal (*Figura 74*).

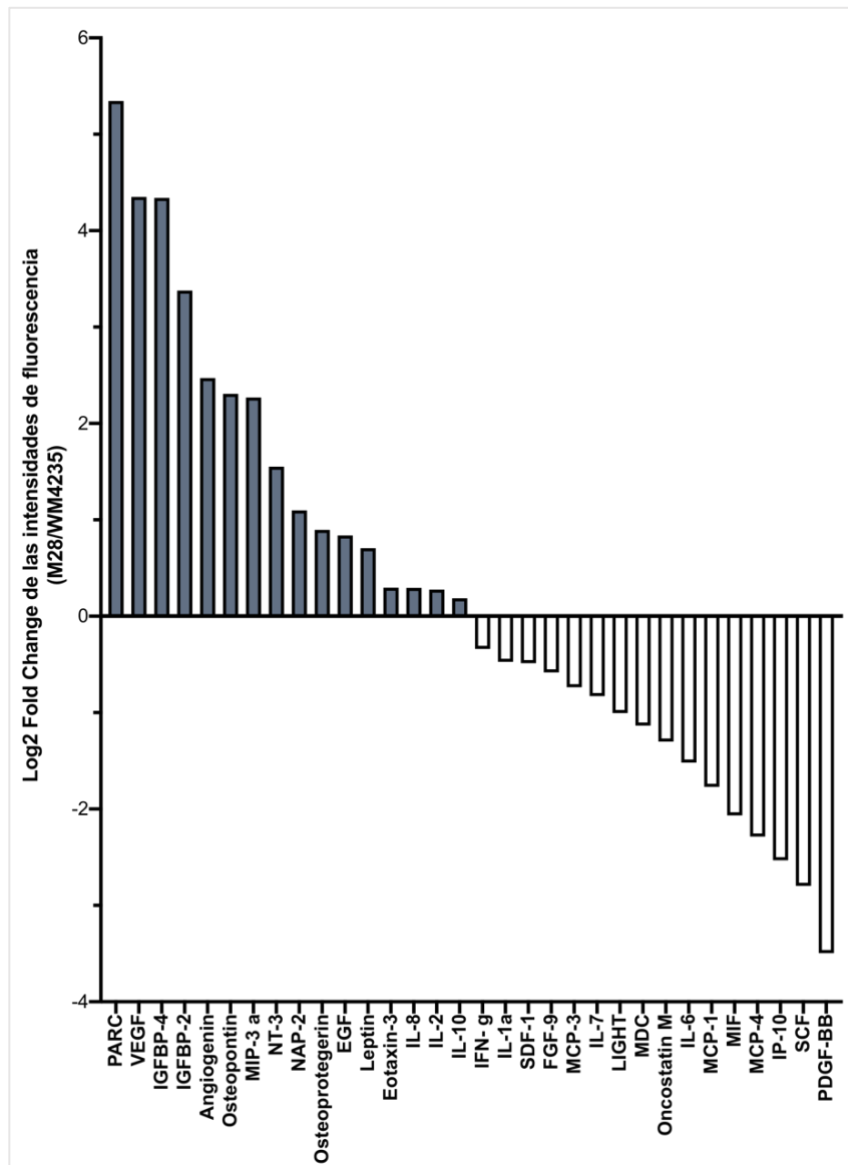


**Figura 74. Representación del perfil de secreción de los factores solubles significativos según el total de CNVs.** Heatmap de los valores de secreción normalizados (Z-score) que resultaron significativos tras el análisis del array de detección de citoquinas. El array fue realizado con MCs de la línea celular M28 (CNVs<sup>High</sup>) y WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>).

En cuanto a las diferencias obtenidas en los MCs de la línea M28 control y M28 CDK4 O/E, observamos un perfil de secreción similar entre ambas, con una sola citoquina significativa, GM-CSF (*Tabla Anexa 5*). En base a estos resultados, decidimos proseguir nuestros análisis enfocados solo en el análisis del secretoma según el perfil genético basado en el total de CNVs.

A continuación, para evaluar las diferencias de secreción entre la línea con CNVs<sup>High</sup> y CNVs<sup>Low</sup>, calculamos el fold-change (FC) a partir de las intensidades obtenidas de la línea M28 respecto a la línea WM4235 (M28/WM4235). Para optimizar la representación de los resultados y su interpretación, calculamos el  $\log_2$  FC, de forma que un FC de 1 (no hay diferencias de secreción) corresponderá a un  $\log_2$  fold-change de 0, de la misma forma un FC de 2 (doble de secreción respecto a WM4235) corresponderá a un  $\log_2$  fold-change de 1 y un FC de 0.5 (mitad de secreción respecto a WM4235) a un  $\log_2$  FC de -1.

Tal y como podemos observar en la *Figura 75*, el factor soluble con mayor variación entre líneas fue la quimioquina protumoral PARC (CCL18), cuyo fold-change (FC=40.7) se vio incrementado en la línea CNVs<sup>High</sup> respecto de la línea CNVs<sup>Low</sup>. Esta quimioquina está implicada en la polarización de macrófagos a fenotipo M2, así como en la invasión, migración y en la estimulación de angiogénesis<sup>125</sup>. Este factor fue seguido de VEGF, también incrementado en la línea de CNVs<sup>High</sup>, un factor proangiogénico clave, el cual estimula el crecimiento de las células endoteliales e incrementa la permeabilidad vascular promoviendo la migración e invasión por parte de las células tumorales<sup>126</sup>.



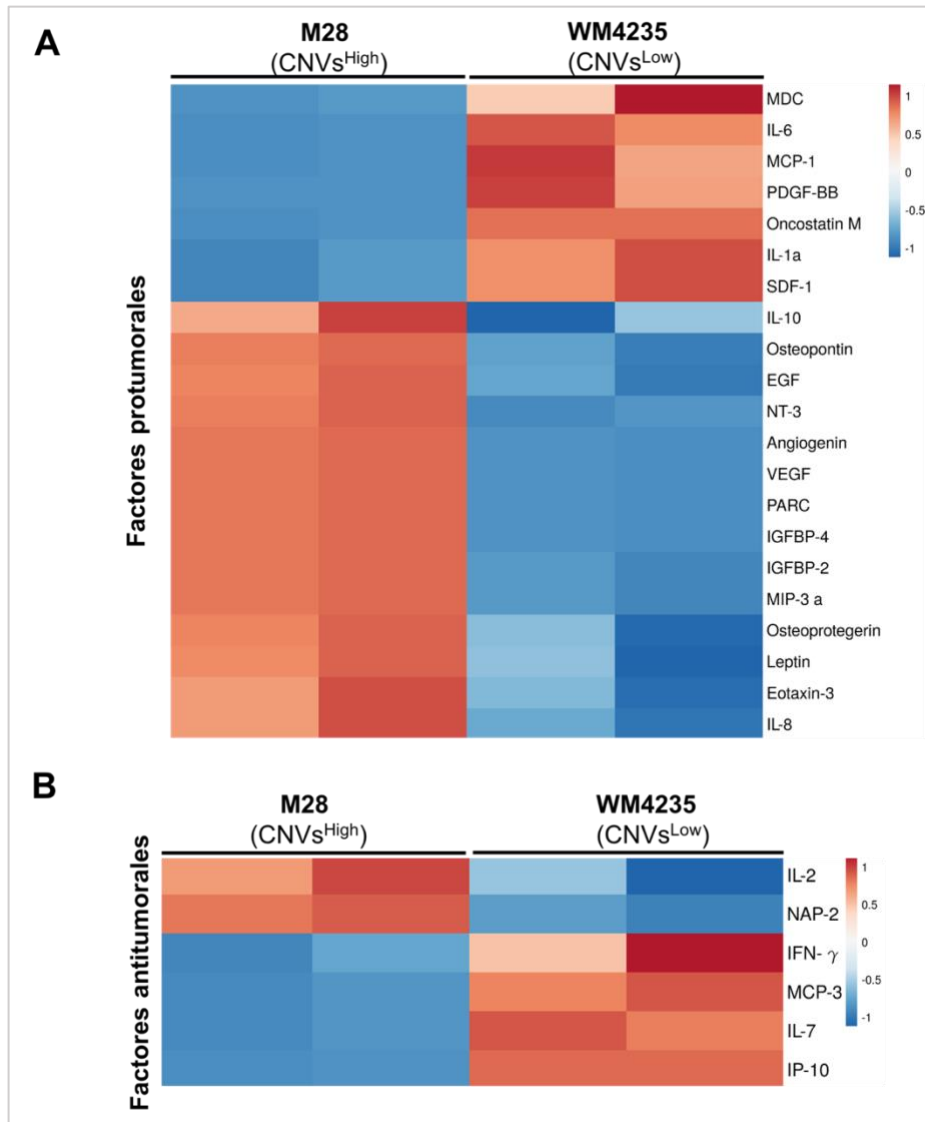
**Figura 75.** Representación gráfica de la variación del perfil de secreción según el total de CNVs. Gráfica del  $\log_2$  fold-change de las líneas M28 (CNVs<sup>High</sup>) respecto a las WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>). Los factores solubles cuya secreción se vio incrementada en la línea M28 respecto a la WM4235, se encuentran representados por encima de 0 (azul), y los que se encuentran incrementados en la línea WM4235 respecto a la M28 se encuentran representados por debajo de este número (blanco).

Posteriormente, a partir de estos resultados generales, podríamos intuir que la línea con CNVs<sup>High</sup> tiene un perfil más protumoral que la línea con CNVs<sup>Low</sup>. En primer lugar, para profundizar en este aspecto, agrupamos las citoquinas que resultaron significativas, e hicimos dos subgrupos según el papel protumoral o antitumoral que tenían en cuanto a la modulación del TME (Figura 76)<sup>125–137</sup>.

Observamos que, la línea M28 presentaba un perfil más protumoral que la línea WM4235, ya que la secreción de la mayoría de citoquinas agrupadas como protumorales (14/21) se vio



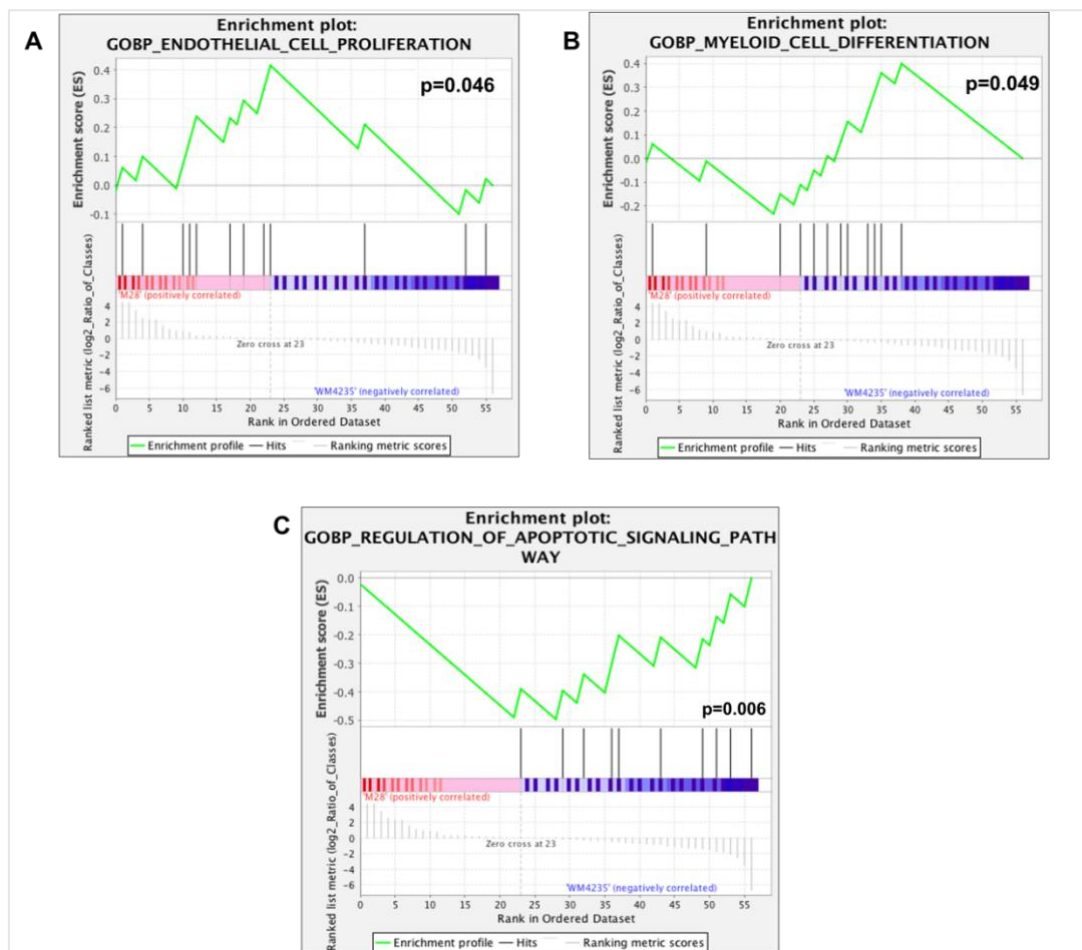
incrementada en la línea con CNVs<sup>High</sup>, sin embargo, la línea WM4235, presentó un perfil más antitumoral que la línea M28, pues la mayoría de factores de este grupo (4/6) estuvieron incrementados en la línea con CNVs<sup>Low</sup>.



**Figura 76. Representación del perfil de secreción según su papel en el TME.** Heatmaps de los valores de secreción normalizados (Z-score) de la línea celular M28 (CNVs<sup>High</sup>) y WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>) según el papel protumoral (A) o (B) antitumoral en el TME, de los factores solubles analizados.

Para profundizar en los procesos biológicos en los que estaban involucrados los factores solubles que diferían entre las líneas, se realizó un GSEA a partir de los valores de secreción significativos obtenidos del array de citoquinas (Figura 77). El perfil de secreción de ambas líneas se comparó con el conjunto de genes pertenecientes a la categoría de ontología de genes de procesos biológicos (GO Biological Process Ontology; GO\_BP).

Los resultados significativos del análisis mostraron que, el perfil de secreción de la línea celular M28 (CNVs<sup>High</sup>) se encontraba directamente correlacionada con conjuntos de genes de proliferación endotelial (*GOBP\_Endothelial\_Cell\_Proliferation*,  $p=0.046$ ) y de diferenciación de células mieloides (*GOBP\_Myeloid\_Cell\_Diferentiation*,  $p=0.049$ ), a diferencia de la línea celular WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>) que se encontraba inversamente correlacionada con estos procesos biológicos. Por otro lado, la línea WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>) se correlacionó directamente con conjuntos de genes de regulación de la apoptosis (*GOBP\_Regulation\_of\_Apoptotic\_Signaling\_Pathway*), a diferencia de la línea M28 que se correlacionó inversamente (CNVs<sup>High</sup>).

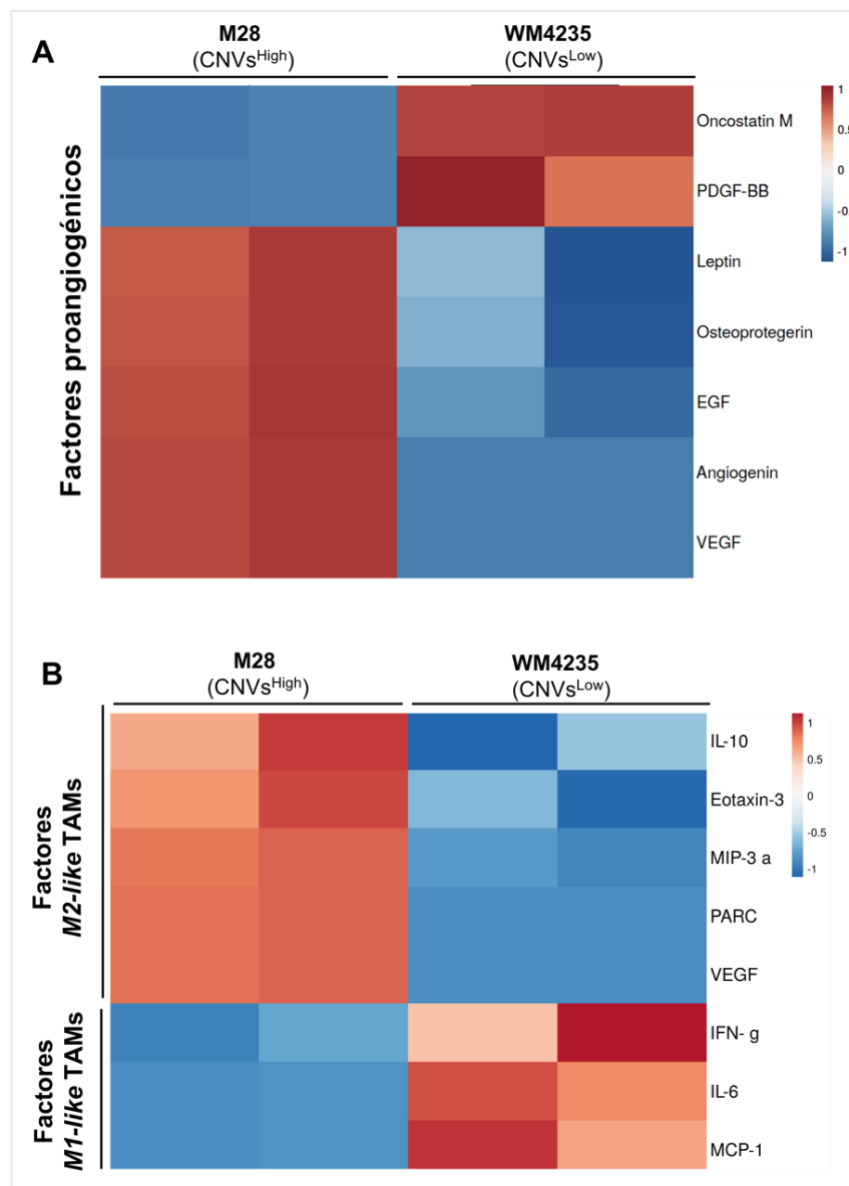


**Figura 77. Análisis específico de enriquecimiento de conjunto de genes (GSEA) del perfil de secreción según el total de CNVs.** Gráficas significativas del GSEA del perfil de secreción en cuanto al conjunto de genes de (A) proliferación endotelial, de (B) diferenciación mieloides y de (C) regulación de la vía de señalización de apoptosis en las líneas M28 (CNVs<sup>High</sup>) y WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>).

Tras obtener que, la línea celular CNVs<sup>High</sup> tenía un perfil más protumoral, relacionado directamente con procesos de proliferación endotelial y diferenciación mieloides, y que, además, en consonancia a esto, las citoquinas más secretadas por esta línea tenían un papel relacionado

con la angiogénesis y con la polarización de macrófagos hacia fenotipo M2; decidimos reagrupar las citoquinas significativas según fuesen proangiogénicas, o según si favorecían la polarización hacia M1-like TAMs o M2-like TAMs (Figura 78).

Tras esta diferenciación, observamos que la línea celular M28 presentaba un perfil más proangiogénico (5/7), ya que la mayoría de citoquinas de este grupo se encontraban incrementadas en el MC de estas células, respecto de la línea WM4235. En cuanto a las citoquinas relacionadas con los TAMs, observamos que la línea M28 tenía un perfil de secreción relacionado con la polarización hacia M2-like TAMs (5/5) y las células WM4235 con la polarización hacia M1-like TAMs (3/3).



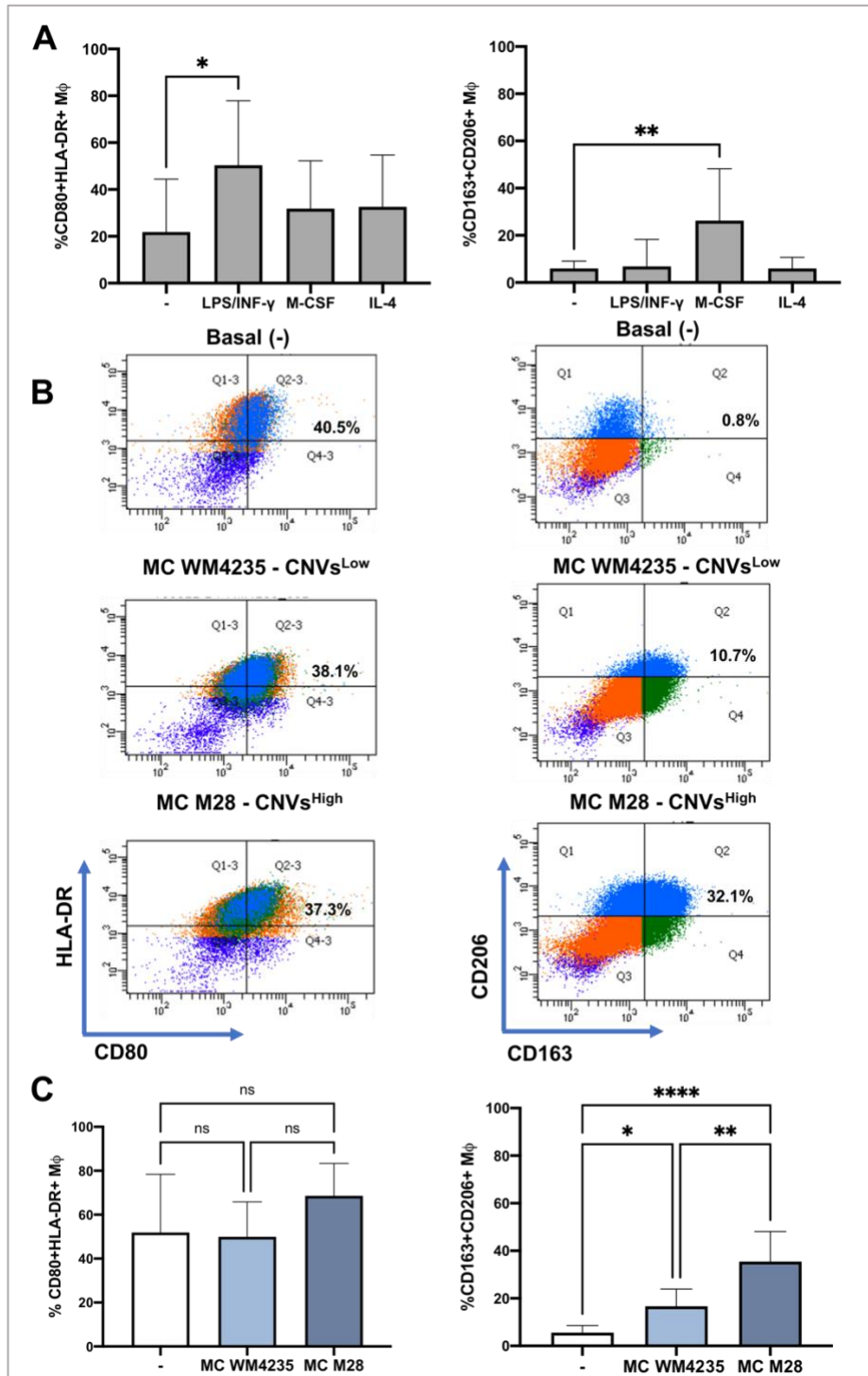
**Figura 78. Representación del perfil de secreción de factores proangiogénicos y de polarización de TAMs.** Heatmaps de los valores de secreción normalizados (Z-score) de la línea celular M28 (CNVs<sup>High</sup>) y WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>) según (A) el perfil proangiogénico, y (B) de polarización hacia M1-like TAMs o M2-like TAMs de los factores solubles analizados.

### **2.1.2. Análisis *in vitro* de la polarización de macrófagos con medios condicionados de líneas celulares de MLA**

A partir de los resultados obtenidos hasta ahora, y tras observar que la línea celular CNVs<sup>High</sup> presentaba un perfil secretor relacionado con la activación mieloide y con la polarización de macrófagos hacia *M2-like TAMs*, decidimos evaluar esta polarización *in vitro* a partir de los medios condicionados (MCs) de nuestras líneas.

En primer lugar, aislamos monocitos humanos de donantes sanos, los cuales fueron tratados con MCs de las líneas de MLA, así como con factores solubles conocidos por promover la polarización hacia M1 (LPS/IFN- $\gamma$ ) o hacia M2 (M-CSF, IL-4) y que fueron utilizados como controles positivos. La detección de las distintas poblaciones de macrófagos se realizó mediante FACS, mediante el cual se determinó el grado de expresión de marcadores fenotípicos de superficie de macrófagos polarizados hacia M1 (CD80, HLA-DR) o hacia M2 (CD163, CD206).

En cuanto a los controles positivos, la estimulación con LPS/IFN- $\gamma$  incrementó la expresión de CD80/HLA-DR ( $p=0.040$ ) respecto al resto de tratamientos mientras que, el tratamiento con M-CSF indujo un aumento de la expresión de CD163/CD206 en los macrófagos ( $p=0.0082$ ) (*Figura 79*). Los MCs de ambas líneas indujeron de forma similar la expresión de los marcadores CD80+HLA-DR+ respecto al control negativo, sin embargo, ambos medios dieron lugar a un incremento de la expresión de los marcadores CD163+CD206+, siendo este incremento superior en los macrófagos tratados con el MC de la línea M28 ( $p=0.0016$ ).

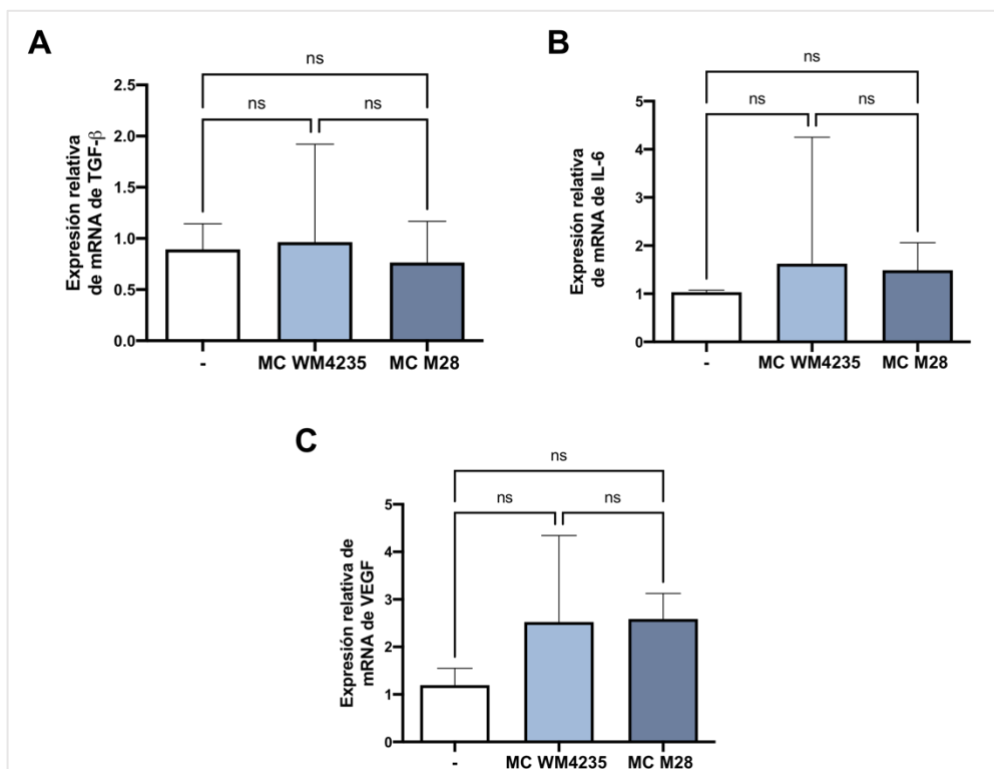


**Figura 79. Análisis de la polarización de macrófagos mediante FACS según el tratamiento con MCs de las líneas de MLA según el total de CNVs. (A)** Histogramas del porcentaje de macrófagos (Mφ) que expresaron CD80+HLA-DR+ (izquierda) y CD163+CD206+ (derecha) al ser tratados con IFN-γ/LPS, M-CSF e IL-4 como controles positivos o con medio basal (-). **(B)** Diagramas de puntos obtenidos del FACS que muestran el porcentaje de macrófagos (Mφ) CD80+HLA-DR+ (izquierda) y CD163+CD206+ (derecha) tras el tratamiento con medio basal (-), MC WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>) o MC M28 (CNVs<sup>High</sup>). **(C)** Histogramas del porcentaje de macrófagos (Mφ) que expresaron CD80+HLA-DR+ (izquierda) y CD163+CD206+ (derecha) tras el tratamiento con medio basal (-), MC WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>) o MC M28 (CNVs<sup>High</sup>). El análisis estadístico fue realizado mediante One-way ANOVA, seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001, \*\*\*\*p-valor<0.0001).

### 2.1.3. Análisis del componente estromal del TME en líneas celulares de MLA

Los fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) son el tipo celular más abundante dentro del componente estromal que forma parte del TME, los cuales tienen un papel fundamentalmente en la tumorigénesis y en la progresión del tumor. Debido a su abundancia dentro del TME, y al carácter protumoral de esta población celular, decidimos evaluar paralelamente si el secretoma de las líneas de MLA, además de modular el componente inmunitario del TME, eran capaces de modular la activación de fibroblastos hacia CAFs.

Para ello, se aislaron fibroblastos provenientes de ratones *WT*, y se trataron *in vitro* con MCs recogidos de la línea M28 y WM4235. A partir de estas células, se analizó la expresión de factores solubles de secreción característicos del fenotipo de CAF mediante qRT-PCR (TGF- $\beta$ , IL-6 y VEGF). Los resultados mostraron que no existían diferencias de expresión en ninguno de los marcadores en las condiciones estimuladas con los MCs de las líneas respecto a la condición sin tratar (-), ni tampoco entre los medios de ambas líneas (*Figura 80*).



**Figura 80. Análisis de la expresión de marcadores de activación y fenotipo de CAFs mediante la estimulación de fibroblastos con MCs de las líneas de MLA según el total de CNVs.** (A) RT-qPCR de la expresión relativa de mRNA de TGF- $\beta$ , (B) IL-6 y (C) VEGF en fibroblastos de ratón *WT* estimulados durante 48h con MCs de las líneas M28 (CNVs<sup>High</sup>) y WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>). El análisis estadístico fue realizado mediante One-Way ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

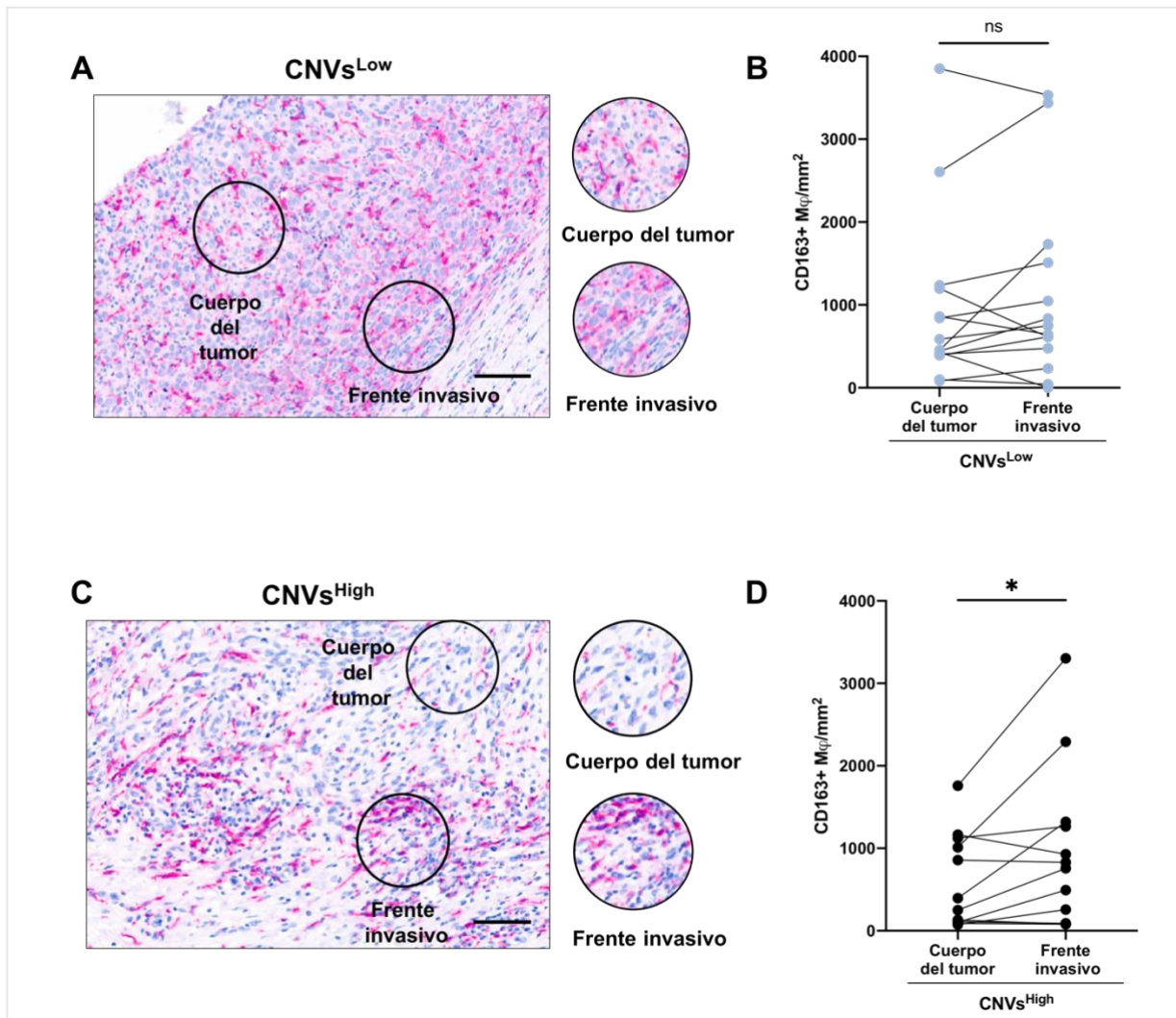
## 2.2. ESTUDIO DEL SECRETOMA Y DEL COMPONENTE INMUNITARIO DEL TME EN PACIENTES DE MLA

### 2.2.1. *Análisis inmunohistoquímico de CD163 en biopsias de pacientes*

Tras observar que el secretoma de las líneas celulares de MLA incrementaban la expresión de marcadores de *M2-like TAMs*, siendo este incremento superior en el caso de la línea celular CNVs<sup>High</sup>, decidimos estudiar la infiltración de esta población de macrófagos en las biopsias de los pacientes de nuestra cohorte.

El estudio de la población *M2-like TAMs* se llevó a cabo mediante tinción inmunohistoquímica del marcador de expresión CD163, que fue analizado diferenciando el tumor en dos zonas: el cuerpo del tumor y el frente invasivo. Esta diferenciación se realizó ya que, se ha observado que un alto número de *M2-like TAMs* en el frente invasivo se relaciona con un peor pronóstico<sup>138,139</sup>. Por lo tanto, el análisis de las células CD163+ se realizó comparando el número de células/mm<sup>2</sup> en el cuerpo del tumor y en el frente invasivo dentro de la misma biopsia, para así evaluar la distribución de estas células según el total de CNVs de cada paciente (*Figura 81*).

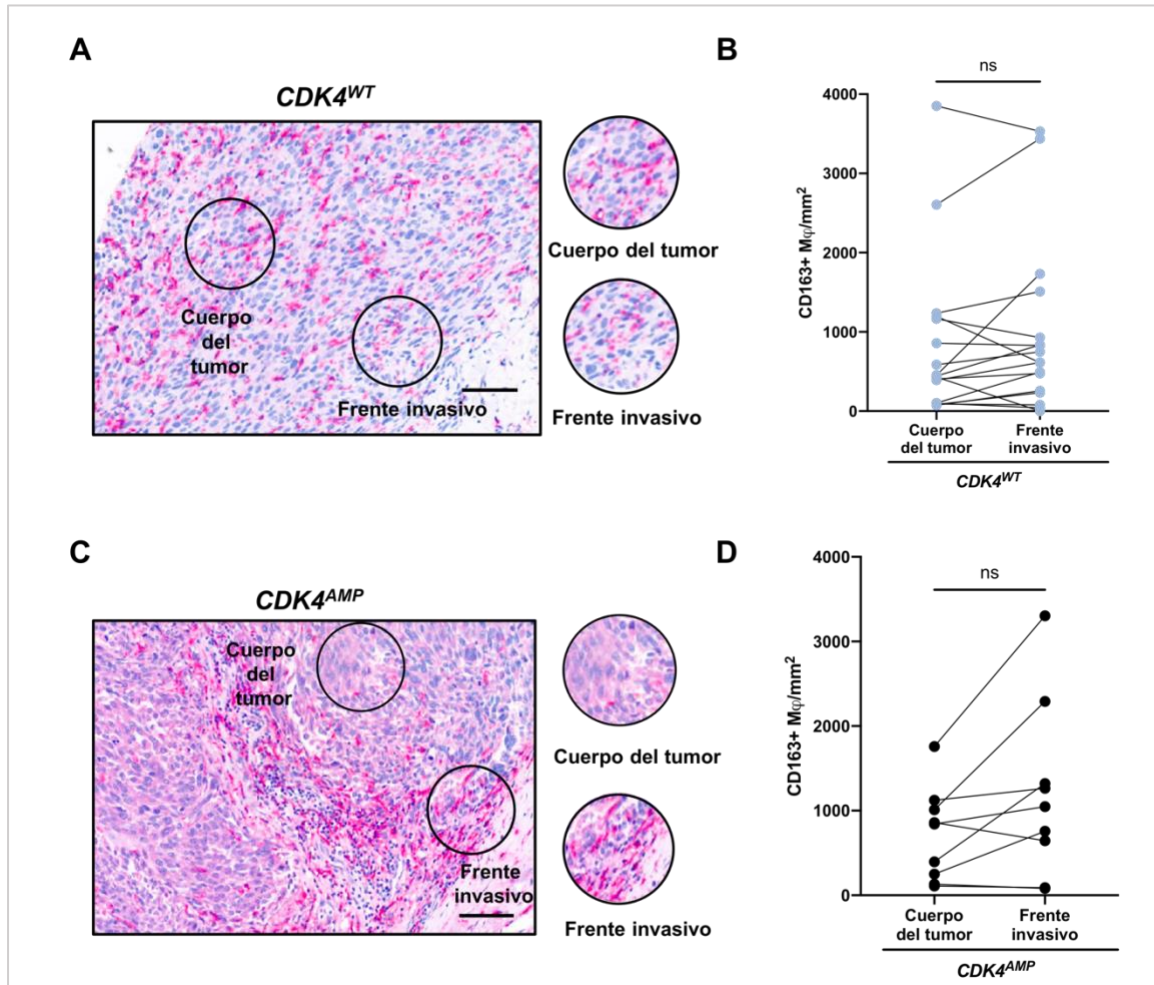
Los resultados del análisis realizado mostraron que no hubo diferencias significativas ( $p=0.2984$ ) entre el número de Mφ CD163+/mm<sup>2</sup> en el cuerpo del tumor y el frente invasivo en las biopsias con CNVs<sup>Low</sup>. Sin embargo, se observó un incremento significativo ( $p=0.0397$ ) de Mφ CD163+/mm<sup>2</sup> en el frente invasivo respecto al cuerpo del tumor en los pacientes con CNVs<sup>High</sup>.



**Figura 81. Análisis de la población de M2-like TAMs en el cuerpo del tumor y el frente invasivo en biopsias de pacientes de MLA según el total de CNVs.** (A) Imagen representativa de la expresión de CD163 mediante tinción inmunohistoquímica (magenta) en el cuerpo del tumor y el frente invasivo en una sección seriada de una biopsia de un paciente con CNVs<sup>Low</sup>. (B) Cuantificación comparativa de los TAMs CD163+/mm<sup>2</sup> en el cuerpo del tumor vs el frente invasivo en pacientes con CNVs<sup>Low</sup>. (C) Imagen representativa de la expresión de CD163 mediante tinción inmunohistoquímica (magenta) en el cuerpo del tumor y el frente invasivo en una sección seriada de una biopsia de un paciente con CNVs<sup>High</sup>. (D) Cuantificación comparativa de los TAMs CD163+/mm<sup>2</sup> en el cuerpo del tumor vs el frente invasivo en pacientes con CNVs<sup>High</sup>. Barra de escala: 100  $\mu$ m. El análisis estadístico fue realizado mediante T-test pareado (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

Aunque no realizamos estudios con los MCs de las líneas con CDK4 sobreexpresado, ya que no obtuvimos resultados relevantes en el array de citoquinas explicado en apartados anteriores, si que estudiamos los M2-like TAMs agrupando a los pacientes según la ausencia/presencia de amplificación en *CDK4* (Figura 82). A partir de los resultados obtenidos, observamos que no hubo diferencias significativas ( $p=0.2345$ ) entre el número de M $\phi$  CD163+/mm<sup>2</sup> en el cuerpo del tumor y el frente invasivo en las biopsias con *CDK4*<sup>WT</sup>. En cuanto a las biopsias *CDK4*<sup>AMP</sup>, aunque no se obtuvieron diferencias significativas ( $p=0.0514$ ), si que se pudo apreciar que los M $\phi$  CD163+/mm<sup>2</sup> incrementaban en el frente invasivo respecto al cuerpo del tumor.





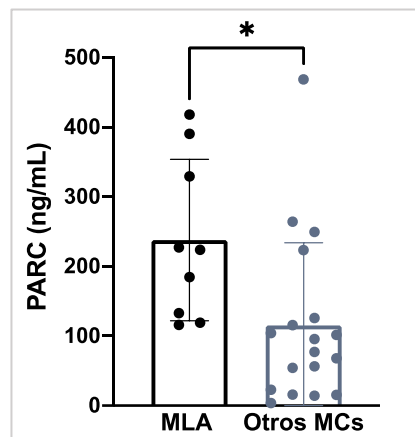
**Figura 82.** Análisis de la población de M2-like TAMs en el cuerpo del tumor y el frente invasivo en biopsias de pacientes de MLA según la amplificación de *CDK4*. (A) Imagen representativa de la expresión de CD163 mediante tinción inmunohistoquímica (magenta) en el cuerpo del tumor y el frente invasivo en una sección seriada de una biopsia de un paciente con *CDK4<sup>WT</sup>*. (B) Cuantificación comparativa de los TAMs CD163+/mm<sup>2</sup> en el cuerpo del tumor vs el frente invasivo en pacientes con *CDK4<sup>WT</sup>*. (C) Imagen representativa de la expresión de CD163 mediante tinción inmunohistoquímica (magenta) en el cuerpo del tumor y el frente invasivo en una sección seriada de una biopsia de un paciente con *CDK4<sup>AMP</sup>*. (D) Cuantificación comparativa de los TAMs CD163+/mm<sup>2</sup> en el cuerpo del tumor vs el frente invasivo en pacientes con *CDK4<sup>AMP</sup>*. Barra de escala: 100  $\mu$ m. El análisis estadístico fue realizado mediante T-test pareado (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

### 2.2.2. Análisis cuantitativo de la secreción de PARC en plasma de pacientes

A partir de los resultados obtenidos en el array de citoquinas con las líneas celulares de MLA, decidimos analizar la concentración de la citoquina PARC (CCL18) en plasma sanguíneo de pacientes de MLA mediante ELISA. Obtuvimos plasma de una cohorte de 9 pacientes del HUAV extraído previa cirugía del MLA primario, compuesta en su mayoría por pacientes de bajo riesgo y por tanto con pronóstico favorable (*Tabla Anexa 6*), a diferencia de nuestra cohorte principal que presentaba un pronóstico más heterogéneo. Así que, debido a las características

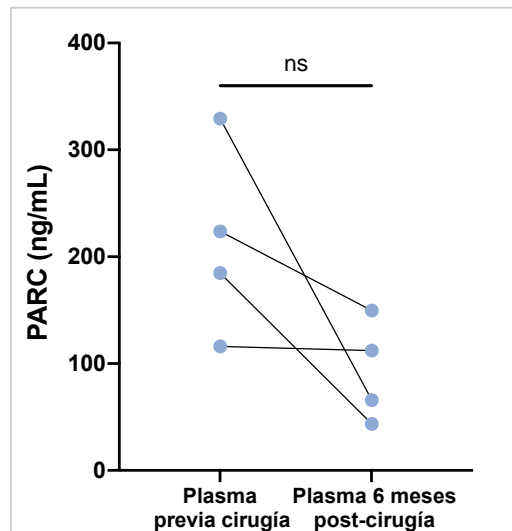
clinicopatológicas de los pacientes y al tamaño reducido de la cohorte, decidimos evitar subagrupar la cohorte según el perfil genético y sus características clinicopatológicas. De forma que, analizamos globalmente la secreción de PARC en comparación a plasmas de pacientes de MCs no MLA, los cuales fueron extraídos de forma previa al desarrollo de metástasis en el Hospital Clínic de Barcelona (*Tabla Anexa 7*).

Los resultados mostraron que la cohorte de MLA presentaba una concentración de PARC (ng/mL) significativamente superior ( $p=0.0173$ ) en comparación con la cohorte de MCs diferente de MLA (*Figura 83*).



**Figura 83. Análisis cuantitativo de la secreción de PARC en plasma de pacientes de MLA respecto a pacientes con otros MCs diferentes de MLA.** La secreción de PARC fue evaluada mediante la técnica ELISA, en plasma de pacientes de MLA extraído previa cirugía del MLA primario, y en plasma de pacientes con MCs no MLA extraído de forma previa al diagnóstico de metástasis. El análisis estadístico fue realizado mediante T-test no pareado (\* $p$ -valor $<0.05$ ; \*\* $p$ -valor $<0.01$ ; \*\*\* $p$ -valor $<0.001$ ).

Además, para evaluar si tras la cirugía los niveles de PARC en plasma se reducían, se consiguieron recolectar 4 plasmas seis meses post-cirugía, apareados con 4 plasmas extraídos previa cirugía del MLA primario. Los resultados no fueron significativos, aunque sí que se observó una tendencia a la baja de la concentración de PARC pasados 6 meses de la cirugía del MLA primario (*Figura 84*).

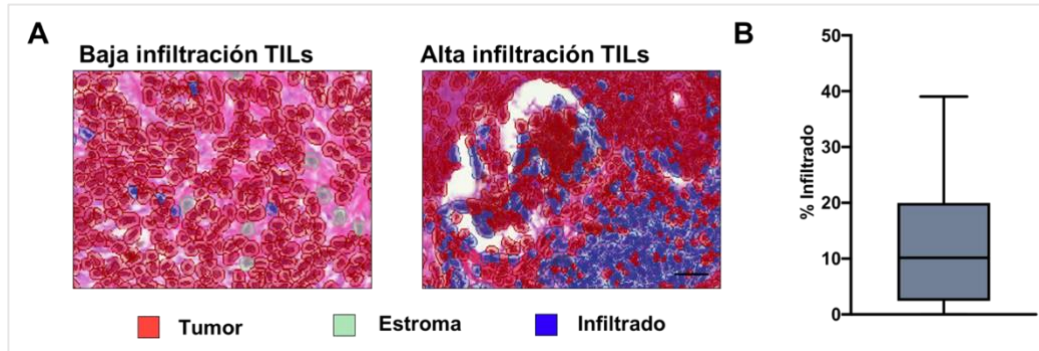


**Figura 84.** Análisis cuantitativo de la secreción de PARC en plasma de pacientes previa cirugía del MLA primario apareados con plasma de los mismos pacientes 6 meses después de la cirugía. El análisis estadístico fue realizado mediante T-test pareado (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

### 2.2.3. Análisis de los linfocitos infiltrantes en el tumor (TILs) en biopsias de pacientes de MLA

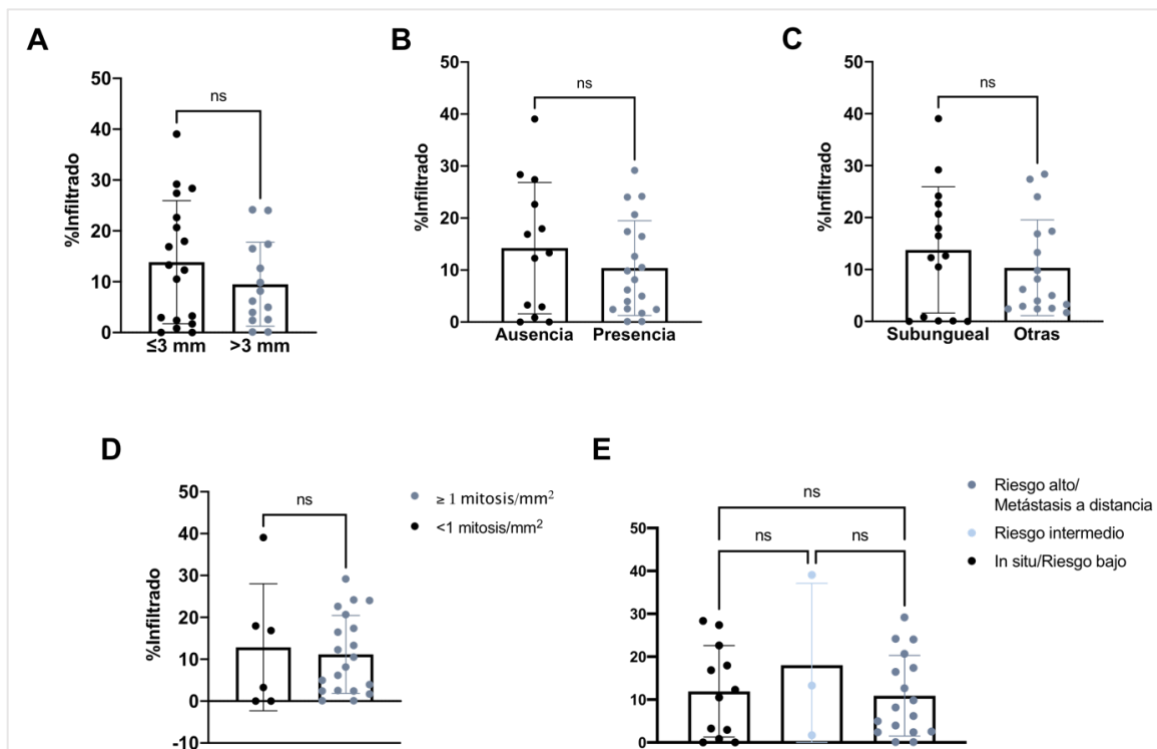
La presencia de linfocitos infiltrantes en el tumor (TILs) en el TME, y su patrón de infiltración en éste podría influir en el pronóstico, así como en el beneficio clínico de la inmunoterapia en el MC. Varios estudios han reportado que los pacientes con MLA presentan un bajo número de TILs, lo cual ha sido relacionado con un peor pronóstico y una peor respuesta a inhibidores de puntos de control del SI<sup>140,141</sup>. Por lo que, decidimos estudiar los TILs en las H&E de las biopsias de los pacientes a través de un sistema de clasificación automatizada mediante el software QuPath.

Clasificamos las células en tres tipos celulares: células tumorales, estromales e infiltrado linfocitario. La mediana del infiltrado linfocitario respecto al total de células detectadas en las H&Es fue de un 10.2% (IQR: 2.5-18.6), valor a partir del cual dividimos nuestra cohorte en dos grupos diferenciados, por un lado, un grupo de baja infiltración linfocitaria (Infiltrado<sup>Low</sup>) y otro grupo de alta infiltración linfocitaria (Infiltrado<sup>High</sup>) (Figura 85).



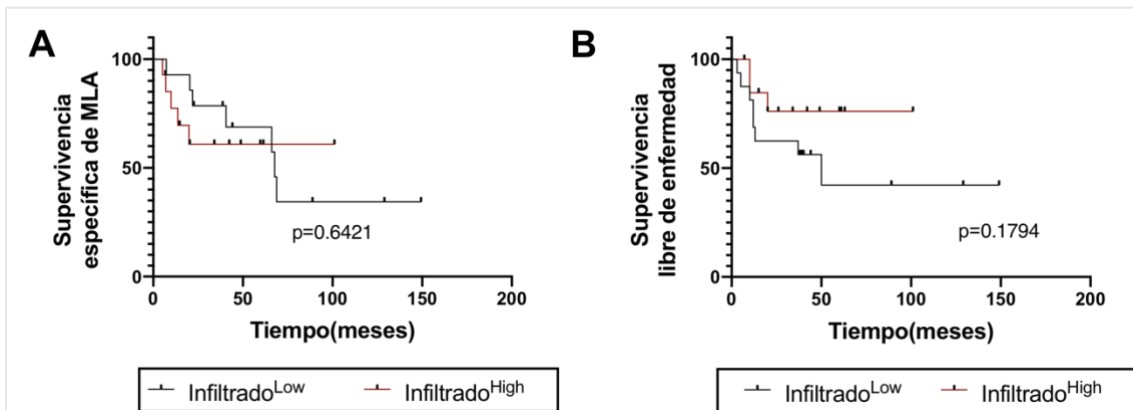
**Figura 85. Análisis del infiltrado linfocitario en H&E de biopsias de pacientes de MLA.** (A) Imágenes representativas del análisis de distintas poblaciones celulares: tumor, estroma e infiltrado. (B) Distribución de los porcentajes de infiltrado obtenidos en todos los pacientes tras el análisis con QuPath.

El infiltrado linfocitario fue analizado en función de las características clinicopatológicas de los pacientes, para así evaluar si existían diferencias significativas según el infiltrado (Figura 86). No se obtuvieron resultados significativos en cuanto al porcentaje de infiltrado respecto a ninguna de las variables clinicopatológicas analizadas, las cuales fueron: Breslow ( $p=0.2685$ ), ulceración ( $p=0.3264$ ), localización ( $p=0.3718$ ), índice mitótico ( $p=0.7381$ ) y riesgo ( $p=0.5818$ )



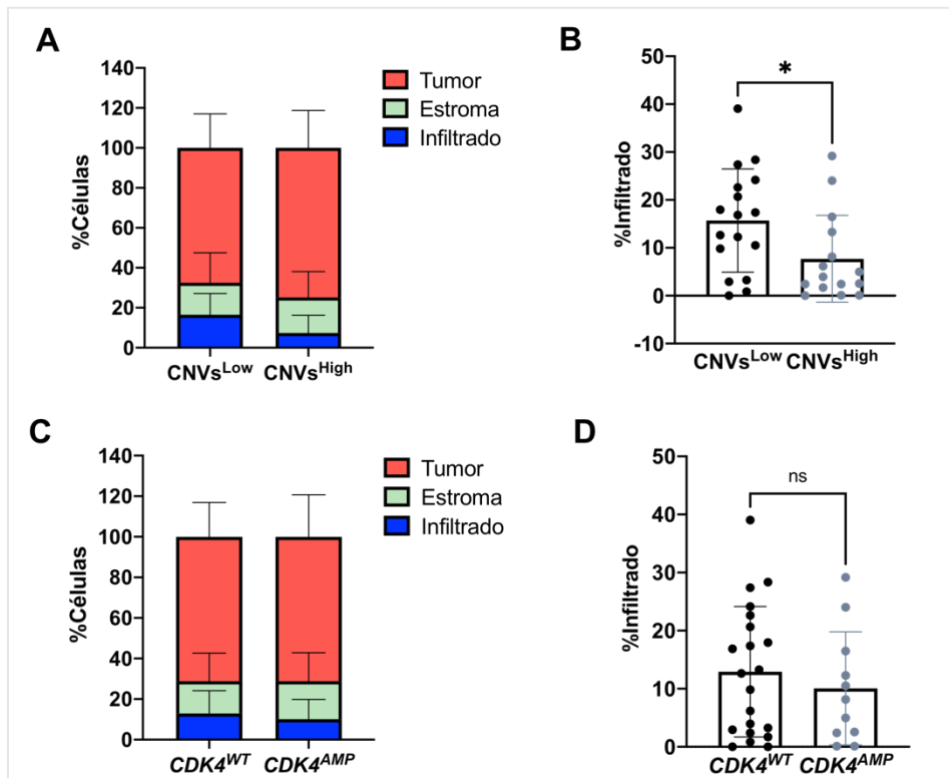
**Figura 86. Análisis del porcentaje de infiltrado en función de las características clinicopatológicas de los pacientes.** (A) Análisis del infiltrado según el índice Breslow, (B) la ulceración, (C) la localización, (D) el índice mitótico, y (E) el riesgo. El análisis estadístico fue realizado mediante T-test no pareado (A, B, C, D), y mediante One-way ANOVA (E), seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey (\* $p$ -valor $<0.05$ ; \*\* $p$ -valor $<0.01$ ; \*\*\* $p$ -valor $<0.001$ ).

Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en la supervivencia específica de MLA y en la supervivencia libre de enfermedad en cuanto a la proporción de infiltrado (Figura 87). La supervivencia específica promedio de MLA fue de 82(95% IC, 50.8-113.2) meses y de 64.2(95% IC,12.8-39.1) meses para pacientes con bajo y alto infiltrado linfocitario respectivamente. En cuanto a la supervivencia libre de enfermedad promedio fue de 75.6 (95%IC, 39.6-111.7) meses para el grupo con bajo infiltrado, y de 80.1 (95% IC, 59.5-100.8) meses para el grupo de alto infiltrado linfocitario.



**Figura 87. Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto al porcentaje de infiltrado.** (A) Kaplan-Meier de la supervivencia específica de MLA y la (B) supervivencia libre de enfermedad respecto al porcentaje de infiltrado. El análisis estadístico de la supervivencia entre los grupos fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

Posteriormente comparamos la proporción de infiltrado respecto al total de células detectadas, respecto al total de CNVs y respecto a la ausencia/presencia de la amplificación en el gen CDK4 (Figura 88). En el caso del total de CNVs, el grupo de CNVs<sup>Low</sup> (15.6%) presentó un porcentaje medio de infiltrado significativamente superior ( $p=0.0320$ ) que el grupo de CNVs<sup>High</sup> (7.7%). Sin embargo, respecto a la amplificación en CDK4, no observamos diferencias significativas ( $p=0.4820$ ) entre los pacientes CDK4<sup>WT</sup> (12.93%) y los pacientes CDK4<sup>AMP</sup> (10.1%).



**Figura 88. Análisis del porcentaje de infiltrado respecto al total de CNVs y a la presencia de amplificación en CDK4.** (A) Distribución de porcentajes de las distintas poblaciones celulares detectadas en la H&E (tumor, estroma e infiltrado) según el total de CNVs. (B) Gráfica del porcentaje de infiltrado linfocitario respecto al total de CNVs. (C) Distribución de porcentajes de las distintas poblaciones celulares detectadas en la H&E (tumor, estroma e infiltrado) según la ausencia/presencia de amplificación en CDK4. (D) Gráfica del porcentaje de infiltrado linfocitario respecto al la ausencia/presencia de amplificación en CDK4. El análisis estadístico fue realizado mediante T-test no pareado (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).







# **SEGUNDA PARTE**

---

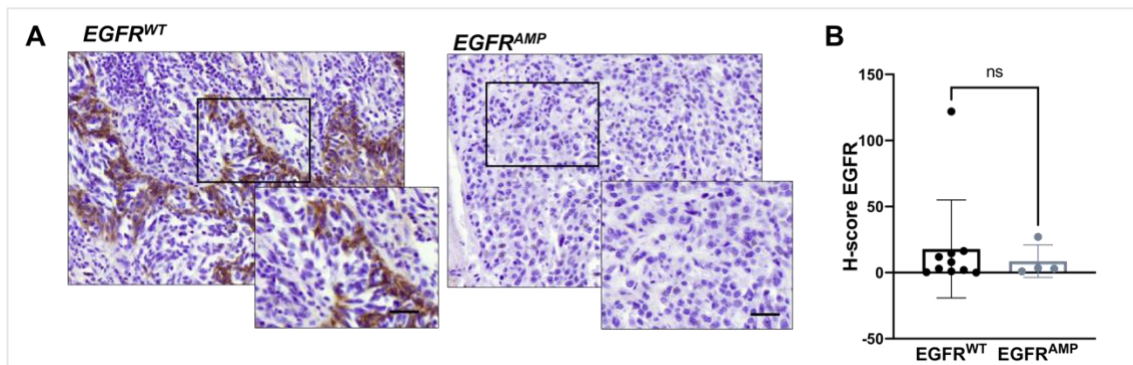
**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE  
MARCADORES DE APLICACIÓN  
CLÍNICA EN MELANOMA  
LENTIGINOSO ACRAL**



## 1. CORRELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE AMPLIFICACIONES Y LOS NIVELES DE EXPRESIÓN EN ONCOGENES EN LA COHORTE DE PACIENTES DE MLA

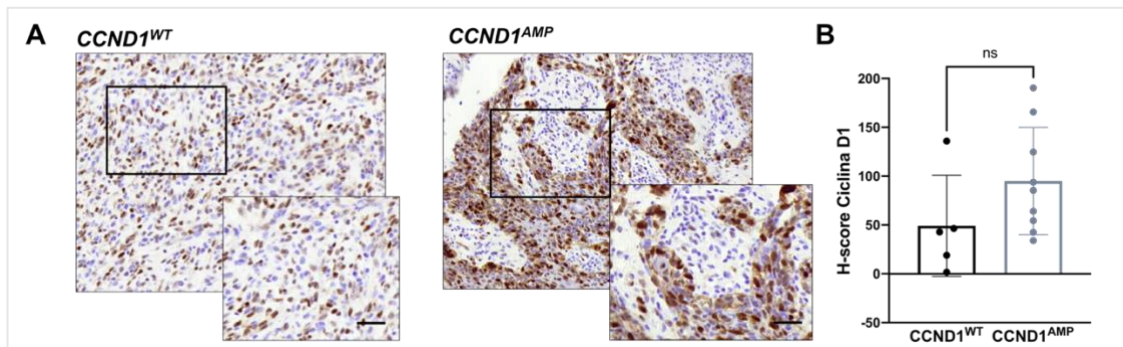
El análisis de la expresión en las biopsias de los pacientes se realizó mediante tinción inmunohistoquímica. Con el objetivo de realizar un estudio preliminar de la expresión de varios oncogenes que habían presentado amplificaciones en el estudio genético mediante MLPA, se seleccionó un subgrupo representativo de la cohorte (n=14) para realizar dicho análisis. Los marcadores estudiados fueron EGFR, Ciclina D1 y CDK4.

En el caso de EGFR, no se observaron diferencias significativas ( $p=0.6392$ ) entre el grupo de pacientes con  $EGFR^{WT}$  y el grupo con  $EGFR^{AMP}$  tras cuantificar los niveles de expresión (Figura 89).



**Figura 89. Análisis de la expresión de EGFR respecto a la presencia de amplificación en el tumor.** (A) Imágenes representativas de la expresión de  $EGFR$  mediante tinción inmunohistoquímica (DAB) en secciones seriadas de las biopsias de MLA, según la ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de amplificación del gen  $EGFR$ . Barra de escala: 50  $\mu\text{m}$  (B) Gráfica representativa de los niveles de expresión mediante H-score respecto a los grupos de pacientes con  $EGFR^{WT}$  o  $EGFR^{AMP}$ . El análisis estadístico de las medias de grupos independientes fue realizado mediante T-test no pareado (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

Por otro lado, se observaron niveles superiores de expresión de Ciclina D1 en el grupo de pacientes con  $CCND1^{AMP}$ , sin embargo, las diferencias observadas no resultaron estadísticamente significativas ( $p=0.1535$ ) (Figura 90).



**Figura 90. Análisis de la expresión de Ciclina D1 respecto a la presencia de amplificación en el tumor.** (A) Imágenes representativas de la expresión de Ciclina D1 mediante tinción inmunohistoquímica (DAB) en secciones seriadas de las biopsias de MLA, según la ausencia (izquierda) o presencia (derecha) de amplificación del gen *CCND1*. Barra de escala: 50 μm (B) Gráfica representativa de los niveles de expresión mediante H-score respecto a los grupos de pacientes con *CCND1*<sup>WT</sup> o *CCND1*<sup>AMP</sup>. El análisis estadístico de las medias de grupos independientes fue realizado mediante T-test no pareado (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

El resultado de la correlación entre los niveles de expresión y la presencia de amplificación de CDK4, ya se mostró en la *Figura 69*, observando un incremento de la expresión en el grupo con presencia de amplificación.

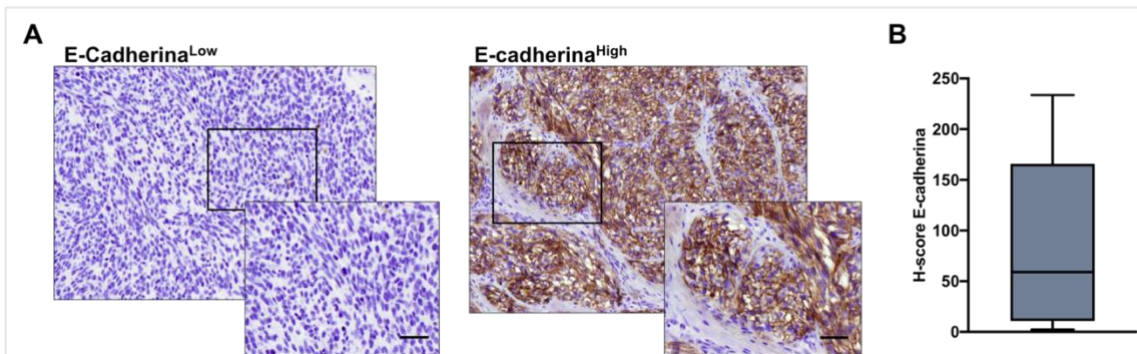
## 2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MARCADORES DE TRANSICIÓN DE EPITELIO-MESÉNQUIMA EN LA COHORTE DE PACIENTES DE MLA

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso biológico fundamental que está involucrado en desarrollo embrionario, regeneración de tejidos y en cáncer. Durante el proceso de EMT, se producen cambios en la regulación de la expresión y a nivel postraduccional que llevan a la represión de las características epiteliales (estado melanocítico) y la adquisición de características mesenquimales (estado indiferenciado). A través de este proceso las células adquieren morfología y citoarquitectura similar a la de un fibroblasto, incrementando su capacidad migratoria e invasiva<sup>142,143</sup>.

Con el objetivo de seguir profundizando en la caracterización del MLA, en este apartado analizaremos la expresión de la E-cadherina, un marcador epitelial, así como de la N-cadherina, un marcador mesenquimal. El estudio preliminar del análisis de expresión de marcadores de EMT se realizó en el mismo subgrupo de pacientes que en el apartado anterior.

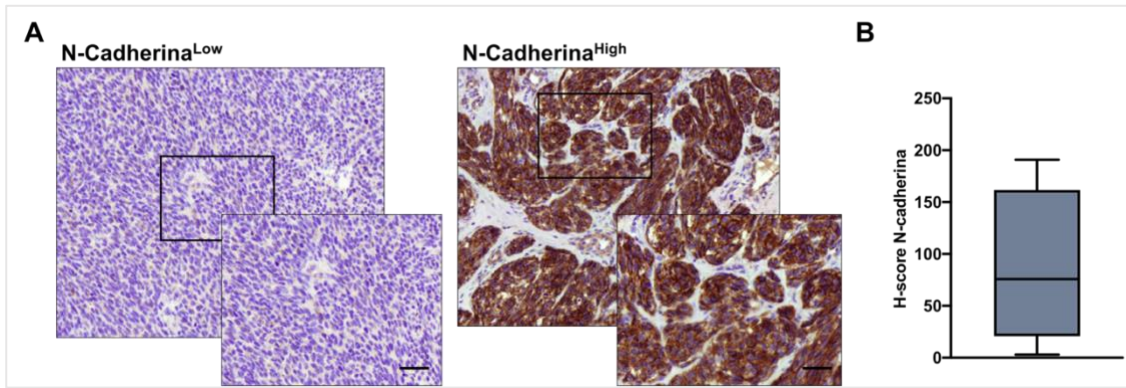
### 2.3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EMT

En primer lugar, se llevó a cabo una tinción inmunohistoquímica del marcador epitelial E-cadherina en las biopsias de los pacientes, cuya mediana de expresión fue de 96.91 (IQR:17.3-145.83) de H-score (*Figura 91*). Los pacientes fueron divididos en dos grupos según el valor de la mediana, los pacientes con H-score menor o igual a la mediana fueron clasificados como grupo con baja expresión de E-cadherina (Ecad<sup>Low</sup>), y los pacientes con valores superiores a ésta como grupo con alta expresión (Ecad<sup>High</sup>).



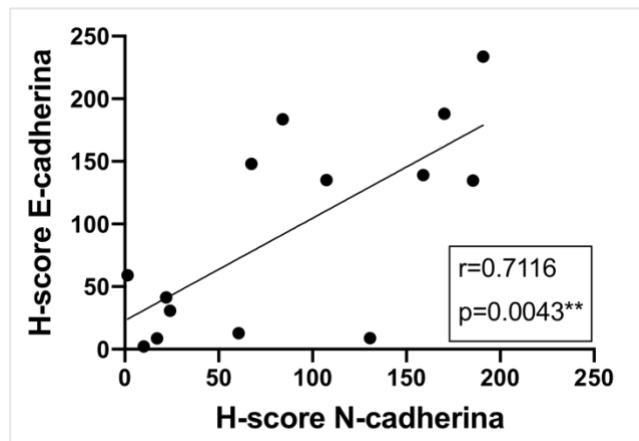
**Figura 91. Análisis de la expresión del marcador epitelial E-cadherina.** (A) Imágenes representativas de la expresión de E-cadherina mediante tinción inmunohistoquímica con (DAB) en secciones seriadas de las biopsias de MLA, según bajo (izquierda) o alto (derecha) nivel de expresión. (B) Diagrama representativo de la distribución de los valores de H-score del marcador E-cadherina. Barra de escala: 50 µm.

En segundo lugar, se analizaron los niveles del marcador mesenquimal N-cadherina, cuya mediana de expresión fue de 75.7 (IQR:24.7-151.8) de H-score (*Figura 90*). De igual manera que con el anterior marcador, los pacientes se clasificaron en dos grupos según la mediana de expresión, un grupo de baja expresión (Ncad<sup>Low</sup>) y un grupo de alta expresión (Ncad<sup>High</sup>) del marcador.



**Figura 92. Análisis de la expresión del marcador epitelial N-cadherina.** (A) Imágenes representativas de la expresión de E-cadherina mediante tinción inmunohistoquímica con DAB en secciones seriadas de las biopsias de MLA, según bajo (izquierda) o alto (derecha) nivel de expresión. (B) Diagrama representativo de la distribución de los valores de H-score del marcador N-cadherina. Barra de escala: 50 µm.

A continuación, analizamos la correlación en la expresión de ambos marcadores por paciente, para evaluar qué tipo de correlación existía entre la expresión del marcador epitelial (Ecad) y el mesenquimal (Ncad) (Figura 93). Obtuvimos que, los niveles de E-cadherina y N-cadherina se correlacionaron entre sí positivamente de forma significativa ( $r=0.7116$ ;  $p=0.0043$ ), es decir cuando los valores eran bajos para uno de los marcadores en el mismo paciente, también lo eran para el otro, e igualmente ocurrió para valores altos.

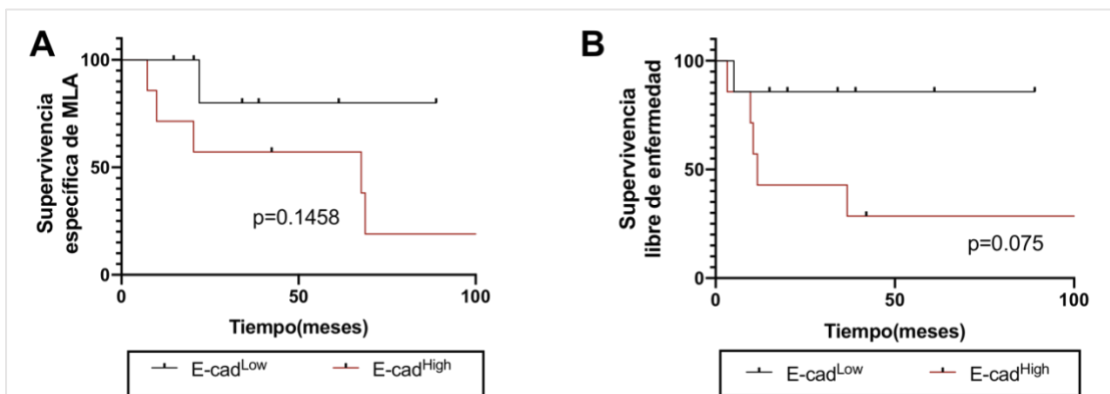


**Figura 93. Correlación entre los valores de expresión de los marcadores de EMT.** Gráfica que muestra la correlación entre los niveles de expresión (H-score) de E-cadherina y N-cadherina. La correlación fue evaluada mediante el test de correlación de Pearson. (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

#### 2.4. ANÁLISIS DE LA SUPERVIVENCIA ESPECÍFICA DE MLA Y LA SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD EN FUNCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EMT

Posteriormente, analizamos la supervivencia específica de MLA y la supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión de E-cadherina, según los grupos anteriormente indicados (*Figura 94*). Los resultados de la supervivencia específica de MLA no fueron significativos, aunque se observó una mayor supervivencia en el grupo de Ecad<sup>Low</sup>, siendo la supervivencia media de 42.7 (95% IC, 43.8-100.7) meses para este grupo y de 50.61 (95% IC, 23.9-77.2) meses para los pacientes con Ecad<sup>High</sup>.

Asimismo, no se obtuvieron diferencias significativas en la supervivencia libre de enfermedad, con periodos libres de recaídas superiores en el caso de los pacientes con Ecad<sup>Low</sup>, cuya media de supervivencia fue de 77 (95% IC, 55.2-98.7) meses y para el grupo con Ecad<sup>High</sup> de 39.1 (95% IC, 9.2-69.03) meses.

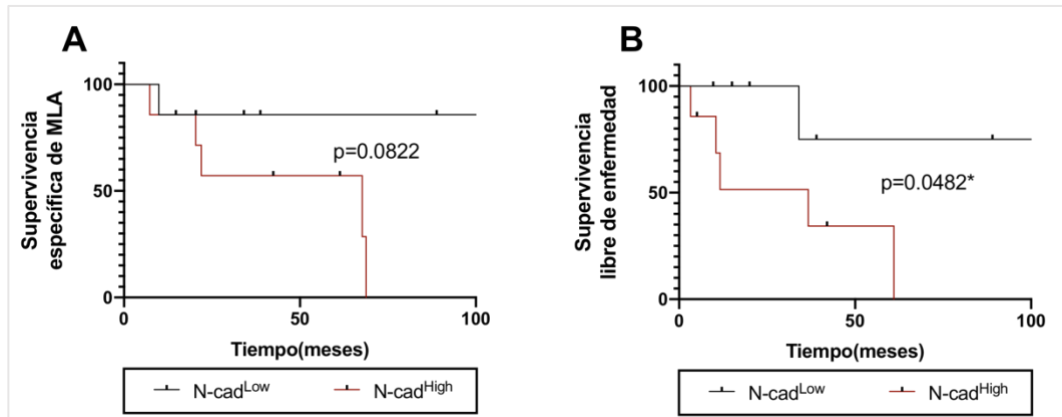


**Figura 94. Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a la expresión de E-cadherina.** (A) Kaplan-Meier de la supervivencia específica de MLA y la (B) supervivencia libre de enfermedad respecto los niveles de expresión de E-cadherina. El análisis estadístico de la supervivencia entre los grupos fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

También analizamos la supervivencia específica de MLA y la supervivencia libre de enfermedad en función de la expresión de N-cadherina (*Figura 93*). No observamos diferencias significativas en la supervivencia específica de MLA, aunque se observó una mayor supervivencia en el grupo de Ncad<sup>Low</sup>, siendo la supervivencia media de 75.8 (95% IC, 52.2-99.4) meses para este grupo y de 52.3 (95% IC, 40.5-83.3) meses para los pacientes con Ncad<sup>High</sup>.

En el caso de la supervivencia libre de enfermedad, se obtuvieron diferencias significativas (p=0.0482) en función de la expresión de N-cadherina, con periodos libres de recaídas superiores

en el caso de los pacientes con Ncad<sup>Low</sup>, cuya media de supervivencia fue de 77.7 (95% IC, 57.2-98.2) meses y para el grupo con Ncad<sup>High</sup> de 38.4 (95% IC, 8.1-68.7) meses.



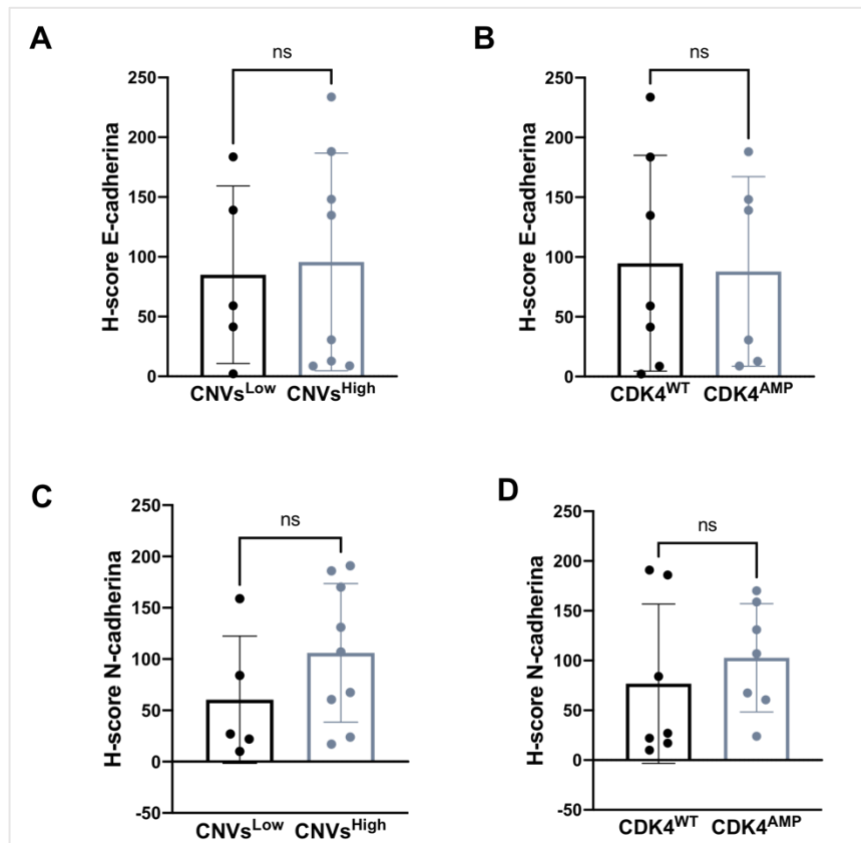
**Figura 95. Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a la expresión de N-cadherina.** (A) Kaplan-Meier de la supervivencia específica de MLA y la (B) supervivencia libre de enfermedad respecto los niveles de expresión de N-cadherina. El análisis estadístico de la supervivencia entre los grupos fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

## 2.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE EMT EN FUNCIÓN DEL PERFIL GENÉTICO

La relación entre la expresión de los marcadores E-cadherina y N-cadherina en nuestra cohorte fue analizada en función del perfil genético de la misma (Figura 96). Según los resultados obtenidos en el apartado de análisis del perfil genético de los pacientes, estos fueron clasificados, por un lado, en función del total de CNVs (CNVs<sup>Low</sup> /CNVs<sup>High</sup>) y, por otro lado, según si presentaban amplificación en el gen *CDK4* (*CDK4*<sup>WT</sup> o *CDK4*<sup>AMP</sup>).

En el caso de E-cadherina, no obtuvimos diferencias significativas ni al comparar la expresión del marcador con el total de CNVs (p=0.8309), ni con la ausencia/presencia de amplificación en *CDK4* (p=0.8880). Lo mismo ocurrió en el caso de N-cadherina, no contemplamos diferencias significativas al separar los pacientes mediante el total de CNVs (p=0.2376), ni mediante la dosis génica de *CDK4* (p=0.4908).





**Figura 96. Análisis de la expresión de marcadores de EMT en función del perfil genético.** (A) Gráficas representativas de los niveles de expresión de E-cadherina en función del total de CNVs por paciente y (B) en función de la ausencia o presencia de amplificación en *CDK4*. (C) Gráficas representativas de los niveles de expresión de N-cadherina en función del total de CNVs por paciente y (D) en función de la ausencia o presencia de amplificación en *CDK4*. El análisis estadístico de las medias de grupos independientes fue realizado mediante T-test no pareado (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

### 3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ALDH1 COMO MARCADOR DE CÉLULA MADRE TUMORAL (CMT)

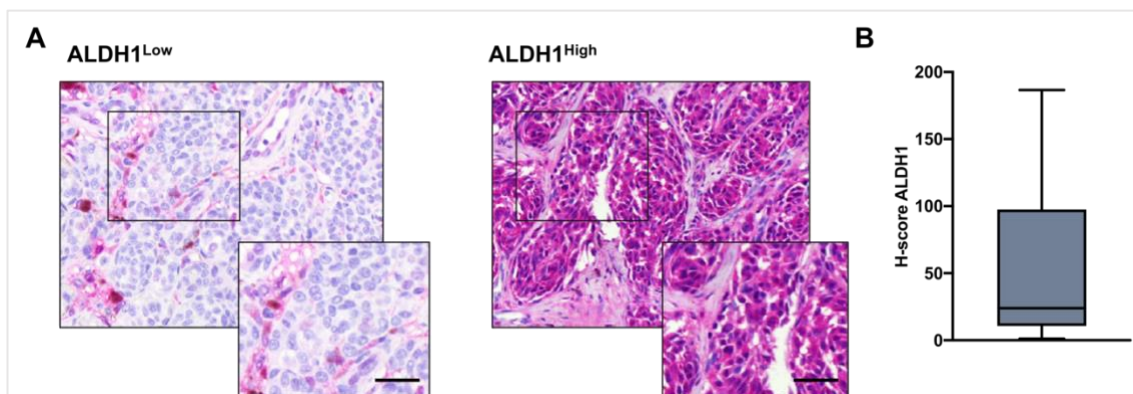
Las células madre tumorales son una subpoblación de células indiferenciadas, las cuales se encuentran en bajas proporciones en los tumores y que tienen características de células madre. Algunos estudios asocian esta subpoblación celular con la iniciación tumoral, la resistencia a tratamientos, las recaídas y metástasis. La identificación de CMTs se realiza mediante diferentes métodos como son la identificación de marcadores de superficie, la capacidad de estas células de formar esferas en cultivo, y mediante la actividad de las enzimas aldehído deshidrogenasas (ALDHs)<sup>144</sup>.

ALDHs, son una familia de enzimas, que catalizan la oxidación de aldehídos a ácidos carboxílicos, y cuyos niveles de actividad, concretamente de la variante ALDH1, han sido relacionados de forma consistente con actividad asociada a CMT en varios tipos de tumor<sup>144,145</sup>.

Como hemos mencionado con anterioridad, el MLA es un tumor con mal pronóstico, debido no solo a su retraso diagnóstico, sino también a sus características intrínsecas. Por lo tanto, decidimos estudiar los niveles de expresión del marcador intracelular ALDH1, para caracterizar el perfil de este tumor en relación a las CMTs.

### 3.1.1. Análisis de la expresión de ALDH1 en la cohorte de pacientes de MLA

En primer lugar, se analizaron los niveles de expresión de ALDH1 mediante tinción inmunohistoquímica en la totalidad de biopsias de la cohorte (n=32), cuya mediana de expresión fue de 23.9 (IQR:12.03-75.6) de H-score (Figura 97). Como en los anteriores marcadores analizados, los pacientes fueron clasificados en dos grupos según el valor de la mediana, los pacientes con H-score menor o igual a la mediana fueron clasificados como grupo con baja expresión de ALDH1 (ALDH1<sup>Low</sup>), y los pacientes con valores superiores a ésta como grupo con alta expresión (ALDH1<sup>High</sup>).

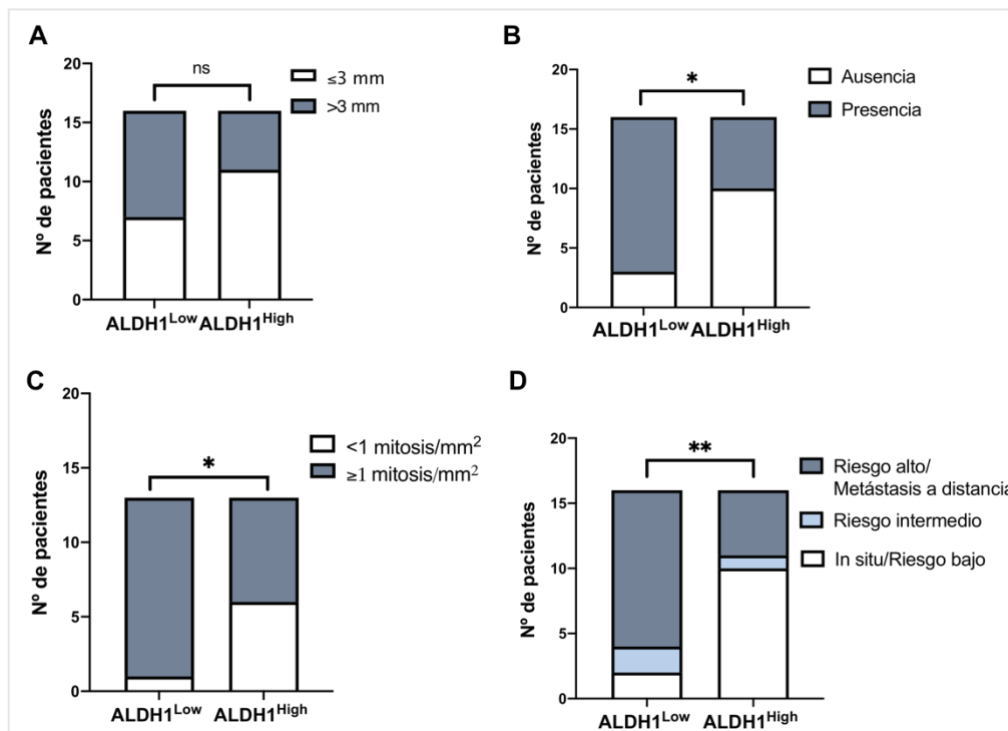


**Figura 97. Análisis de la expresión del marcador de CMT ALDH1.** (A) Imágenes representativas de la expresión de ALDH1 mediante tinción inmunohistoquímica con magenta en secciones seriadas de las biopsias de MLA, según bajo (izquierda) o alto (derecha) nivel de expresión. (B) Diagrama representativo de la distribución de los valores de H-score del marcador ALDH1. Barra de escala: 50 µm.

**3.1.2. Análisis de la expresión de ALDH1 respecto a las características clinicopatológicas de la cohorte de pacientes de MLA**

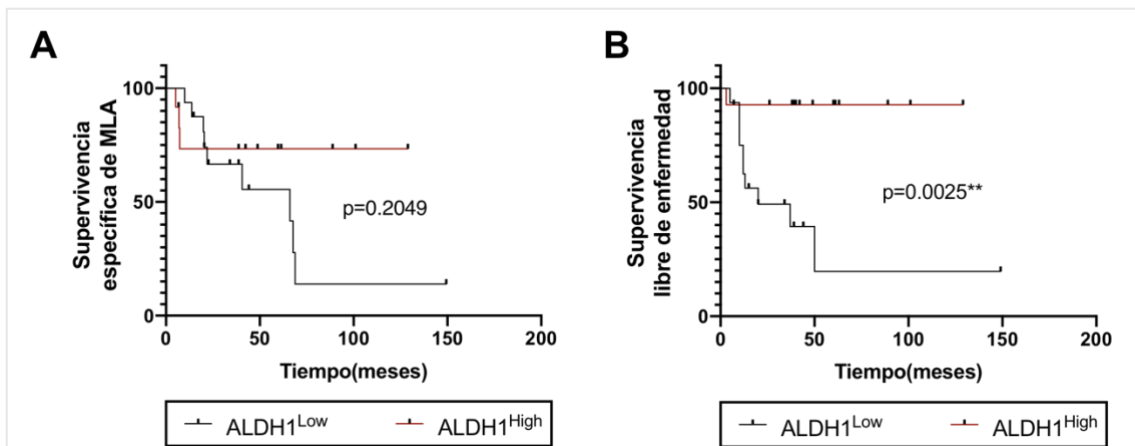
Los niveles de expresión de ALDH1 clasificados según los grupos mencionados en el apartado anterior, fueron analizados en función de las características clinicopatológicas de los pacientes (índice Breslow, ulceración, índice mitótico y riesgo) (Figura 98).

Las diferencias en cuanto al índice Breslow no fueron significativas ( $p=0.2852$ ), aunque sí que lo fueron la ulceración, en la que los pacientes con ALDH1<sup>Low</sup> (13/16) presentaron de forma significativa ( $p=0.0290$ ) mayor ulceración que aquellos con ALDH1<sup>High</sup> (6/16). También presentaron significativamente ( $p=0.0271$ ) un mayor índice mitótico los pacientes con ALDH1<sup>Low</sup> (12/13) en comparación con el grupo con ALDH1<sup>High</sup> (6/13). En cuanto al riesgo, de forma significativa ( $p=0.0139$ ), la mayoría de pacientes con riesgo alto (12/17) tuvieron bajo nivel de expresión de ALDH1, sin embargo, la mayor parte de los pacientes con tumores *in situ*/riesgo bajo (10/12) presentaron ALDH1<sup>High</sup>.



**Figura 98. Análisis de la correlación entre las características clinicopatológicas respecto a los niveles de expresión de ALDH1.** (A) Correlación del índice Breslow, (B) la ulceración, (C) el índice mitótico y (D) el riesgo respecto a los niveles de expresión de ALDH1 en las biopsias de los pacientes. El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher para las variables de 2x2 categorías, y Chi-cuadrado de Pearson para el resto (\* $p$ -valor<0.05; \*\* $p$ -valor<0.01; \*\*\* $p$ -valor<0.001).

Además, analizamos la supervivencia específica de MLA y la supervivencia libre de enfermedad respecto a los niveles de expresión de ALDH1 (Figura 99). No observamos diferencias significativas entre ambos grupos a nivel de supervivencia específica de MLA ( $p=0.2049$ ), con una supervivencia media de 57.7 (95% IC, 31.7-83.7) meses para el grupo de ALDH1<sup>Low</sup> y de 98.3 (95% IC, 68.3-128.4) meses para el de ALDH1<sup>High</sup>. Por otro lado, los pacientes con ALDH1<sup>Low</sup> presentaron de forma significativa ( $p=0.0025$ ) una menor supervivencia libre de enfermedad, en comparación a aquellos con ALDH1<sup>High</sup>, con periodos medios libres de enfermedad de 48.7(95% IC, 14.1-83.3) meses para el grupo con ALDH1<sup>Low</sup> y de 120 (95% IC, 103.0-137.0) meses.

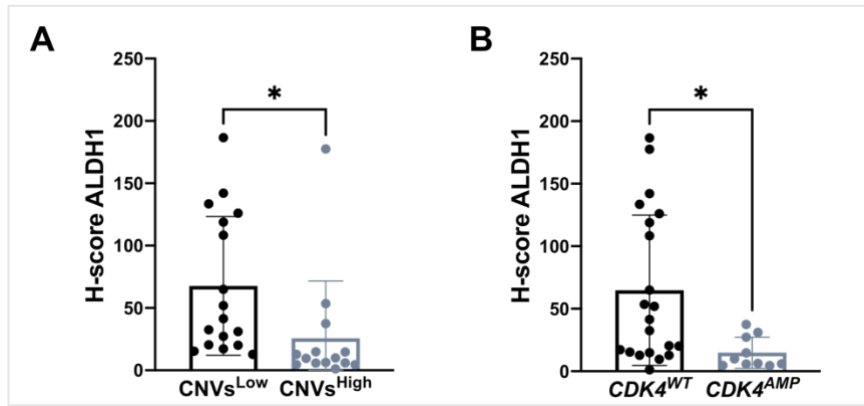


**Figura 99. Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a la expresión de ALDH1.** (A) Kaplan-Meier de la supervivencia específica de MLA y la (B) supervivencia libre de enfermedad respecto los niveles de expresión de ALDH1. El análisis estadístico de la supervivencia entre los grupos fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

### 3.1.3. Análisis de la expresión de ALDH1 en función del perfil genético de la cohorte de pacientes de MLA

A continuación, para evaluar la variación de la expresión de ALDH1 en función del perfil genético del MLA, comparamos la expresión de dicho marcador de CMT en los pacientes según el total de CNVs y la ausencia/presencia de amplificación del gen *CDK4* (Figura 100).

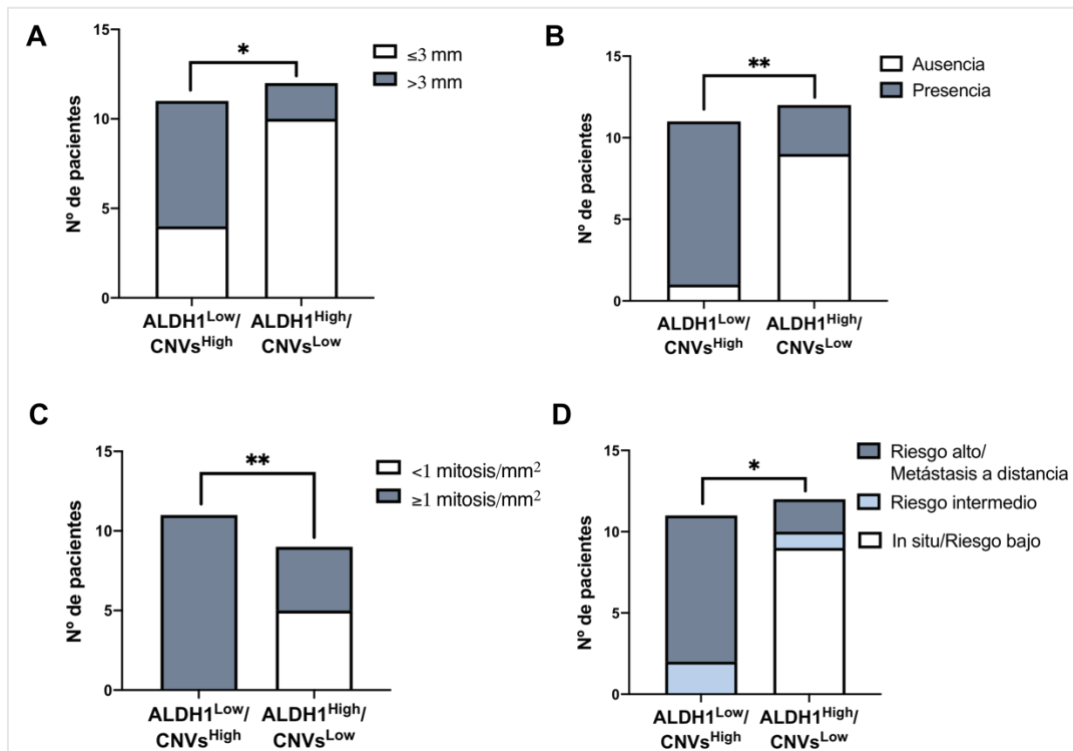
Observamos que, tanto en el caso de los pacientes CNVs<sup>High</sup> ( $p=0.0316$ ) y como en los pacientes *CDK4*<sup>AMP</sup> ( $p=0.0151$ ), los niveles de expresión de ALDH1 fueron significativamente más bajos, en comparación con los pacientes CNVs<sup>Low</sup> y *CDK4*<sup>WT</sup>.



**Figura 100. Análisis de la expresión de ALDH1 en función del perfil genético.** (A) Gráfica representativa de los niveles de expresión de ALDH1 en función del total de CNVs por paciente. (B) Gráfica representativa de los niveles de expresión de ALDH1 en función de la ausencia o presencia de amplificación en *CDK4*. El análisis estadístico de las medias de grupos independientes fue realizado mediante T-test no pareado (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

Tras este resultado, decidimos agrupar a los pacientes según lo que habíamos obtenido en el análisis anterior. Por un lado, clasificamos a los pacientes según el total de CNVs (n=23) y la expresión de ALDH1, en los grupos: ALDH1<sup>Low</sup>-CNVs<sup>High</sup> y en ALDH1<sup>High</sup>-CNVs<sup>Low</sup>. Por otro lado, también agrupamos de esta forma, la expresión de ALDH1 junto la amplificación de *CDK4* (n=18), obteniendo los grupos: ALDH1<sup>Low</sup>-*CDK4*<sup>AMP</sup> y ALDH1<sup>High</sup>-*CDK4*<sup>WT</sup>. Estos grupos de pacientes fueron analizados en función a sus características clinicopatológicas.

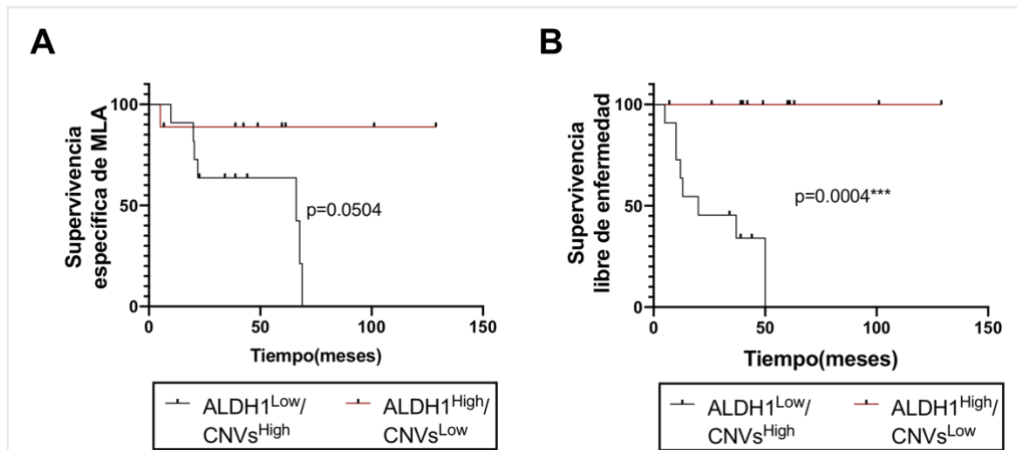
En cuanto a los grupos según la expresión de ALDH1/CNVs (*Figura 101*), obtuvimos que el índice Breslow era de forma significativa (p=0.0361) superior a 3 mm en el caso del grupo de ALDH1<sup>Low</sup>-CNVs<sup>High</sup> (7/11), en comparación con el grupo de ALDH1<sup>High</sup>-CNVs<sup>Low</sup> (2/12). La mayoría de pacientes (p=0.0028) presentaron ulceración en el grupo de ALDH1<sup>Low</sup>-CNVs<sup>High</sup> (10/11), y además todos los pacientes (p=0.0081) de este grupo presentaron un índice mitótico mayor o igual a 1 mitosis/mm<sup>2</sup> (11/11). En cuanto al riesgo (p=0.0010), todos los pacientes (9/9) del grupo ALDH1<sup>Low</sup>-CNVs<sup>High</sup> presentaron riesgo alto o intermedio, sin embargo, del grupo ALDH1<sup>High</sup>-CNVs<sup>Low</sup> la mayoría de pacientes presentaron tumores *in situ*/riesgo bajo (9/11).



**Figura 101.** Análisis de la correlación entre las características clinicopatológicas respecto a los niveles de expresión agrupados de ALDH1 y del total de CNVs. (A) Correlación del índice Breslow, (B) la ulceración, (C) el índice mitótico y (D) el riesgo respecto a los niveles de expresión de ALDH1 y el total de CNVs en las biopsias de los pacientes. El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher para las variables de 2x2 categorías, y Chi-cuadrado de Pearson para el resto (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

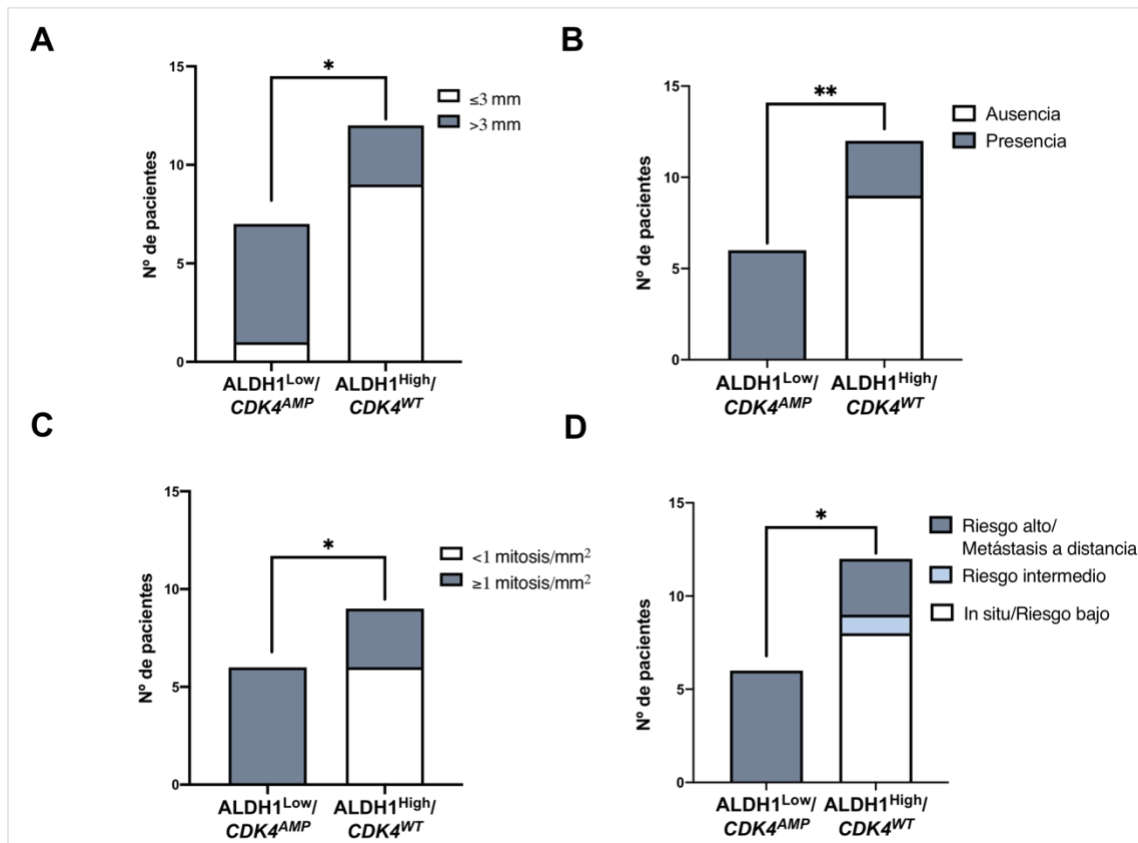
A continuación, también se analizó la supervivencia específica de MLA y la supervivencia libre de enfermedad según los grupos anteriormente descritos. La supervivencia específica de MLA en el grupo con ALDH1<sup>High</sup>-CNVs<sup>Low</sup> fue superior que en los pacientes con ALDH1<sup>Low</sup>-CNVs<sup>High</sup>, con una media de 115.2 (95% IC, 89.7-140.7) meses y de 44.5 (95% IC, 25.7-63.3) meses respectivamente, aunque las diferencias no resultaron significativas (Figura 102A).

En cuanto a la supervivencia libre de enfermedad (Figura 102B), el grupo de pacientes con ALDH1<sup>High</sup>-CNVs<sup>Low</sup> presentó una supervivencia libre de enfermedad significativamente superior (p=0.0004), que el grupo de ALDH1<sup>Low</sup>-CNVs<sup>High</sup>, y además ninguno de los pacientes del primer grupo presentaron recaídas.



**Figura 102. Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a los niveles de expresión agrupados de ALDH1 y del total de CNVs (A) Kaplan-Meier de la supervivencia específica de MLA y la (B) supervivencia libre de enfermedad respecto los niveles de expresión de ALDH1 y del total de CNVs. El análisis estadístico de la supervivencia entre los grupos fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).**

De la misma forma, analizamos las características clinicopatológicas en función de los pacientes agrupados según ALDH1/*CDK4* (Figura 103). Según los resultados, obtuvimos que el índice Breslow era de forma significativa ( $p=0.0198$ ) superior a 3 mm en el caso del grupo de ALDH1<sup>Low</sup>-*CDK4*<sup>AMP</sup> (5/6), en comparación con el grupo de ALDH1<sup>High</sup>-*CDK4*<sup>WT</sup> (3/12). Todos los pacientes ( $p=0.0090$ ) presentaron ulceración y índice mitótico mayor o igual a 1 mitosis/mm<sup>2</sup> en el grupo de ALDH1<sup>Low</sup>-*CDK4*<sup>AMP</sup> (6/6). En cuanto al riesgo ( $p=0.0111$ ), todos los pacientes (9/9) del grupo ALDH1<sup>Low</sup>-*CDK4*<sup>AMP</sup> presentaban riesgo alto (6/6), sin embargo, del grupo ALDH1<sup>High</sup>-*CDK4*<sup>WT</sup> la mayoría de pacientes presentaron tumores *in situ*/riesgo bajo (8/11).

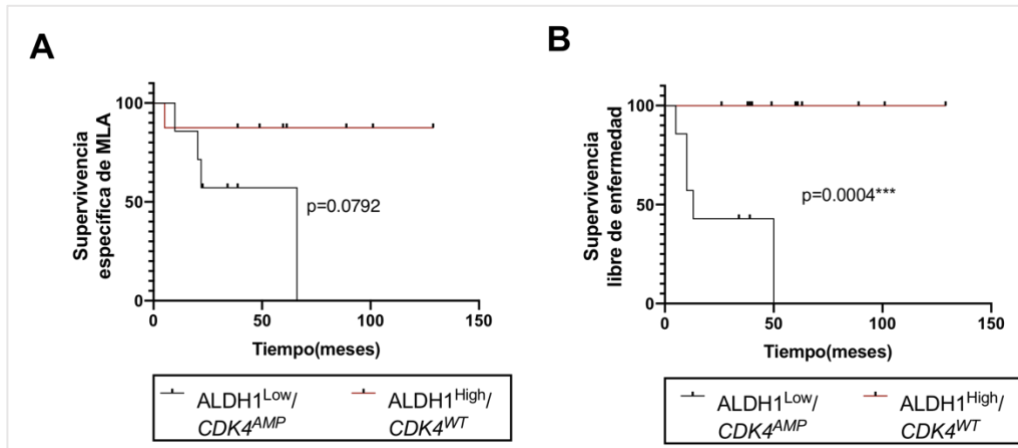


**Figura 103.** Análisis de la correlación entre las características clinicopatológicas respecto a los niveles de expresión agrupados de ALDH1 y la presencia de amplificación en *CDK4*. (A) Correlación del índice Breslow, (B) la ulceración, (C) el índice mitótico y (D) el riesgo respecto a los niveles de expresión de ALDH1 y la ausencia/presencia de amplificación de *CDK4* en las biopsias de los pacientes. El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher para las variables de 2x2 categorías, y Chi-cuadrado de Pearson para el resto (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

Posteriormente, también se analizó la supervivencia específica de MLA y la supervivencia libre de enfermedad según los grupos anteriormente descritos. La supervivencia específica de MLA en el grupo con ALDH1<sup>High</sup>-*CDK4*<sup>WT</sup> fue superior que en los pacientes con ALDH1<sup>Low</sup>-*CDK4*<sup>AMP</sup>, con una media de 113.5 (95% IC, 85.1-141.9) meses y de 41.6 (95% IC, 18.9-64.4) meses respectivamente, aunque las diferencias no resultaron significativas (p=0.0792) (Figura 104A).

En cuanto a la supervivencia libre de enfermedad (Figura 104B), los pacientes con ALDH1<sup>High</sup>-*CDK4*<sup>WT</sup> presentaron una supervivencia libre de enfermedad significativamente superior (p<0.001), que el grupo de ALDH1<sup>Low</sup>-*CDK4*<sup>AMP</sup>, además, ninguno de los pacientes del grupo ALDH1<sup>High</sup>-*CDK4*<sup>WT</sup> presentaron recaídas.





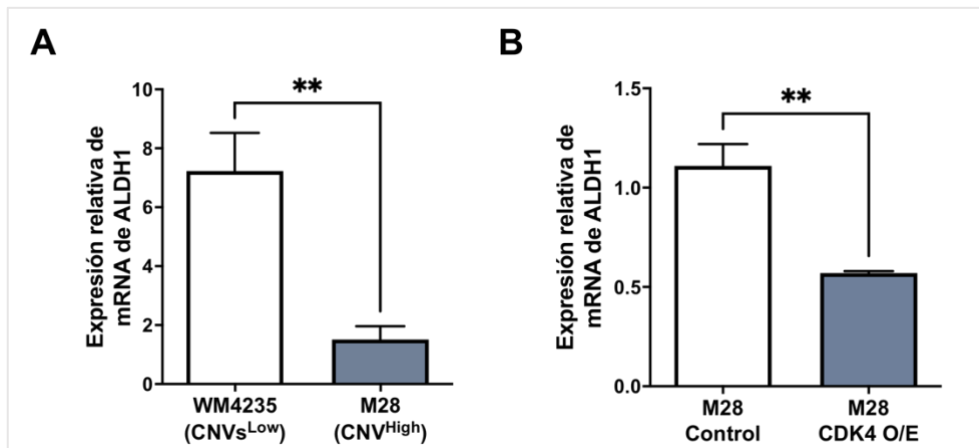
**Figura 104.** Análisis de la supervivencia específica de MLA y de la supervivencia libre de enfermedad respecto a los niveles de expresión agrupados de ALDH1 y la presencia de amplificación en *CDK4*. (A) Kaplan-Meier de la supervivencia específica de MLA y la (B) supervivencia libre de enfermedad respecto los niveles de expresión de ALDH1 y la ausencia/ presencia de amplificación en *CDK4*. El análisis estadístico de la supervivencia entre los grupos fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

### 3.1.4. Análisis de la expresión de ALDH1 en función del perfil genético de las líneas celulares de MLA

A partir de los resultados obtenidos de la expresión de ALDH1 en nuestra cohorte de pacientes, decidimos evaluar la relación existente entre los niveles de ALDH1 y el total de CNVs, así como la ausencia/presencia de amplificación de *CDK4* en las líneas celulares humanas de MLA, para así incrementar la consistencia de los resultados.

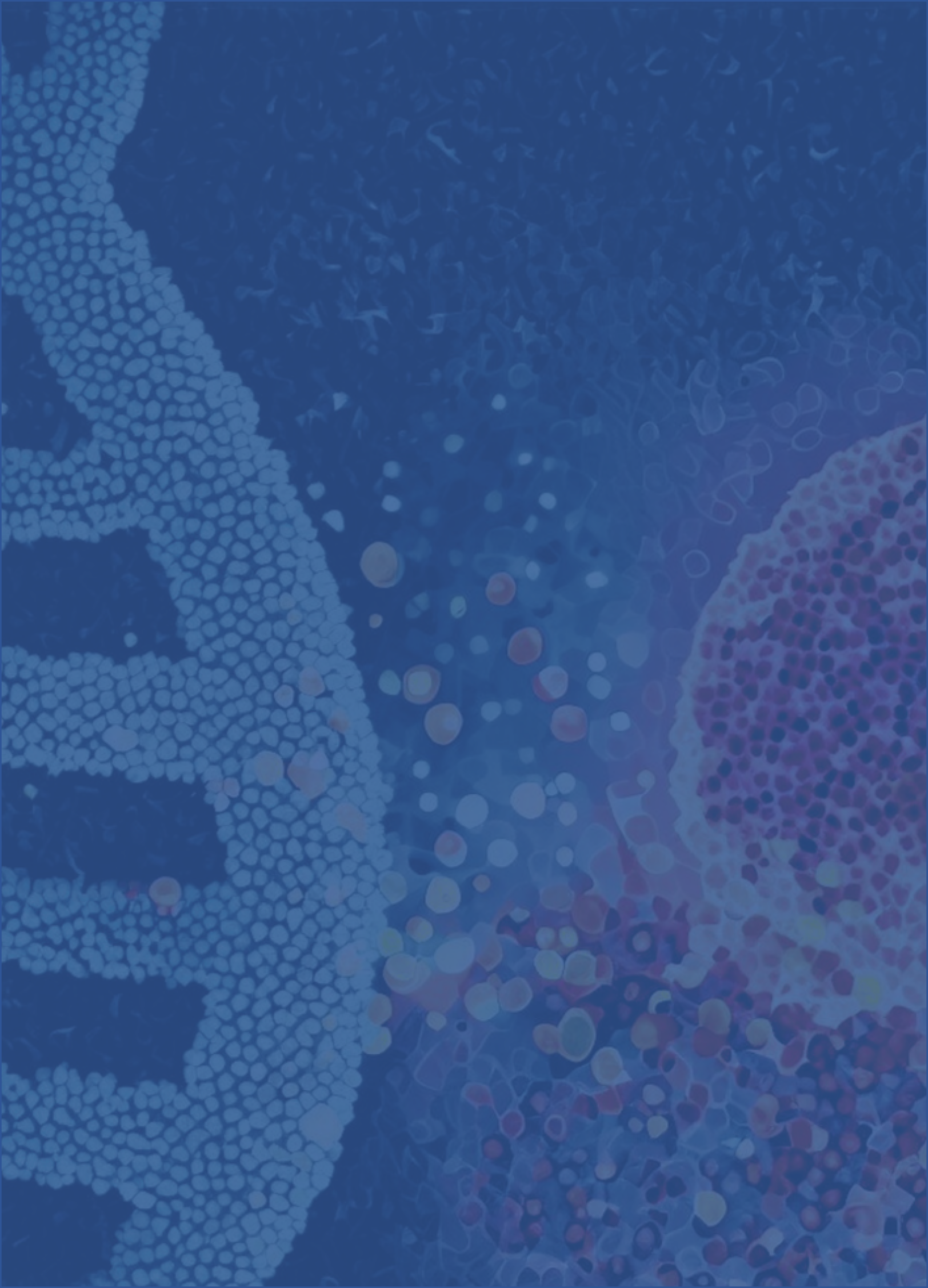
Por un lado, evaluamos la expresión del marcador respecto al total de CNVs, en la línea WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>) y en la línea M28(CNVs<sup>High</sup>) mediante RT-qPCR. Obtuvimos, de la misma forma que en los pacientes, que los niveles de expresión de ALDH1 incrementaban de forma significativa (p=0.0019) en la línea WM4235 en comparación con la línea M28 (Figura 105A).

Asimismo, evaluamos la expresión de ALDH1 respecto a nuestro modelo *in vitro* de sobreexpresión de *CDK4*, ya que la amplificación en el gen correlacionó con una mayor expresión de *CDK4* en pacientes. Los resultados mostraron que en la línea M28 *CDK4* O/E se produjo una disminución significativa (p=0.0011) de los niveles de ALDH1 respecto al control tras la infección lentiviral, de forma similar a lo ocurrido en pacientes en cuanto a la ausencia/presencia de amplificación del gen en cuestión (Figura 105B).



**Figura 105. Análisis de la expresión de ALDH1 en las líneas celulares de MLA en función del total de CNVs y la sobreexpresión de CDK4.** (A) RT-qPCR de los niveles de expresión relativa de mRNA de ALDH1 en la línea celular WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>) y en la línea M28 (CNVs<sup>High</sup>). (B) RT-qPCR de los niveles de expresión relativa de mRNA de ALDH1 en la línea celular M28 Control y CDK4 O/E. El análisis estadístico fue realizado mediante T-test no pareado (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).





---

# DISCUSIÓN

---



## PRIMERA PARTE. ESTUDIO DEL PERFIL GENÉTICO, MICROAMBIENTE TUMORAL Y SECRETOMA DEL MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL

---

El melanoma lentiginoso acral (MLA) es una subvariante clinicopatológica de melanoma cutáneo (MC) poco común, la cual se caracteriza por su patrón de crecimiento lentiginoso, así como por su localización en zonas acrales glabras, concretamente en las palmas de las manos, las plantas de los pies y en zonas subungueales. En términos de pronóstico, los pacientes con MLA presentan un peor pronóstico en comparación con el resto de MCs, por su diagnóstico en estadios avanzados y su escasa respuesta a los tratamientos antitumorales existentes. La etiopatogenia de este tumor, el cual no ha sido relacionado con la exposición solar, y sus características genéticas particulares, hacen del MLA un tipo de melanoma que carece de terapias específicas efectivas, y que es menos susceptible a tratamientos basados en inmunoterapia.

Todas las particularidades de este tipo de tumor, junto a su baja incidencia ha llevado al MLA a ser un tumor poco estudiado, con factores predisponentes, agentes causales y mecanismos mutacionales en su mayoría desconocidos. Esto resalta la necesidad de estudios más exhaustivos para comprender mejor su patogénesis, identificar biomarcadores específicos y desarrollar terapias más efectivas y personalizadas que las actuales.

En la primera parte del presente trabajo, nos centramos en estudiar en profundidad una cohorte de 33 pacientes diagnosticados de MLA en la región de Lleida, llevando a cabo una descripción clinicopatológica de dicha cohorte. En relación a las características epidemiológicas, estudios previos han descrito que la edad media de diagnóstico suele situarse alrededor de los 60 años, sin embargo, en nuestra cohorte la edad media de diagnóstico fue algo superior, situándose alrededor de los 70 años de edad<sup>70,146</sup>. En cuanto al sexo, en un estudio reportado por Huang et al. no observaron diferencias de incidencia entre sexos, de forma similar que en nuestro estudio, aunque sí que describieron un aumento de la incidencia en hombres a partir de los 80 años, lo cual no fue observado en nuestra cohorte. Además, la descripción de la cohorte reveló resultados consistentes con investigaciones previas en cuanto a localización anatómica del MLA, observando que, su diagnóstico fue en su mayoría en los pies, con localización específica en la zona plantar o talón, y cuando su diagnóstico fue en las manos, se observó principalmente en zonas subungueales<sup>35,63</sup>.

Tanto la AJCC como diversos estudios han demostrado que el índice Breslow y la ulceración son los predictores clínicos e histopatológicos más potentes a nivel de pronóstico del MC, incluyendo al MLA<sup>70,71,73,147</sup>. En nuestro estudio, realizamos un análisis de supervivencia específica de MLA, mediante el cual corroboramos que, del total de variables evaluadas, el índice Breslow y la ulceración tuvieron un impacto significativo en ésta, confirmando la potencia de ambas variables a nivel pronóstico. También analizamos el riesgo asociado al estadio AJCC al momento del diagnóstico como factor pronóstico de MLA, obteniendo resultados significativos a nivel de la supervivencia, como ya habían descrito Huang et al.<sup>70</sup> Al analizar la supervivencia libre de enfermedad, solo el índice Breslow y el riesgo asociado al estadio AJCC resultaron ser factores pronósticos. Por otro lado, Howard et al. reportó que los pacientes con MLA en zonas subungueales tenían una supervivencia inferior que el resto de pacientes con MLA en otras zonas, hecho que no pudimos constatar en nuestra cohorte, ya que no obtuvimos resultados significativos en cuanto a la localización<sup>75</sup>.

Aunque la etiología del MLA es controvertida, y los factores de riesgo no quedan claros en la comunidad científica, dicha etiología no parece estar relacionada con la exposición solar como otros tipos de MCs, tanto por su localización no expuesta a radiación, como por la menor presentación de mutaciones relacionadas con la radiación UV, como son la mutación BRAF<sup>V600E</sup> y las mutaciones en NRAS<sup>62</sup>. Sin embargo, diversos estudios han propuesto que tener un historial de traumatismos, o estar sometido a estrés físico y/o mecánico podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de MLA. En nuestro caso, como no pudimos tener información sobre el historial de traumatismos, decidimos investigar sobre la profesión de los pacientes de nuestra cohorte, para analizar si existía algún tipo de patrón en cuanto a las ocupaciones ejercidas y su relación con el trauma<sup>35,76</sup>. Es cierto que solo pudimos obtener información de 23/33 pacientes de la cohorte, pero aún en esta muestra reducida, observamos que la mayoría de profesiones se agruparon en relación al sector agropecuario, seguido del sector de la construcción y personal de limpieza. Estos hallazgos fueron similares a los descritos por Yun et al. que reportó un 41.5% de pacientes con profesiones relacionadas con la agricultura en una muestra de 313 casos de MA<sup>35</sup>. A partir de la agrupación de las profesiones, vimos un patrón en cuanto a que, la mayoría de profesiones estaban relacionadas con la exposición a traumatismos o a químicos.

La asociación del MLA y la exposición a químicos no ha sido apenas estudiada, aunque sí que se había relacionado en algunos casos con estrés físico, en el que se incluía la exposición a abrasiones químicas<sup>35</sup>. Además, los pacientes expuestos a este agente presentaron el tumor mayoritariamente en una situación diferente a la subungueal, lo cual no había sido aún



reportado, y que podría también ser coherente con estudios que han descrito las zonas subungueales como más susceptibles a traumatismos<sup>35,76,148</sup>. Aunque esto último no fue corroborado en nuestra cohorte, ya que no observamos diferencias significativas en cuanto a localización en relación a la exposición a traumatismos.

No obstante, aunque parece que los pacientes con MLA presentan similitudes en términos de ocupación, pudiendo ser agrupadas alrededor de la exposición a traumatismos o a químicos, no observamos diferencias significativas en cuanto a pronóstico en los grupos estudiados. Por lo que, podríamos hipotetizar que estos factores podrían considerarse factores etiológicos, pero no factores pronósticos de la enfermedad, aunque esta afirmación no está libre de controversia, ya que hay estudios que confirman y que contradicen esta hipótesis<sup>76,78</sup>.

La patogénesis del mecanismo mediante el cual el traumatismo o el estrés físico promovería el desarrollo de MLA, es desconocido, aun así, se ha observado en varios estudios que las heridas crónicas y los traumatismos inducen inflamación local, lo cual podría alterar las células inmunitarias del TME<sup>149</sup>. Además, se ha visto que los inflamomas involucrados en daño tisular promueven el desarrollo de melanoma. Por otra parte, también se ha sugerido que los traumatismos de repetición podrían promover una activación recurrente del ciclo celular, provocando un acortamiento precoz de los telómeros y pudiendo llevar a una sobreexpresión de TERT como compensación<sup>150</sup>. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales sobre los roles patogénicos inducidos por traumatismos y estrés físico.

Debido a la etiopatogenia diferencial respecto a otros MCs, el MLA tiene un perfil genético particular, caracterizado por presentar un número inferior de SNVs, pequeñas inserciones/delecciones, y por presentar un incremento de reordenamientos estructurales y CNVs<sup>79</sup>. En términos generales, el análisis de las CNVs es una herramienta relevante para el diagnóstico molecular del cáncer, y estas aberraciones en el número de copias de genes podrían revelar dianas terapéuticas o marcadores de resistencia a fármacos en varios tipos de neoplasias<sup>151</sup>. Concretamente, se ha observado que las pérdidas de copias se dan de forma significativa en genes supresores tumorales, y las ganancias en oncogenes<sup>152</sup>. En nuestra investigación, nos centramos en el análisis de la dosis génica (o CNVs) de oncogenes en las biopsias de nuestra cohorte, para describir el perfil genético de este tumor, y de esta manera estudiar la asociación de este perfil con la clínica y el pronóstico del MLA.

El estudio de la dosis génica mediante la técnica MLPA, nos permitió estudiar las CNVs en una muestra de 24 oncogenes de forma simultánea, así como la mutación *BRAF*<sup>V600E</sup>. En lo referido al total de CNVs detectadas, encontramos que las amplificaciones superaron en número a las deleciones. Esto es coherente con lo reportado en otros estudios sobre que las amplificaciones se dan principalmente en oncogenes<sup>152</sup>. Además, en un estudio multicéntrico, en el que se estudiaron las CNVs en el genoma completo de 42 pacientes de MA (83% lentiginosos), observaron igualmente un mayor número de amplificaciones (66%) respecto al total de CNVs, con lo cual podríamos decir que las amplificaciones son predominantes en el genoma de este tipo de melanoma, independientemente de que sean o no oncogenes<sup>153</sup>.

*CCND1* fue el gen más amplificado en nuestra cohorte, seguido de *MYC* y *CDK4*. Tanto *CCND1* como *CDK4*, suelen ser los oncogenes más alterados a nivel de CNVs en MLA, según se ha descrito en estudios previos, ambos implicados en la transición del ciclo celular de G1 a S<sup>62,83</sup>. Además de *CCND1* y *CDK4*, otros oncogenes como *CCND2* y *MDM2* estuvieron entre los genes más amplificados de la cohorte, ambos también implicados en la transición hacia la fase S del ciclo celular, lo que podría hacernos pensar que esta vía pudiese ser importante en la patogénesis del MLA. Asimismo, la mayoría de pacientes con *CDK4*, *CCND1* y *MDM2* amplificado, presentaron 4 o más copias de estos genes. En cuanto a la mutación *BRAF*<sup>V600E</sup>, fue poco frecuente en nuestra cohorte, en concordancia con la literatura previa, en la que se ha descrito una menor frecuencia de esta mutación en MLA respecto al resto de MCs<sup>79,81</sup>.

Dado el alto número de CNVs detectadas, agrupamos la cohorte según el total de CNVs/paciente que fueron halladas, comparándolas con las características epidemiológicas y clinicopatológicas de la cohorte. Primeramente, observamos que los hombres presentaron un mayor número de CNVs que las mujeres, resultado que nos llevó a pensar que esta diferencia entre sexos viniese dada por el tipo de profesión al que se dedicaban. Aunque no obtuvimos resultados significativos, observamos una tendencia en cuanto a que las mujeres, en su mayoría, se dedicaban a profesiones relacionadas con la exposición a químicos, y que, además esta exposición a químicos no estuvo relacionada con el total de CNVs. Sin embargo, si que observamos que todos los pacientes expuestos a traumatismos presentaron un alto número de CNVs. Con lo cual, estos resultados podrían sugerir, que el alto número de CNVs en hombres podría estar relacionado con la exposición a traumatismos y, por tanto, en este caso, con la profesión. Esta asociación no se ha observado en estudios previos hasta el momento, no obstante, la muestra es limitada en tamaño, y habría que aumentar la cohorte, así como profundizar en el estudio de la historia de traumatismos y su relación con el total de CNVs.

Además, obtuvimos que las biopsias con CNVs<sup>High</sup> presentaban índices Breslow superiores y ulceración, lo cual había sido reportado por Elefanti et al. en el mismo estudio multicéntrico mencionado con anterioridad<sup>153</sup>. No obstante, en nuestro estudio también observamos que excepto un paciente, todos los que presentaron CNVs<sup>High</sup> tuvieron igual o más de una mitosis/mm<sup>2</sup>, y que la mayoría de ellos fueron agrupados dentro de la categoría riesgo alto/metástasis a distancia en relación al estadio AJCC. En cuanto al pronóstico, los pacientes con CNVs<sup>High</sup> tuvieron una supervivencia específica de MLA y una supervivencia libre de enfermedad significativamente inferior, y, por tanto, un peor pronóstico de la enfermedad. Aunque en MLA, aún no se había relacionado el total de CNVs con un peor pronóstico, sí que se ha descrito en otros tipos de tumores<sup>154,155</sup>. De hecho, en cáncer gástrico, se ha reportado que los pacientes con metástasis ganglionares tenían mayor número de CNVs que aquellos que no presentaban metástasis<sup>155</sup>. Estas variaciones estructurales también tienen un papel importante en la tumorigénesis como se ha demostrado, por ejemplo, en cáncer gástrico, hepatocelular, ovárico, colorrectal y de vejiga, entre otros<sup>155</sup>. Además, como dato relevante, ninguno de los pacientes de nuestra cohorte diagnosticados de MLA *in situ*, presentaron alteraciones estructurales en el ADN, lo cual podría sugerir una asociación entre el incremento de CNVs y el incremento del grosor del tumor, y por tanto con la progresión del mismo.

En cuanto al análisis de ganancia de copias en los genes más amplificados en la cohorte, obtuvimos que la mayoría de biopsias con *CCND1*<sup>AMP</sup> tuvieron localización diferente a la subungueal, a diferencia de Holman et. al que reportó un mayor número de amplificaciones en MAs diagnosticados en áreas subungueales<sup>156</sup>. También observamos, que de forma significativa el gen *MYC* se detectó mayoritariamente en pacientes mayores de 75 años, sin haber sido reportado previamente en la literatura.

En cuanto al gen *EGFR*, los pacientes con tumores *in situ* y de bajo grosor presentaron una dosis génica diploide en su mayoría, y, por otro lado, los pacientes que presentaron *EGFR*<sup>AMP</sup> tuvieron mayor frecuencia de recaídas que el resto de pacientes. Aunque la amplificación en *EGFR* no se ha relacionado con pronóstico en MLA, sí que se ha relacionado con mal pronóstico en MC maligno no MLA, así como con la tumorigénesis, y con la hiperprogresión de diversos tipos de tumores tras ser tratados con inhibidores de puntos de control del S1<sup>157,158</sup>. Los pacientes con amplificación en el gen *MDM2* presentaron una peor supervivencia y una menor supervivencia libre de enfermedad. Este gen está ampliamente amplificado en melanomas con situación acral, y está relacionado con hiperprogresión tras tratamientos de inmunoterapia, así como con mal

pronóstico en glioblastoma y en varios tipos de sarcoma<sup>159-161</sup>, no obstante, no ha sido relacionado con pronóstico en MLA.

La amplificación de *CDK4* fue la amplificación oncogénica que más asociaciones significativas presentó respecto a las características clinicopatológicas y el pronóstico de los pacientes. Observamos que, los pacientes *CDK4<sup>AMP</sup>* tenían mayor grosor tumoral, presencia de ulceración, mayor número de mitosis/mm<sup>2</sup> y un riesgo asociado al estadio AJCC incrementado respecto a los pacientes con la versión del gen sin amplificar. Además, la supervivencia específica de MLA y la supervivencia libre de enfermedad fue marcadamente inferior en el grupo con la alteración. Recientemente, Huang et al. han publicado un estudio realizado con una muestra de 90 pacientes de MA (44.4% MLA) en China, en el cual reportan la amplificación en el gen *CDK4* como factor independiente asociado a una supervivencia global más baja<sup>162</sup>. Sin embargo, no se han observado asociaciones de esta amplificación respecto a las características clinicopatológicas descritas en nuestro estudio, en otras investigaciones previas. Por otro lado, describimos una correlación entre la amplificación en el gen *CDK4* y el total de CNVs, en la cual la mayoría de pacientes con *CDK4<sup>AMP</sup>* se encontraban en el grupo con CNVs<sup>High</sup>. Al analizar en profundidad qué perfil genético poseían los pacientes con *CDK4<sup>WT</sup>* y CNVs<sup>High</sup>, detectamos que todos los pacientes tenían alguna alteración relacionada con la progresión del ciclo celular, la mayoría en *CCND1* y un paciente en *MDM2*. Por tanto, teniendo en cuenta que los pacientes con CNVs<sup>High</sup> tienen un peor pronóstico, y que todos ellos presentan alteraciones estructurales en genes relevantes en la transición del ciclo celular de G1 a S, podríamos considerar esta vía como una vía clave para la supervivencia y progresión del MLA.

En cuanto a la co-amplificación de genes en MLA, nuestros resultados revelaron que todos los pacientes con amplificación en *MDM2* (7/8), exceptuando uno, presentaron también amplificado el gen *CDK4*. Esta co-amplificación había sido hallada en estudios previos, en los que se observaron amplificaciones en la región cromosómica 12q14.1-12q15 que incluía tanto a *CDK4* (12q14.1) como a *MDM2* (12q14.3), ya que ambos se encuentran muy cercanos entre sí en el mismo cromosoma. Esta amplificación conjunta se ha observado tanto en MC primario en general, como en MA en particular, así como en otros tipos de tumor como el neuroblastoma<sup>87,163,164</sup>. Estos resultados previos arrojan validez externa a los resultados obtenidos en nuestro estudio, y, por otro lado, nuestros resultados también ponen de relieve la importancia que ha de tener la amplificación de este segmento cromosómico, pues ambas amplificaciones por separado influyen de forma significativa en el pronóstico de los pacientes de MLA en nuestra cohorte. No obstante, al agrupar los pacientes según tuviesen la

amplificación conjunta o solo la tuviesen en *CDK4*, no se apreció que el grupo con la co-amplificación tuviese peor pronóstico de forma significativa en relación a tener la amplificación de forma independiente.

A partir de la caracterización genética de la cohorte, decidimos caracterizar líneas celulares humanas de MLA para desarrollar un modelo en base a los resultados obtenidos de los pacientes, y así realizar un estudio *in vitro* de las mismas según su perfil genético. La caracterización de la dosis génica de oncogenes en las ocho líneas reveló un porcentaje mayoritario de amplificaciones, de forma similar a la cohorte de pacientes. Los genes más amplificados fueron *BRAF* y *SMO*, los cuales se presentaron co-amplificados en todos los casos, ambos localizados en el brazo largo del cromosoma 7, por lo que probablemente se diese una amplificación de toda la región. Aunque las mutaciones en *BRAF* son escasas en MLA, sí que habían sido previamente descritas las amplificaciones en este gen<sup>79,81</sup>. No obstante, entre los genes más amplificados en las líneas estuvieron *MDM2*, *CCND1*, *CDK4* y *CCND2*, siendo las amplificaciones en *MDM2* y *CDK4* las que mayor número de copias presentaron, categorizándose con mayor frecuencia dentro del grupo de igual o más de 4 copias del gen, asemejándose a lo observado en la cohorte de pacientes.

Aunque conseguimos caracterizar genéticamente ocho líneas celulares, los estudios *in vitro* de MLA son limitados, debido a la escasez de líneas celulares, siendo la mayoría derivadas de lesiones primarias o derivadas de PDX, aunque también de lesiones metastásicas<sup>57,82,84</sup>. Esta limitación no solo es debida a la baja incidencia de este tumor, sino también a la dificultad de su establecimiento y mantenimiento *in vitro*. De hecho, el manejo en cultivo de estas células resultó ser complejo, por un lado, por su reducida supervivencia tras un bajo número de pases, como por el sobrecrecimiento de fibroblastos en el caso de las líneas de cultivos primarios. Esta dificultad ha sido previamente reportada en varios estudios, y se cree que puede deberse a que las líneas de melanoma dependen de un conjunto de factores de crecimiento específicos que difiere del de otras células de MC<sup>62</sup>.

Categorizamos las líneas según su perfil genético para el desarrollo de nuestro modelo en base a los resultados obtenidos del estudio de los pacientes, por un lado, según las CNVs y, por otro lado, según la amplificación en *CDK4*. Para el modelo de CNVs, solo conseguimos mantener una línea con CNVs<sup>High</sup> (M28), y otra con CNVs<sup>Low</sup> (WM4235), sin embargo, los ensayos de migración, invasión y proliferación para caracterizar el modelo no se llevaron a término por las dificultades con la línea CNVs<sup>Low</sup>.

Paralelamente, desarrollamos un modelo *in vitro* de sobreexpresión de CDK4 mediante un vector lentiviral, ya que carecíamos de líneas con *CDK4<sup>AMP</sup>*. Este modelo resultó validado tras comprobar mediante IHQ que existía una correlación entre la amplificación y la expresión de este gen, la cual había sido descrita previamente en estudios de otros tumores como en cáncer de pulmón y en liposarcoma<sup>165,166</sup>.

En investigaciones previas se ha descrito que la sobreexpresión no solo promueve la tumorigénesis, como se ha demostrado en modelos animales de cáncer de piel, sino que interviene en la supervivencia del tumor<sup>167,168</sup>. Respecto a nuestro modelo, observamos un incremento en la proliferación, supervivencia y transición hacia la fase S del ciclo, resultados que mostraron una concordancia con la función de CDK4 descrita en la literatura<sup>168,169</sup>. Además, describimos un aumento de la migración e invasión de las células CDK4 O/E, los cuales son coherentes, con los resultados expuestos con anterioridad, en los que obtuvimos que los pacientes con *CDK4<sup>AMP</sup>* tenían menor supervivencia específica de MLA y menor supervivencia libre de enfermedad, en relación a una mayor progresión del tumor.

La caracterización genética (CNVs y amplificación de CDK4) de la cohorte de pacientes como factor pronóstico y clinicopatológico, nos reveló la importancia de la genética del MLA en su biología y progresión, no solo en comparación con otros MCs, sino entre grupos de pacientes de MLA. Por otro lado, a partir de las dificultades encontradas en el mantenimiento de las líneas celulares de MLA, formulamos la hipótesis de que las células de este tumor pudiesen tener una fuerte dependencia del TME, ya que se ha demostrado que éste tiene un papel crucial en el crecimiento, supervivencia, invasión y diseminación del tumor en fenotipos tumorales agresivos<sup>97,103,115</sup>. Además, los estudios sobre TME en MLA son limitados, siendo la mayoría de MA. Además, cabe destacar como dato relevante, que el TME en MA es mucho más inmunosupresor que en el resto de MCs, en los que es muy inmunogénico<sup>170</sup>. Por ello, a partir de nuestros resultados y con la información previa reportada, caracterizamos el TME y el secretoma del MLA según su perfil genético, ya que esta caracterización podría proporcionar biomarcadores útiles en diagnóstico, tratamiento y monitorización de respuestas a tratamientos.

En primer lugar, estudiamos el secretoma de las líneas celulares, ya que el estudio de los factores secretados es crucial en la comunicación tumor-TME<sup>99</sup>, además el secretoma del MLA, no ha sido apenas estudiado. Los resultados del estudio del secretoma en las líneas celulares según las

CNVs arrojaron diferencias significativas en cuanto a secreción entre la línea CNVs<sup>High</sup> y CNVs<sup>Low</sup>, sin embargo, no observamos diferencias de secreción en el modelo de sobreexpresión de CDK4. Respecto a esto último, podría ser que la infección lentiviral afectase a la secreción de estas células, y por ello observásemos un perfil secretor similar entre líneas.

En cuanto al secretoma de la línea con CNVs<sup>High</sup> presentaba un perfil marcadamente protumoral e inmunosupresor en relación a la otra línea, que presentó un perfil más antitumoral. Aunque previamente, había sido reportado un TME más inmunosupresor en MLA, no había sido estudiado a nivel secretor ni asociado a un elevado número de CNVs<sup>170</sup>. Los factores solubles más secretados en la línea CNVs<sup>High</sup> fueron, por un lado, PARC, quimioquina implicada en la polarización de macrófagos hacia fenotipo M2, células implicadas en la invasión, migración y en la estimulación de angiogénesis, y, por otro lado, VEGF, clave en la proliferación de células endoteliales y en promover la angiogénesis<sup>125,126</sup>. PARC, no había sido relacionada previamente con MLA, sin embargo, en el caso de VEGF, en un estudio previo se había observado una mayor expresión de este marcador en MA y MN, en relación al MES<sup>171</sup>.

Los resultados obtenidos mediante GSEA respecto a la línea CNVs<sup>High</sup> concordaron con su perfil secretor protumoral, ya que el análisis mostró correlación directa de este perfil con la proliferación endotelial, mostrando un perfil predominantemente proangiogénico. También se observó correlación directa del secretoma de esta línea celular con conjuntos de genes de diferenciación mieloide. Esta observación, junto con la elevada secreción de PARC, podría llevarnos a pensar que el secretoma de las líneas CNVs<sup>High</sup> podría modular el TME hacia un enriquecimiento de M2-like TAMs, ya que la línea CNVs<sup>High</sup> tiene un perfil secretor de citoquinas relacionadas con fenotipo M2, y la línea CNVs<sup>Low</sup> con fenotipo M1. Aunque, hasta donde sabemos, no hay estudios del secretoma del MLA en relación al perfil genético, sí que se había reportado previamente, que pacientes con MLA presentaban un número superior de macrófagos M2 respecto a pacientes diagnosticados con MES<sup>172</sup>. Por otro lado, la línea CNVs<sup>Low</sup> presentó un perfil secretor antitumoral, con bajos niveles de secreción de factores proangiogénicos, con un perfil relacionado con la polarización de macrófagos proinflamatorios M1 y relacionada con procesos de apoptosis. El perfil hallado en esta línea tiene coherencia con el fenotipo menos agresivo de los tumores con CNVs<sup>Low</sup> de los pacientes de nuestra cohorte, de la misma forma que, el perfil protumoral, proangiogénico y relacionado con macrófagos inmunosupresores M2 es coherente con el mal pronóstico de los pacientes con CNVs<sup>High</sup>.

Para confirmar la funcionalidad del secretoma de cada línea en relación a los diferentes fenotipos de macrófagos, llevamos a cabo una polarización *in vitro* de macrófagos extraídos de donantes sanos. La expresión de marcadores M1 fue promovida de la misma forma por ambas líneas, así como por el control, lo cual podría indicar que los macrófagos tienden a polarizarse *in vitro* hacia fenotipo M1, aunque observásemos que el perfil secretor de la línea CNVs<sup>Low</sup> estuviese más relacionado con macrófagos M1. Por otro lado, mediante la polarización *in vitro* de macrófagos con MCs de las líneas celulares, confirmamos que los factores solubles secretados por la línea CNVs<sup>High</sup> promovían la expresión de CD163 y CD206 en mayor medida que la línea CNVs<sup>Low</sup>, y por tanto promovían una mayor polarización de los macrófagos a fenotipo M2.

No obstante, aunque nuestros resultados del estudio del secretoma y del TME son coherentes con la clínica observada en los pacientes según su perfil genético, nuestro estudio *in vitro* fue limitado por el número de líneas celulares utilizadas. Aunque serían necesarios estudios con una muestra superior para aumentar la consistencia de nuestros resultados, estos nos ofrecen información novedosa como punto de partida en el estudio del secretoma del MLA.

Paralelamente, realizamos un estudio preliminar en relación a los CAFs, el tipo celular más abundante del componente estromal del TME, en el que evaluamos el papel del secretoma de las líneas de MLA según su perfil genético, en la activación de fibroblastos hacia CAFs. No obtuvimos resultados significativos a nivel expresión de ninguno de los marcadores de CAFs estudiados, ni respecto al control ni entre ambas líneas celulares. No obstante, no podemos descartar que los CAFs no tengan un papel importante en MLA, ya que nuestros estudios *in vitro* son limitados, y sería óptimo aumentar el número de líneas celulares, así como realizar una caracterización del estroma en las biopsias de los pacientes. De hecho, recientemente se ha confirmado que los CAFs tienen un papel importante en el desarrollo de metástasis en melanoma; y en MA, aunque los estudios son escasos, se han reportado tres subclusters de CAFs, que incluyó a myoCAF, iCAF y una variante diferente CTGF+ CAF, la cual presentó una mayor influencia sobre los *M2-like TAMs*<sup>112,120</sup>. Por lo que, a pesar de los resultados obtenidos *in vitro*, podríamos analizar marcadores inmunohistoquímicos para identificar CAFs (FAP,  $\alpha$ -SMA) en las biopsias de los pacientes, ya que los estudios enfocados hacia este componente del estroma nos ofrecerían una visión global del papel del TME en el MLA y su impacto a nivel pronóstico.



A partir de los resultados expuestos *in vitro* decidimos trasladar nuestros resultados a las biopsias de los pacientes, analizando la expresión del marcador de CD163 (*M2-like TAMs*) tanto en el cuerpo del tumor, como en el frente invasivo de éste en función del perfil genético. Los resultados mostraron un incremento de la expresión de CD163/mm<sup>2</sup> en el frente invasivo respecto al cuerpo del tumor en los pacientes con CNVs<sup>High</sup>, indicando una acumulación de macrófagos M2 en esta zona, lo cual podría promover la invasión y la metástasis en este grupo de pacientes. Los *M2-like TAMs* no sólo promueven la invasión y la metástasis, sino que se ha descrito que sirven de soporte al proceso angiogénico localizándose en regiones perivasculares, además de mediante la secreción de VEGF<sup>101,104,173</sup>. Teniendo en cuenta este dato, así como los niveles de secreción de factores proangiogénicos obtenidos en la línea celular con CNVs<sup>High</sup>, podría ser de interés realizar un análisis de marcadores de angiogénesis en las biopsias de los pacientes para continuar con nuestro estudio. De esta forma, por un lado, podríamos estudiar si la angiogénesis de los pacientes con CNVs<sup>High</sup> es coherente con los resultados de secreción obtenidos en las líneas, y, por otro lado, podríamos analizar la localización de los macrófagos respecto a las áreas con mayor densidad de vasos sanguíneos para evaluar el papel de estas células en la angiogénesis del MLA.

Aunque no obtuvimos resultados significativos en cuanto a secreción, el análisis de expresión de CD163 también se realizó respecto a la amplificación de CDK4. En los resultados no se observaron diferencias significativas de expresión entre el cuerpo del tumor y el frente invasivo, si bien, sí que se observó una marcada tendencia al alza de la expresión de CD163 en el frente invasivo de los pacientes CDK4<sup>AMP</sup>. En estudios recientes, Huang et al. reportaron una disminución de macrófagos M1 en el frente invasivo respecto al cuerpo del tumor en pacientes con CDK4<sup>AMP</sup>, lo cual, no contradice a la tendencia hallada en nuestro estudio, ya que podría ser que dicha amplificación estuviese asociada a una reducción de los macrófagos antitumorales M1, y un incremento de macrófagos protumorales M2, que daría lugar a tumores más invasivos, con mayor capacidad de generar metástasis, y por tanto con un peor pronóstico<sup>162</sup>.

La asociación del perfil genético con la presencia incrementada de *M2-like TAMs*, y su impacto en pronóstico, no solo es esencial para caracterizar y dilucidar los mecanismos que hacen más agresivo al MLA que a otros MCs, sino que podría ser una herramienta a nivel terapéutico mediante la remodelación del TME de forma personalizada según el perfil genético. Esta remodelación podría llevarse a cabo mediante la depleción de *M2-like TAMs*, o mediante la transformación del fenotipo de *M2-like TAMs* hacia *M1-like TAMs* como han reportado diversos estudios<sup>174,175</sup>. De esta forma, se promovería la infiltración de células T citotóxicas, células Th,

células NK, entre otras, y la secreción de citoquinas proinflamatorias, remodelando el TME hacia un perfil antitumoral.

En relación a la secreción incrementada del factor soluble PARC en la línea CNVs<sup>High</sup>, implicado en la polarización de macrófagos hacia fenotipo M2, y tras observar el perfil diferencial de infiltración de M2-like TAMs según el perfil genético, decidimos realizar un estudio preliminar de dicha secreción en plasma de pacientes con MLA primario. La cohorte de plasmas utilizada se vio limitada por el número de plasmas de los que pudimos disponer, así como por las características clinicopatológicas y el pronóstico favorable de la mayoría de pacientes, a diferencia de la heterogeneidad de nuestra cohorte inicial de biopsias. Por este motivo, no analizamos los resultados de la detección de PARC en plasma según el perfil genético, ya que, al subdividir la cohorte, los grupos hubiesen constado de un número muy bajo de pacientes, incluso para hacer un estudio preliminar. Por lo que, decidimos estudiar PARC como marcador global de MLA, respecto a una cohorte de plasmas de pacientes con subtipos de MCs diferentes al MLA. Los resultados mostraron que los pacientes con MLA presentaban concentraciones plasmáticas superiores de PARC que los pacientes con otros tipos de MCs. Para valorar si las concentraciones de esta citoquina variaban en presencia de MLA, comparamos la concentración de PARC en plasma de pacientes de MLA previa cirugía, con plasma extraído 6 meses post-cirugía. En dicha comparativa, se pudo observar una tendencia a la baja en los pacientes que se post-cirugía 6 meses después. Los niveles plasmáticos de esta citoquina no han sido relacionados previamente con MLA ni con otros MCs, aunque sí que se ha relacionado con estadios avanzados en cáncer de mama y en leucemia<sup>176,177</sup>. A pesar del bajo tamaño muestral, así como la representatividad limitada de la muestra, los resultados preliminares del análisis de la concentración plasmática de PARC, podrían servirnos de base para iniciar un estudio prospectivo profundizando en la hipótesis de que esta citoquina pudiese ser un biomarcador específico de MLA, que sirviese para monitorizar el curso de la enfermedad y de los tratamientos mediante biopsia líquida.

Para continuar con la caracterización del componente inmunitario del TME, decidimos analizar la presencia de TILs en las biopsias de los pacientes de MLA. En varios estudios, se ha reportado un bajo porcentaje de TILs en pacientes con MLA, los cuales presentaban peor pronóstico y una respuesta limitada a inhibidores de puntos de control del SI<sup>174,175</sup>. Aunque no se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de infiltración de TILs respecto a las características clinicopatológicas y al pronóstico de los pacientes, sí que se observó un porcentaje de infiltrado significativamente inferior en pacientes con CNVs<sup>High</sup>. Como hemos mencionado, la presencia de

TILs puede proveer de información pronóstica relevante, y en melanoma suele ser clasificada en tres categorías: *brisk*, en la que los TILs se distribuyen a través de todo el tumor; en *non-brisk*, en la que infiltran focalmente el tumor; y en ausente, en la que los TILs son ausentes o están presentes, pero no infiltran el tumor<sup>140</sup>. Esta categorización podría complementar los resultados expuestos en este trabajo, y ofrecernos información pronóstica más completa. No obstante, también sería de interés estudiar el tipo de infiltración, realizando un análisis de marcadores inmunohistoquímicos que permita diferenciar entre poblaciones linfocitarias para evaluar su papel en el TME.

No obstante, en líneas generales, las limitaciones de nuestro estudio son evidentes, a nivel de tamaño muestral de nuestra cohorte de biopsias y plasmas, así como por el número de líneas celulares que pudimos mantener para realizar los experimentos *in vitro*. Aun así, la mayoría de estudios publicados se refieren a MA en general, basados en cohortes heterogéneas, en muchas ocasiones sin especificar el subtipo histológico, e incluso sin especificar la localización concreta en piel glabra de zonas acrales<sup>178</sup>. Por lo que, es de relevancia resaltar, que, a pesar de las limitaciones de nuestro estudio, en el mismo nos centramos exclusivamente en pacientes con subtipo histológico de MLA en piel glabra de zonas acrales, diagnosticados por profesionales de los Servicios de Dermatología y de Anatomía Patológica del HUAV de Lleida.

En última instancia, en base a lo expuesto en la primera parte del presente trabajo, los pacientes con un alto número de CNVs, y también aquellos con amplificación en CDK4 fueron relacionados con fenotipos tumorales con peor pronóstico. Paralelamente, los resultados *in vitro* mostraron un perfil secretómico protumoral e inmunosupresor en relación a las CNVs, remarcando el posible papel relevante de los *M2-like TAMs* en la progresión tumoral del MLA. Mediante la traslación de nuestros resultados *in vitro* hacia el estudio de las biopsias de pacientes, observamos como los pacientes con las CNVs altas también presentaban un incremento de los *M2-like TAMs* en el perfil invasivo. Además, obtuvimos de forma preliminar que las concentraciones plasmáticas de la citoquina PARC eran superiores en pacientes con MLA respecto a otros MCs. Por lo que, la asociación entre el perfil genético y el pronóstico, y dada la abundante información que las CNVs pueden proporcionar acerca de la biología y de los patrones de señalización del MLA, los estudios futuros enfocados en esta línea podrían ofrecernos conocimientos en relación a los mecanismos y a la patogénesis de la enfermedad, facilitando la detección de nuevos biomarcadores. Por otro lado, nuestro estudio del TME y el secretoma en relación al perfil genético, ofrece información novedosa respecto a este tipo de tumor, abriendo una puerta a tratamientos personalizados, enfocados a la modulación del

propio microambiente, y al uso del secretoma como herramienta diagnóstica y de monitorización del curso de la enfermedad de los pacientes de MLA.

## SEGUNDA PARTE. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE APLICACIÓN CLÍNICA EN MELANOMA LENTIGINOSO ACRAL

---

La segunda parte del presente trabajo se centra en el estudio de la expresión de un conjunto de marcadores inmunohistoquímicos con el objetivo de identificar nuevos biomarcadores de MLA para su aplicación en clínica. El estudio se realizó en base a los resultados obtenidos de la caracterización genética de la primera parte, y en relación a las características clinicopatológicas y pronóstico de los pacientes.

En primer lugar, realizamos un estudio preliminar en un subconjunto de la cohorte de pacientes, de la expresión de EGFR, Ciclina D1 y CDK4, cuyos genes habían presentado numerosas amplificaciones en el análisis genético. En lo referido a la expresión de EGFR, no observamos correlación entre la presencia de amplificación y la expresión de esta proteína. Del mismo modo, estudios previos realizados en melanoma han reportado que la expresión de EGFR podría ser independiente de su amplificación, ya que dicha expresión puede ser determinada por varios mecanismos alternativos a la amplificación del gen, como son modificaciones epigenéticas que alteren la transcripción, mutaciones, estimulación autocrina o heterodimerización del propio receptor<sup>158,179</sup>. En cuanto a la Ciclina D1, se observó un incremento de la expresión en los pacientes con el gen amplificado, sin embargo, las diferencias no resultaron significativas. En relación con este resultado, Liu et al. reportaron que los pacientes que presentaron un número elevado de amplificaciones en *CCND1* también tuvieron niveles elevados de la expresión de la proteína, mientras que en los casos con bajas amplificaciones o sin ninguna alteración en el gen, no se observaron correlaciones con la expresión<sup>180</sup>. Sin embargo, en el caso de CDK4, si que existió correlación entre la amplificación del gen y la expresión del mismo, como hemos explicado en la primera parte de este apartado. Por lo que, la fiabilidad del uso de la IHQ para predecir cambios en el número de copias del gen *EGFR* y *CCND1* es limitada, aún así los estudios habrían de realizarse en la totalidad de la cohorte, y en una cohorte mayor para aumentar la consistencia.

Posteriormente, realizamos una caracterización a nivel de marcadores de EMT, ya que es un proceso fundamental que interviene en la adquisición de capacidad migratoria e invasiva de las células tumorales. Los marcadores estudiados fueron E-cadherina y N-cadherina, marcador epitelial y mesenquimal respectivamente. Según la literatura científica, generalmente, E-cadherina disminuye su expresión durante la EMT, y N-cadherina la aumenta, teniendo una relación inversamente proporcional, tanto en tumores epiteliales como en melanoma<sup>142,143</sup>. No

obstante, el proceso de EMT recoge un conjunto de estados transicionales, dinámicos y reversibles, por lo que se pueden observar estados intermedios a lo largo de todo el proceso, sin ser necesario que el tumor sea homogéneamente epitelial o mesenquimal en su totalidad<sup>143</sup>. Sin embargo, obtuvimos resultados diferentes a lo esperado, ya que ambos marcadores analizados presentaron una relación directamente proporcional. Tras estos resultados, hicimos un estudio de supervivencia específica de MLA y de supervivencia libre de enfermedad respecto a la expresión de ambos marcadores. Los resultados mostraron que de forma significativa los pacientes con niveles de expresión altos de N-cadherina presentaban una supervivencia libre de enfermedad inferior. Respecto al resto del análisis, aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos si que observamos que los pacientes que presentaban tanto una expresión elevada de E-cadherina como de N-cadherina, tendían a tener un peor pronóstico que los pacientes con niveles inferiores de expresión. Aunque en el caso de N-cadherina, los resultados son coherentes con los estudios previos, los resultados respecto a E-cadherina son, en líneas generales, contradictorios. No obstante, en un estudio sobre MA reportado por Abidin et al. no fue hallada asociación entre la expresión de E-cadherina y la capacidad invasiva del tumor, de hecho, dicha expresión permaneció elevada incluso en los tumores más invasivos. En este estudio proponen como explicación, que el patrón de invasión de los MCs asociados a la exposición solar difiere de la del MA, y que, la disminución de la expresión de E-cadherina podría estar asociado a alteraciones en la vía MAPK. Además, respaldan sus resultados exponiendo que las células tumorales de MA mantenían las uniones célula-célula mediante la expresión de E-cadherina, presentando un patrón de invasión colectiva, la cual podría darse por otras vías moleculares diferentes a la vía MAPK (infrecuente en MA) o por características diferentes del TME respecto a otros tipos de MCs<sup>181</sup>. Por lo que, evaluamos si la expresión de ambos marcadores estaba asociada al perfil genético según las CNVs y la amplificación de CDK4, de cuya asociación no obtuvimos resultados significativos. Basándonos en nuestros hallazgos, y en los del estudio anteriormente expuesto, sería de interés evaluar la teoría que Abidin et al. exponen, estudiando el tipo de invasión que presentan las biopsias de nuestra cohorte en relación a la expresión de E-cadherina, y agrupando los tipos de invasión según el perfil genético de cada paciente y del TME, para así dilucidar los mecanismos subyacentes a los resultados reportados.

Por otro lado, decidimos evaluar el marcador ALDH1 en nuestra cohorte, el cual ha sido ampliamente utilizado como marcador de célula madre en tejidos normales, y como marcador de CMT en cáncer. La actividad de esta enzima, que tiene función detoxificadora catalizando la oxidación de aldehídos a ácidos carboxílicos, ha sido asociada con tumorigénesis y resistencia a fármacos en cáncer de mama, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer de páncreas, leucemia

y en tumores cerebrales, aún así hay algunos estudios que han reportado asociación de este marcador con pronóstico favorable<sup>182</sup>. Además, se ha identificado una subpoblación celular con niveles de expresión altos de ALDH1 con capacidad de autorrenovación, diferenciación y resistencia a terapia en melanoma<sup>183,184</sup>. En los resultados obtenidos tras analizar la expresión de ALDH1 en relación a las características clinicopatológicas, obtuvimos resultados que discrepaban con la mayoría de estudios publicados respecto a este marcador de CMT. Observamos que los pacientes con mayor expresión del marcador presentaron menor ulceración, menos mitosis y un riesgo asociado al estadio AJCC inferior, además de que la supervivencia libre de enfermedad fue significativamente superior en el grupo con expresión elevada. Aunque nuestros resultados puedan parecer contradictorios, ya que estudiamos este marcador para evaluar las CMTs, como hemos mencionado anteriormente hay estudios previos que los respaldan. Taylor et al. reportaron que, en un estudio de 68 pacientes de melanoma, altos niveles de ALDH1 detectados mediante IHQ fueron asociados a un mejor pronóstico, por lo que podría ser que en este caso fuese un marcador de diferenciación, en vez de dediferenciación como había sido reportado en otros estudios, y por tanto protector<sup>185</sup>. Además, en una investigación posterior, también realizada en melanoma, decidieron estudiar las variantes *ALDH1A1* y *ALDH1A3*, y analizar su papel en función de los diferentes subtipos moleculares de melanoma, ya que de las 19 isoformas de ALDHs se desconoce cuál es la que tiene un papel crítico en el pronóstico del cáncer<sup>186</sup>. Encontraron que, en pacientes con *BRAF* mutado, la expresión de *ALDH1A3* estaba asociada a buen pronóstico, y *ALDH1A1* a mal pronóstico, sin embargo, en pacientes con *BRAF*<sup>WT</sup> la expresión de *ALDH1A1* se asoció a buen pronóstico. Estos resultados nos podrían llevar a deducir, que la elevada expresión hallada en los pacientes con buen pronóstico de nuestra cohorte podría deberse a la isoforma *ALDH1A1*, ya que el MLA es un tumor con un bajo número de mutaciones puntuales en *BRAF*, a diferencia del resto de MCs. No obstante, serían necesarios estudios confirmatorios en los que diferenciásemos la expresión de ALDH1 según sus isoformas en las biopsias de MLA.

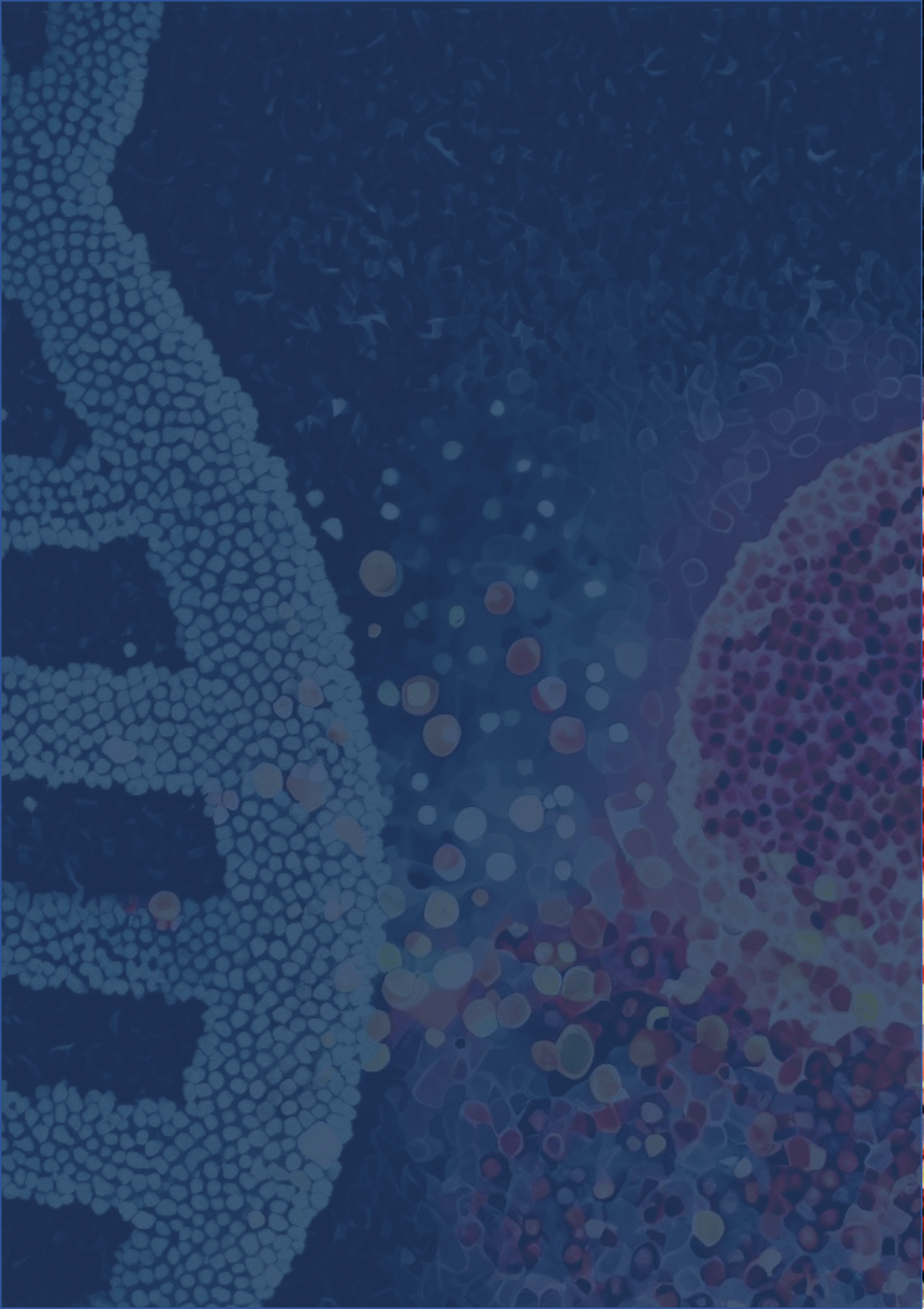
Tras este hallazgo, analizamos la correlación entre la expresión de este marcador respecto al perfil genético, según las CNVs y la amplificación en *CDK4*, obteniendo que niveles altos de expresión de ALDH1 estaban asociados por un lado con un bajo número de CNVs y, por otro lado, con la ausencia de amplificaciones en *CDK4*. Al subagrupar a los pacientes en ALDH1<sup>Low</sup>-CNVs<sup>High</sup> y ALDH1<sup>High</sup>-CNVs<sup>Low</sup> y analizar sus características clinicopatológicas, observamos que el primer grupo se asociaba a características clinicopatológicas de mal pronóstico, y a peor supervivencia libre de enfermedad, en la que ningún paciente con niveles altos de ALDH1 y con bajo número de CNVs presentó recaídas. Del mismo modo, al subagrupar los pacientes en

ALDH1<sup>Low</sup>-CDK4<sup>AMP</sup> y ALDH1<sup>High</sup>-CDK4<sup>WT</sup>, ambos subgrupos se comportaron de forma similar que, en el caso de las CNVs, siendo el primer grupo de peor pronóstico y el segundo grupo de buen pronóstico, en el que tampoco presentaron recaídas ninguno de los pacientes. Además, en base a los resultados obtenidos en los pacientes y al estudio previamente mencionado<sup>186</sup>, decidimos analizar la expresión de la isoforma *ALDH1A1* en nuestras líneas celulares, en función de su perfil genético, observando que los niveles de expresión eran superiores en la línea CNVs<sup>Low</sup> respecto a las CNVs<sup>High</sup> y que la expresión disminuía en la línea M28 CDK4 O/E, en concordancia con los resultados obtenidos en los pacientes. Por lo que, a nivel prospectivo, un planteamiento para profundizar en los mecanismos, en principio, ‘protectores’ de ALDH1, podría ser la sobreexpresión de este marcador en las líneas CNVs<sup>High</sup> y CDK4 O/E, y evaluar la capacidad invasiva, migratoria y proliferativa de estos modelos.

Esta asociación entre la expresión de ALDH1 y presentar CNVs<sup>Low</sup>/CDK4<sup>WT</sup> y su pronóstico favorable no ha sido reportada con anterioridad en la literatura científica, no obstante, son necesarios un mayor número de estudios que respalden nuestros resultados. Aún así, gracias a estos resultados, podemos considerar, esta asociación como biomarcador pronóstico de MLA, que permita mejorar la estadificación de los pacientes de MLA en la práctica clínica.







---

# CONCLUSIONES

---





**Primera.** El MLA es diagnosticado en pacientes de edad avanzada, presenta una incidencia similar en hombres y mujeres y se da mayoritariamente en zonas acrales de la extremidad inferior.

**Segunda.** Las ocupaciones de los pacientes diagnosticados de MLA se agrupan en su mayoría en relación a la exposición a químicos o a traumatismos, en referencia a la etiopatogenia de la enfermedad.

**Tercera.** Las variaciones en el número de copias (CNVs) detectadas en los oncogenes analizados son mayoritariamente amplificaciones, las cuales se dan con mayor frecuencia en genes relacionados con la transición de la fase G1 a S del ciclo celular, sin embargo, la detección de la mutación *BRAF<sup>V600E</sup>* es minoritaria en la cohorte.

**Cuarta.** Los pacientes con un alto número de CNVs presentan características clinicopatológicas asociadas con mal pronóstico, una supervivencia inferior y desarrollan recaídas con mayor frecuencia.

**Quinta.** Los pacientes con amplificación en el gen *CDK4* presentan características clinicopatológicas asociadas con mal pronóstico, una supervivencia inferior y desarrollan recaídas con mayor frecuencia, además dichos pacientes también presentan un elevado número de CNVs.

**Sexta.** La amplificación del gen *CDK4* correlaciona con un incremento de la inmunoexpresión del mismo en las biopsias de los pacientes.

**Séptima.** La sobreexpresión de *CDK4* en las células de MLA promueve la proliferación, crecimiento y transición hacia la fase S del ciclo celular en relación con las células con expresión normal de la proteína.

**Octava.** El secretoma de la línea celular con un elevado número de CNVs tiene un perfil protumoral e inmunosupresor, y presenta correlación con conjuntos de genes involucrados en proliferación endotelial y diferenciación mieloide, siendo las citoquinas más secretadas PARC, relacionada con la polarización de macrófagos hacia M2, y VEGF, involucrada en angiogénesis.

**Novena.** El secretoma de las líneas celulares de MLA con un elevado número de CNVs promueven la polarización *in vitro* de macrófagos hacia fenotipo protumoral M2.

**Décima.** La expresión de CD163, marcador de macrófagos de fenotipo M2, se ve incrementada en el frente invasivo respecto al cuerpo del tumor en las biopsias de los pacientes con un alto número de CNVs.

**Undécima.** Las concentraciones plasmáticas de la quimioquina PARC son superiores en los pacientes de MLA respecto de los pacientes con otros melanomas cutáneos diferentes de MLA, la cual disminuye en plasma tras 6 meses post-cirugía

**Duodécima.** Los pacientes con un bajo número de CNVs presentan un mayor porcentaje de infiltración linfocitaria en el tumor a diferencia de los pacientes con un alto número de CNVs

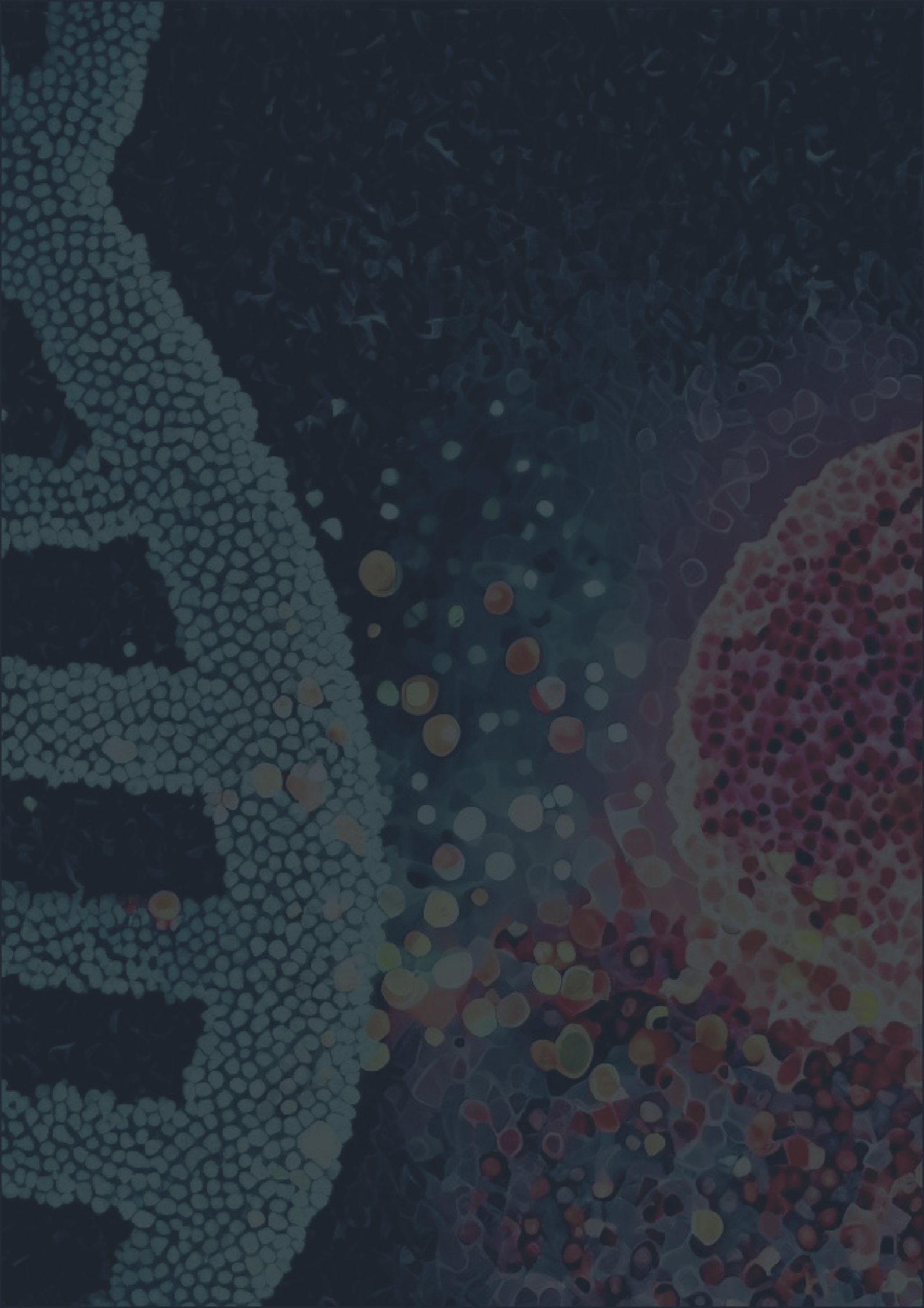
**Decimotercera.** La expresión de los marcadores de transición epitelio-mesénquima, E-cadherina y N-cadherina, muestran una correlación directa en las biopsias de MLA, teniendo un peor pronóstico los pacientes que presentan una expresión elevada de N-cadherina.

**Decimocuarta.** Los pacientes con expresión elevada de este marcador presentan características clinicopatológicas relacionadas con mejor pronóstico, mayor supervivencia y menor proporción de recaídas.

**Decimoquinta** La expresión elevada de ALDH1 se asocia con un bajo número de CNVs, con la ausencia de amplificación en *CDK4* y con un buen pronóstico, por el contrario, la baja expresión de este marcador se asocia con un número elevado de CNVs, con la presencia de amplificación en *CDK4* y con un mal pronóstico de los pacientes con MLA.







---

# REFERENCIAS

---



1. Sommer, L. Generation of melanocytes from neural crest cells. *Pigment Cell Melanoma Res* **24**, 411–421 (2011).
2. D’Mello, S. A. N., Finlay, G. J., Baguley, B. C. & Askarian-Amiri, M. E. Signaling pathways in melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 17 Preprint at <https://doi.org/10.3390/ijms17071144> (2016).
3. Shain, A. H. & Bastian, B. C. From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews Cancer* vol. 16 345–358 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37> (2016).
4. Ostrowski, S. M. & Fisher, D. E. Biology of Melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America* vol. 35 29–56 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.08.010> (2021).
5. Damsky, W. E., Theodosakis, N. & Bosenberg, M. Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. *Oncogene* **2014** 33:19 **33**, 2413–2422 (2013).
6. Eddy, K., Shah, R. & Chen, S. Decoding Melanoma Development and Progression: Identification of Therapeutic Vulnerabilities. *Frontiers in Oncology* vol. 10 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.626129> (2021).
7. Shain, A. H. *et al.* The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *New England Journal of Medicine* **373**, 1926–1936 (2015).
8. Bevona, C., Goggins, W., Quinn, T., Fullerton, J. & Tsao, H. *Cutaneous Melanomas Associated With Nevi*. *Arch Dermatol* vol. 139 <https://jamanetwork.com/> (2003).
9. Takata, M., Murata, H. & Saida, T. Molecular pathogenesis of malignant melanoma: a different perspective from the studies of melanocytic nevus and acral melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**, 64–71 (2010).
10. Dusingize, J. C. *et al.* Genetically determined cutaneous nevi and risk of cancer. *Int J Cancer* **150**, 961–968 (2022).
11. Yeh, I., von Deimling, A. & Bastian, B. C. Clonal BRAF mutations in melanocytic nevi and initiating role of BRAF in melanocytic neoplasia. *J Natl Cancer Inst* **105**, 917–919 (2013).
12. Lin, J. *et al.* Polyclonality of braf mutations in acquired melanocytic nevi. *J Natl Cancer Inst* **101**, 1423–1427 (2009).
13. Arozarena, I. & Wellbrock, C. Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nature Reviews Cancer* vol. 19 377–391 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0154-4> (2019).
14. Turner, N., Ware, O. & Bosenberg, M. Genetics of metastasis: melanoma and other cancers. *Clin Exp Metastasis* **35**, 379–391 (2018).
15. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/>.
16. Carr, S., Smith, C. & Wernberg, J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surgical Clinics of North America* vol. 100 1–12 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.suc.2019.09.005> (2020).
17. Dzwierzynski, W. W. Melanoma Risk Factors and Prevention. *Clinics in Plastic Surgery* vol. 48 543–550 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cps.2021.05.001> (2021).
18. Arnold, M. *et al.* Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA Dermatol* **158**, 495–503 (2022).

19. SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica. <https://seom.org/>.
20. Red Española de Registros de Cáncer. REDECAN. <https://redecn.org/es>.
21. Melanoma of the Skin — Cancer Stat Facts. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>.
22. Berk-Krauss, J., Stein, J. A., Weber, J., Polsky, D. & Geller, A. C. New Systematic Therapies and Trends in Cutaneous Melanoma Deaths Among US Whites, 1986-2016. *Am J Public Health* **110**, 731–733 (2020).
23. European Cancer Information System | ECIS. <https://ecis.jrc.ec.europa.eu/>.
24. Fitzpatrick, T. B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* **124**, 869–871 (1988).
25. Maresca, V., Flori, E. & Picardo, M. Skin phototype: A new perspective. *Pigment Cell Melanoma Res* **28**, 378–389 (2015).
26. Christodoulou, E. *et al.* Loss of Wild-Type CDKN2A Is an Early Event in the Development of Melanoma in FAMMM Syndrome. *J Invest Dermatol* **140**, 2298–2301.e3 (2020).
27. Šerman, N., Vranić, S., Glibo, M., Šerman, L. & Mokos, Z. B. Genetic risk factors in melanoma etiopathogenesis and the role of genetic counseling: A concise review. *Bosn J Basic Med Sci* **22**, 673 (2022).
28. Shain, A. H. *et al.* The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med* **373**, 1926–1936 (2015).
29. Bolick, N. L. & Geller, A. C. Epidemiology of Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* **35**, 57–72 (2021).
30. Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P. & Barsouk, A. Epidemiology of Melanoma. *Medical Sciences* **9**, 139–149 (2021).
31. Kalaora, S., Nagler, A., Wargo, J. A. & Samuels, Y. Mechanisms of immune activation and regulation: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer* **22**, 195–207 (2022).
32. Spanogle, J. P., Clarke, C. A., Aroner, S. & Swetter, S. M. Risk of second primary malignancies following cutaneous melanoma diagnosis: a population-based study. *J Am Acad Dermatol* **62**, 757–767 (2010).
33. Raimondi, S., Suppa, M. & Gandini, S. Melanoma Epidemiology and Sun Exposure. *Acta Derm Venereol* **100**, 250–258 (2020).
34. Ghasvand, R. *et al.* Association of Phenotypic Characteristics and UV Radiation Exposure With Risk of Melanoma on Different Body Sites. *JAMA Dermatol* **155**, 39 (2019).
35. Yun, S. J., Lee, J. H., Duk Choi, Y., Hwang, J. H. & Shin, M.-H. Frequency of Trauma, Physical Stress, and Occupation in Acral Melanoma: Analysis of 313 Acral Melanoma Patients in Korea. *Ann Dermatol* **33**, 2021.
36. MacKie, R.M., Hauschild, A. & Eggermont, A.M. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol* **20**, 1 (2009).
37. Wallace H. Clark, Jr. Lynn From, Evelina A. Bernardino & Martin C. Mihm. The Histogenesis and Biologic Behavior of Primary Human Malignant Melanomas of the Skin. *Cancer Res* 705–727 (1969).
38. Breslow, A. Tumor thickness, level of invasion and node dissection in stage I cutaneous melanoma. *Ann Surg* **182**, 572–575 (1975).
39. Davis, L. E., Shalin, S. C. & Tackett, A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1640032> **20**, 1366–1379 (2019).

40. Keung, E. Z. & Gershenwald, J. E. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. doi:10.1080/14737140.2018.1489246.
41. Barreiro-Capurro, A. *et al.* Differences in cutaneous melanoma survival between the 7th and 8th edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC). A multicentric population-based study. *Eur J Cancer* **145**, 29–37 (2021).
42. Faries, M. B. *et al.* Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma. *N Engl J Med* **376**, 2211 (2017).
43. Lee, C., Collichio, F., Ollila, D. & Moschos, S. Historical review of melanoma treatment and outcomes. *Clin Dermatol* **31**, 141–147 (2013).
44. Kim, G. *et al.* FDA approval summary: vemurafenib for treatment of unresectable or metastatic melanoma with the BRAFV600E mutation. *Clin Cancer Res* **20**, 4994–5000 (2014).
45. Chen, Y. *et al.* BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma: Mechanisms and Alternative Therapeutic Strategies. *Curr Treat Options Oncol* **23**, (2022).
46. Eddy, K. & Chen, S. Overcoming Immune Evasion in Melanoma. *Int J Mol Sci* **21**, 1–48 (2020).
47. Han, Y., Liu, D. & Li, L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am J Cancer Res* **10**, 727 (2020).
48. Buchbinder, E. I. & Desai, A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. *Am J Clin Oncol* **39**, 98 (2016).
49. Topalian, S. L., Drake, C. G. & Pardoll, D. M. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* **27**, 450–461 (2015).
50. Wolchok, J. D. *et al.* Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol* **11**, 155–164 (2010).
51. Willsmore, Z. N. *et al.* Combined anti-PD-1 and anti-CTLA-4 checkpoint blockade: Treatment of melanoma and immune mechanisms of action. *Eur J Immunol* **51**, 544–556 (2021).
52. Morad, G., Helmink, B. A., Sharma, P. & Wargo, J. A. Hallmarks of response, resistance, and toxicity to immune checkpoint blockade. *Cell* **184**, 5309–5337 (2021).
53. Elder, D. E., Bastian, B. C., Cree, I. A., Massi, D. & Scolyer, R. A. The 2018 World Health Organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* vol. 144 500–522 Preprint at <https://doi.org/10.5858/arpa.2019-0561-RA> (2020).
54. Heistein, J. B., Acharya, U. & Mukkamalla, S. K. R. Malignant Melanoma. *StatPearls* (2022).
55. Podlipnik, S. *et al.* Incidence of Melanoma in Catalonia, Spain, Is Rapidly Increasing in the Elderly Population. A Multicentric Cohort Study. *J Clin Med* **9**, 1–11 (2020).
56. Matas-Nadal, C. *et al.* Increasing incidence of lentigo maligna and lentigo maligna melanoma in Catalonia. doi:10.1111/ijd.14334.
57. Furney, S. J. *et al.* Genomic characterisation of acral melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res* **25**, 488–492 (2012).
58. Massi, D., Cree, I., Elder, D. E., Kazakov, D. & Scolyer, R. A. *WHO Classification of*

- Skin Tumours. WHO classification of skin tumours* (International Agency for Research on Cancer(IARC), 2018).
59. Ferrara, G. & Argenziano, G. The WHO 2018 Classification of Cutaneous Melanocytic Neoplasms: Suggestions From Routine Practice. *Front Oncol* **11**, 2305 (2021).
  60. Reed RJ. *Acral lentiginous melanoma. New concepts in Surgical Pathology of the Skin.* (1976).
  61. Bernardes, S. S. *et al.* More than just acral melanoma: the controversies of defining the disease. *J Pathol Clin Res* **7**, 531 (2021).
  62. Basurto-Lozada, P. *et al.* Acral lentiginous melanoma: Basic facts, biological characteristics and research perspectives of an understudied disease. *Pigment Cell and Melanoma Research* vol. 34 59–71 Preprint at <https://doi.org/10.1111/pcmr.12885> (2021).
  63. Durbec, F., Martin, L., Derancourt, C. & Grange, F. Melanoma of the hand and foot: Epidemiological, prognostic and genetic features. A systematic review. *British Journal of Dermatology* **166**, 727–739 (2012).
  64. Loria, D., Abriata, M. G., Santoro, F. & Latorre, C. Cutaneous melanoma in Argentina: an analysis of its characteristics and regional differences. *Ecancelmedicalscience* **14**, (2020).
  65. Hudson, D. A. & Krige, J. E. J. Melanoma in black South Africans. *J Am Coll Surg* **180**, 65–71 (1995).
  66. de Wet, J., Tod, B., Visser, W. I., Jordaan, H. F. & Schneider, J. W. Clinical and pathological features of acral melanoma in a South African population: A retrospective study. *S Afr Med J* **108**, 777–781 (2018).
  67. Ishihara, K., Saida, T., Otsuka, F. & Yamazaki, N. Statistical profiles of malignant melanoma and other skin cancers in Japan: 2007 update. *Int J Clin Oncol* **13**, 33–41 (2008).
  68. Chi, Z. *et al.* Clinical presentation, histology, and prognoses of malignant melanoma in ethnic Chinese: a study of 522 consecutive cases. *BMC Cancer* **11**, (2011).
  69. Chang, J. W. C. *et al.* Malignant melanoma in Taiwan: a prognostic study of 181 cases. *Melanoma Res* **14**, 537–541 (2004).
  70. Huang, K., Fan, J. & Misra, S. Acral Lentiginous Melanoma: Incidence and Survival in the United States, 2006–2015, an Analysis of SEER Registry. *Journal of Surgical Research* **251**, 329–339 (2020).
  71. Asgari, M. M., Shen, L., Sokil, M. M., Yeh, I. & Jorgenson, E. Prognostic factors and survival in acral lentiginous melanoma. *Br J Dermatol* **177**, 428–435 (2017).
  72. Bian, S. X. *et al.* Acral Lentiginous Melanoma – Population, Treatment and Survival using the NCDB from 2004–2015. *Pigment Cell Melanoma Res* **34**, 1049 (2021).
  73. Egger, M. E. *et al.* Unique prognostic factors in acral lentiginous melanoma. *Am J Surg* **204**, 874–880 (2012).
  74. Kolla, A. M. *et al.* Acral Lentiginous Melanoma: A United States Multi-Center Substage Survival Analysis. *Cancer Control* **28**, (2021).
  75. Howard, M. *et al.* Acral lentiginous melanoma: Clinicopathologic and survival differences according to tumour location. *Australas J Dermatol* **61**, 312–317 (2020).
  76. Zhang, N. *et al.* The association between trauma and melanoma in the Chinese population: a retrospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **28**, 597–603 (2014).

77. Al-Hassani, F., Chang, C. & Peach, H. Acral lentiginous melanoma – Is inflammation the missing link? *JPRAS Open* **14**, 49–54 (2017).
78. Costello, C. M., Pittelkow, M. R. & Mangold, A. R. Acral Melanoma and Mechanical Stress on the Plantar Surface of the Foot. *N Engl J Med* **377**, 395–396 (2017).
79. Newell, F. *et al.* Whole-genome sequencing of acral melanoma reveals genomic complexity and diversity. *Nat Commun* **11**, (2020).
80. Rabbie, R., Ferguson, P., Molina-Aguilar, C., Adams, D. J. & Robles-Espinoza, C. D. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *Journal of Pathology* vol. 247 539–551 Preprint at <https://doi.org/10.1002/path.5213> (2019).
81. Broit, N. *et al.* Systematic review and meta-analysis of genomic alterations in acral melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **35**, 369 (2022).
82. Ashida, A., Takata, M., Murata, H., Kido, K. & Saida, T. Pathological activation of KIT In metastatic tumors of acral and mucosal melanomas. *Int J Cancer* **124**, 862–868 (2009).
83. Teixido, C., Castillo, P., Martinez-Vila, C., Arance, A. & Alos, L. Molecular Markers and Targets in Melanoma. *Cells* **10**, (2021).
84. Kong, Y. *et al.* Frequent genetic aberrations in the CDK4 pathway in acral melanoma indicate the potential for CDK4/6 inhibitors in targeted therapy. *Clinical Cancer Research* **23**, 6946–6957 (2017).
85. Moon, K. R. *et al.* Genetic Alterations in Primary Acral Melanoma and Acral Melanocytic Nevus in Korea: Common Mutated Genes Show Distinct Cytomorphological Features. *Journal of Investigative Dermatology* **138**, 933–945 (2018).
86. Liu, J. *et al.* CCND1 copy number increase and cyclin D1 expression in acral melanoma: a comparative study of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry in a Chinese cohort. *Diagn Pathol* **16**, (2021).
87. Yeh, I. *et al.* Targeted genomic profiling of acral melanoma. *J Natl Cancer Inst* **111**, 1068–1077 (2019).
88. Goydos, J. S. & Shoen, S. L. Acral Lentiginous Melanoma. *Cancer Treat Res* **167**, 321–329 (2016).
89. Nakamura, Y. & Fujisawa, Y. Diagnosis and Management of Acral Lentiginous Melanoma. *Curr Treat Options Oncol* **19**, (2018).
90. Piliang, M. P. Acral Lentiginous Melanoma. *Surg Pathol Clin* **2**, 535–541 (2009).
91. Hodi, F. S. *et al.* Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *J Clin Oncol* **31**, 3182–3190 (2013).
92. Woodman, S. E. & Davies, M. A. Targeting KIT in Melanoma: A Paradigm of Molecular Medicine and Targeted Therapeutics. *Biochem Pharmacol* **80**, 568 (2010).
93. Mao, L. *et al.* Palbociclib in advanced acral melanoma with genetic aberrations in the cyclin-dependent kinase 4 pathway. *Eur J Cancer* **148**, 297–306 (2021).
94. Kaunitz, G. J. *et al.* Melanoma subtypes demonstrate distinct PD-L1 expression profiles. *Laboratory Investigation* **2017**, 97:9 **97**, 1063–1071 (2017).
95. Nakamura, Y. & Fujisawa, Y. Diagnosis and Management of Acral Lentiginous Melanoma. *Curr Treat Options Oncol* **19**, (2018).



96. Xiao, Y. & Yu, D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther* **221**, (2021).
97. Anderson, N. M. & Simon, M. C. The tumor microenvironment. *Curr Biol* **30**, R921–R925 (2020).
98. Donadelli, M. The cancer secretome and secreted biomarkers. *Semin Cell Dev Biol* **78**, 1–2 (2018).
99. Rodrigues Da Cunha, B. *et al.* Cellular Interactions in the Tumor Microenvironment: The Role of Secretome. *J Cancer* **10**, 4574–4587 (2019).
100. Pitt, J. M. *et al.* Targeting the tumor microenvironment: removing obstruction to anticancer immune responses and immunotherapy. *Annals of Oncology* **27**, 1482–1492 (2016).
101. Chen, Y. *et al.* Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *Journal of Biomedical Science 2019 26:1* **26**, 1–13 (2019).
102. Paijens, S. T., Vledder, A., de Bruyn, M. & Nijman, H. W. Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era. *Cell Mol Immunol* **18**, 842 (2021).
103. Hinshaw, D. C. & Shevde, L. A. The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-3962.
104. Pan, Y., Yu, Y., Wang, X. & Zhang, T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol* **11**, (2020).
105. Gao, J., Liang, Y. & Wang, L. Shaping Polarization Of Tumor-Associated Macrophages In Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* **13**, 3364 (2022).
106. Mendes, B. B., Sousa, D. P., Coniot, J. & Conde, J. Nanomedicine-based strategies to target and modulate the tumor microenvironment. *Trends Cancer* **7**, 847–862 (2021).
107. Liu, D., Yang, X. & Wu, X. Tumor Immune Microenvironment Characterization Identifies Prognosis and Immunotherapy-Related Gene Signatures in Melanoma. *Front Immunol* **12**, 1 (2021).
108. Poh, A. R. & Ernst, M. Targeting Macrophages in Cancer: From Bench to Bedside. *Front Oncol* **8**, 1 (2018).
109. Peranzoni, E. *et al.* Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E4041–E4050 (2018).
110. Weiskopf, K. Cancer immunotherapy targeting the CD47/SIRP $\alpha$  axis. *Eur J Cancer* **76**, 100–109 (2017).
111. Marzagalli, M., Ebelt, N. D. & Manuel, E. R. Unraveling the crosstalk between melanoma and immune cells in the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol* **59**, 236–250 (2019).
112. Falcone, I. *et al.* Tumor Microenvironment: Implications in Melanoma Resistance to Targeted Therapy and Immunotherapy. doi:10.3390/cancers12102870.
113. Li, J. *et al.* Single-cell Characterization of the Cellular Landscape of Acral Melanoma Identifies Novel Targets for Immunotherapy. *Clinical Cancer Research* **28**, 2131–2146 (2022).
114. Flier, J. S., Underhill, L. H. & Dvorak, H. F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* **315**, 1650–1659 (1986).
115. Bussard, K. M., Mutkus, L., Stumpf, K., Gomez-Manzano, C. & Marini, F. C. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. *Breast Cancer Research* **18**, 1–11 (2016).

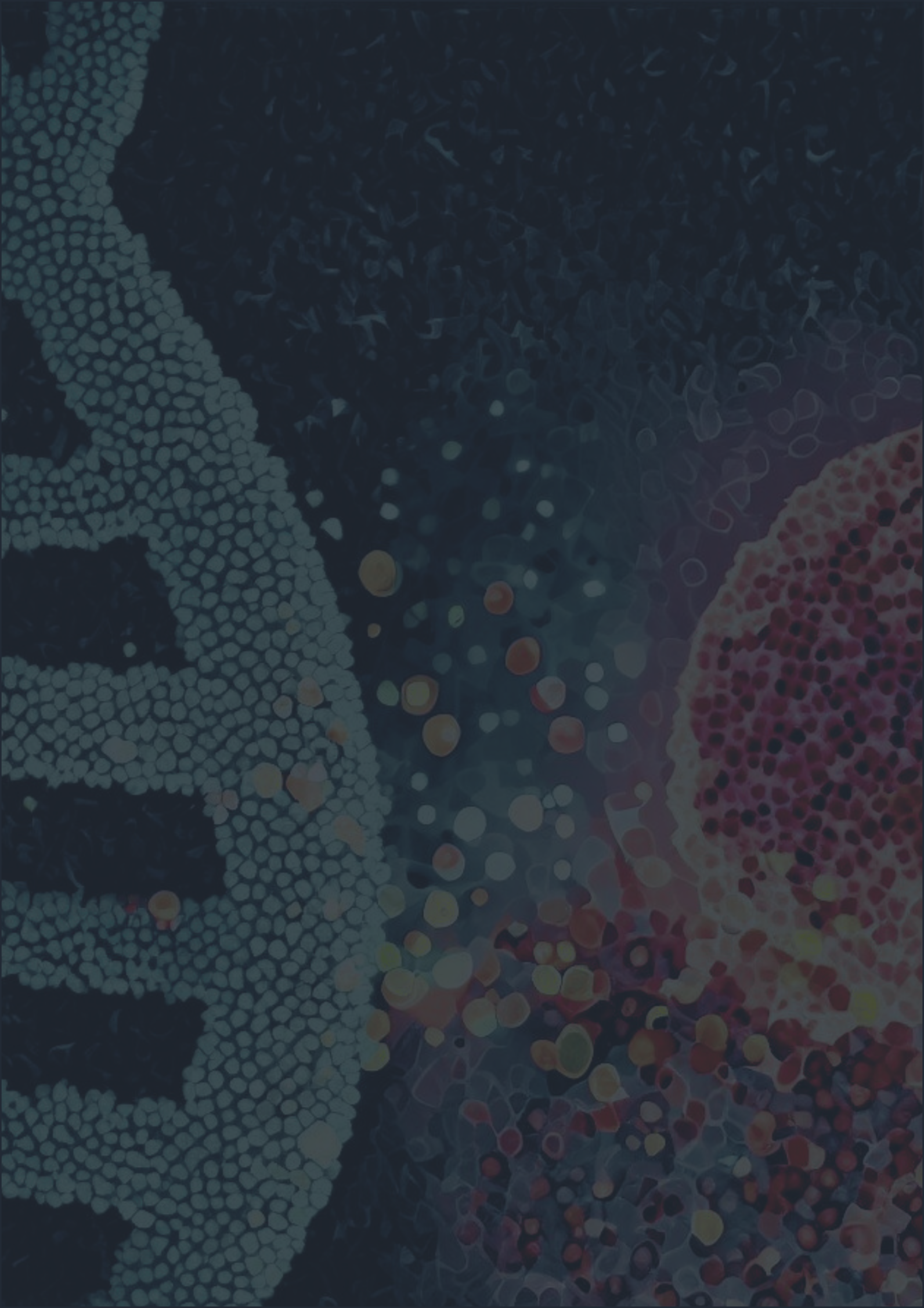
116. Sahai, E. *et al.* A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. doi:10.1038/s41568-019-0238-1.
117. Mao, X. *et al.* Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Mol Cancer* **20**, (2021).
118. Linares, J., Marín-Jiménez, J. A., Badia-Ramentol, J. & Calon, A. Determinants and Functions of CAFs Secretome During Cancer Progression and Therapy. *Front Cell Dev Biol* **8**, 621070 (2020).
119. Biffi, G. & Tuveson, D. A. Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiol Rev* **101**, 147 (2021).
120. He, Z. *et al.* Mapping the single-cell landscape of acral melanoma and analysis of the molecular regulatory network of the tumor microenvironments. 11 (2022) doi:10.7554/eLife.78616.
121. Metsalu, T. & Vilo, J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic Acids Res* **43**, W566–W570 (2015).
122. Bankhead, P. *et al.* QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports* **7**, 1–7 (2017).
123. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545–15550 (2005).
124. Mootha, V. K. *et al.* PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nature Genetics* **34**, 267–273 (2003).
125. Cardoso, A. P. *et al.* The immunosuppressive and pro-tumor functions of CCL18 at the tumor microenvironment. *Cytokine Growth Factor Rev* **60**, 107–119 (2021).
126. Melincovici, C. S. *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol* **59**, 455–467 (2018).
127. Wei, L. F. *et al.* IGFBP2 in cancer: Pathological role and clinical significance (Review). *Oncol Rep* **45**, 427–438 (2021).
128. Olivera, I. *et al.* A Therapeutically Actionable Protumoral Axis of Cytokines Involving IL-8, TNF $\alpha$ , and IL-1 $\beta$ . *Cancer Discov* **12**, 2140–2157 (2022).
129. Yamashita, U. & Kuroda, E. Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. *Crit Rev Immunol* **22**, 105–114 (2002).
130. Berraondo, P. *et al.* Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *British Journal of Cancer* **120**, 6–15 (2018).
131. Garo, L. P. & Gopal, M. Role of cytokines in tumor immunity and immune tolerance to cancer. *Cancer Immunology: A Translational Medicine Context, Second Edition* 205–233 (2020) doi:10.1007/978-3-030-30845-2\_13/COVER.
132. Teicher, B. A. & Fricker, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* **16**, 2927–2931 (2010).
133. Korbecki, J. *et al.* CC Chemokines in a Tumor: A Review of Pro-Cancer and Anti-Cancer Properties of the Ligands of Receptors CCR1, CCR2, CCR3, and CCR4. *Int J Mol Sci* **21**, 1–29 (2020).
134. Castello, L. M. *et al.* Osteopontin at the Crossroads of Inflammation and Tumor Progression. *Mediators Inflamm* **2017**, (2017).

135. Kadomoto, S., Izumi, K. & Mizokami, A. The CCL20-CCR6 Axis in Cancer Progression. *Int J Mol Sci* **21**, 1–18 (2020).
136. Zhang, M. *et al.* CCL7 recruits cDC1 to promote antitumor immunity and facilitate checkpoint immunotherapy to non-small cell lung cancer. *Nat Commun* **11**, (2020).
137. Keyser, J. *et al.* IP-10-encoding plasmid DNA therapy exhibits anti-tumor and anti-metastatic efficiency. *Exp Dermatol* **13**, 380–390 (2004).
138. Inagaki, K. *et al.* Role of tumor-associated macrophages at the invasive front in human colorectal cancer progression. *Cancer Sci* **112**, 2692 (2021).
139. Georgouli, M. *et al.* Regional Activation of Myosin II in Cancer Cells Drives Tumor Progression via a Secretory Cross-Talk with the Immune Microenvironment. *Cell* **176**, 757–774.e23 (2019).
140. Maibach, F., Sadozai, H., Seyed Jafari, S. M., Hunger, R. E. & Schenk, M. Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their Prognostic Value in Cutaneous Melanoma. *Front Immunol* **11**, (2020).
141. Liu, D., Yang, X. & Wu, X. Tumor Immune Microenvironment Characterization Identifies Prognosis and Immunotherapy-Related Gene Signatures in Melanoma. *Front Immunol* **12**, (2021).
142. Pedri, D., Karras, P., Landeloos, E., Marine, J. C. & Rambow, F. Epithelial-to-mesenchymal-like transition events in melanoma. *FEBS Journal* **289**, 1352–1368 (2022).
143. Yang, J. *et al.* Guidelines and definitions for research on epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **21**, 341–352 (2020).
144. Walcher, L. *et al.* Cancer Stem Cells—Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol* **11**, 1280 (2020).
145. Taylor, L. A. *et al.* High ALDH1 Expression Correlates with Better Prognosis in Tumorigenic Malignant Melanoma. *Mod Pathol* **30**, 634 (2017).
146. Kuchelmeister, C., Schaumburg-Lever, G. & Garbe, C. Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. *Br J Dermatol* **143**, 275–280 (2000).
147. Balch, C. M. *et al.* Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* **19**, 3622–3634 (2001).
148. Bormann, G., Marsch, W. C., Haerting, J. & Helmbold, P. Concomitant traumas influence prognosis in melanomas of the nail apparatus. *Br J Dermatol* **155**, 76–80 (2006).
149. Antonio, N. *et al.* The wound inflammatory response exacerbates growth of pre-neoplastic cells and progression to cancer. *EMBO J* **34**, 2219–2236 (2015).
150. Bortolotti, P., Faure, E. & Kipnis, E. Inflammasomes in Tissue Damages and Immune Disorders After Trauma. *Front Immunol* **9**, 1 (2018).
151. Pös, O. *et al.* DNA copy number variation: Main characteristics, evolutionary significance, and pathological aspects. *Biomed J* **44**, 548–559 (2021).
152. Zhang, L., Yuan, Y., Lu, K. H. & Zhang, L. Identification of recurrent focal copy number variations and their putative targeted driver genes in ovarian cancer. *BMC Bioinformatics* **17**, (2016).

153. Elefanti, L. *et al.* The molecular landscape of primary acral melanoma: A multicenter study of the Italian melanoma intergroup (IMI). *Int J Mol Sci* **22**, (2021).
154. Grist, E. *et al.* Accumulation of copy number alterations and clinical progression across advanced prostate cancer. *Genome Med* **14**, (2022).
155. Liang, L., Fang, J. Y. & Xu, J. Gastric cancer and gene copy number variation: emerging cancer drivers for targeted therapy. *Oncogene* **35**, 1475–1482 (2016).
156. Holman, B. N. *et al.* Clinical and molecular features of subungual melanomas are site-specific and distinct from acral melanomas. *Melanoma Res* **30**, 562–573 (2020).
157. Sigismund, S., Avanzato, D. & Lanzetti, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Mol Oncol* **12**, 3–20 (2018).
158. Rákósy, Z. *et al.* EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. *Int J Cancer* **121**, 1729–1737 (2007).
159. Oliner, J. D., Saiki, A. Y. & Caenepeel, S. The role of MDM2 amplification and overexpression in tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **6**, (2016).
160. Arnoff, T. E. & El-Deiry, W. S. MDM2/MDM4 amplification and CDKN2A deletion in metastatic melanoma and glioblastoma multiforme may have implications for targeted therapeutics and immunotherapy. *Am J Cancer Res* **12**, 2102–2117 (2022).
161. Ricciotti, R. W. *et al.* High amplification levels of MDM2 and CDK4 correlate with poor outcome in patients with dedifferentiated liposarcoma: A cytogenomic microarray analysis of 47 cases. *Cancer Genet* **218–219**, 69–80 (2017).
162. Huang, R. *et al.* Prognostic value of genetic aberrations and tumor immune microenvironment in primary acral melanoma. *J Transl Med* **21**, (2023).
163. Jang, H., Ryu, H. J. & Kim, S. K. Genetic Characteristics of Primary Cutaneous Malignant Melanoma in Koreans Compared With Western Populations. *In Vivo* **37**, 862–867 (2023).
164. Martinez-Monleon, A. *et al.* Amplification of CDK4 and MDM2: a detailed study of a high-risk neuroblastoma subgroup. *Scientific Reports* | **12**, 12420 (123AD).
165. Wikman, H. *et al.* CDK4 is a probable target gene in a novel amplicon at 12q13.3-q14.1 in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer* **42**, 193–199 (2005).
166. Sirvent, N. *et al.* Detection of MDM2-CDK4 amplification by fluorescence in situ hybridization in 200 paraffin-embedded tumor samples: utility in diagnosing adipocytic lesions and comparison with immunohistochemistry and real-time PCR. *Am J Surg Pathol* **31**, 1476–1489 (2007).
167. Miliani De Marval, P. L., Macias, E., Conti, C. J. & Rodriguez-Puebla, M. L. Enhanced Malignant Tumorigenesis in Cdk4-Transgenic Mice. *Oncogene* **23**, 1863 (2004).
168. Otto, T. & Sicinski, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **17**, 93 (2017).
169. Fassel, A., Geng, Y. & Sicinski, P. CDK4 and CDK6 kinases: From basic science to cancer therapy. *Science* **375**, (2022).
170. Gui, J., Guo, Z. & Wu, D. Clinical features, molecular pathology, and immune microenvironmental characteristics of acral melanoma. *J Transl Med* **20**, 367 (2022).

171. Gajanin, V., Krivokuća, Z., Kostić, K., Gajanin, R. & Sladojević, I. Significance of vascular endothelial growth factor expression in skin melanoma. *Vojnosanit Pregl* **67**, 747–754 (2010).
172. Zúñiga-Castillo, M., Pereira, N. V. & Sotto, M. N. High density of M2-macrophages in acral lentiginous melanoma compared to superficial spreading melanoma. *Histopathology* **72**, 1189–1198 (2018).
173. Wyckoff, J. B. *et al.* Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors. *Cancer Res* **67**, 2649–2656 (2007).
174. Han, S. *et al.* Tumor microenvironment remodeling and tumor therapy based on M2-like tumor associated macrophage-targeting nano-complexes. *Theranostics* **11**, 2892 (2021).
175. Cao, Y. *et al.* Tumor microenvironment remodeling via targeted depletion of M2-like tumor-associated macrophages for cancer immunotherapy. *Acta Biomater* **160**, 239–251 (2023).
176. Narita, D. *et al.* Altered levels of plasma chemokines in breast cancer and their association with clinical and pathological characteristics. *Neoplasma* **63**, 141–149 (2016).
177. Struyf, S. *et al.* PARC/CCL18 is a plasma CC chemokine with increased levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* **163**, 2065–2075 (2003).
178. Bernardes, S. S. *et al.* More than just acral melanoma: the controversies of defining the disease. *J Pathol Clin Res* **7**, 531 (2021).
179. Boone, B. *et al.* EGFR in melanoma: clinical significance and potential therapeutic target. *J Cutan Pathol* **38**, 492–502 (2011).
180. Liu, J. *et al.* CCND1 copy number increase and cyclin D1 expression in acral melanoma: a comparative study of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry in a Chinese cohort. *Diagn Pathol* **16**, (2021).
181. Abidin, F. A. Z., Usman, H. A., Suryanti, S. & Hernowo, B. S. CD103+ T Lymphocyte Count Linked to the Thickness of Invasion on Acral Melanoma without E-Cadherin Involvement. *Clin Cosmet Investig Dermatol* **14**, 1783 (2021).
182. Moreb, J. S., Ucar-Bilyeu, D. A. & Khan, A. Use of retinoic acid/aldehyde dehydrogenase pathway as potential targeted therapy against cancer stem cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **79**, 295–301 (2017).
183. Santini, R. *et al.* Hedgehog-Gli signaling drives self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Stem Cells* **30**, 1808–1818 (2012).
184. Boonyaratanakornkit, J. B. *et al.* Selection of tumorigenic melanoma cells using ALDH. *J Invest Dermatol* **130**, 2799–2808 (2010).
185. Taylor, L. A. *et al.* High ALDH1 Expression Correlates with Better Prognosis in Tumorigenic Malignant Melanoma. *Mod Pathol* **30**, 634 (2017).
186. Samson, J. M. *et al.* Clinical implications of ALDH1A1 and ALDH1A3 mRNA expression in melanoma subtypes. *Chem Biol Interact* **314**, (2019).





---

# **TABLAS ANEXAS**

---





	CCND1			MYC			CDK4			FGFR1			CCND2			EGFR			ERBB2			MDM2			
	WT	AMP	p-valor	WT	AMP	p-valor	WT	AMP	p-valor	WT	AMP	p-valor	WT	AMP	p-valor	WT	AMP	p-valor	WT	AMP	p-valor	WT	AMP	p-valor	
Sexo	Hombre	5	10	9	6		7	8		9	5		11	4		9	6		10	5		10	5		0,418
	Mujer	8	10	8	10	0,722	14	4	0,083	11	6	0,991	11	7	0,712	13	5	0,488	15	3	0,239	15	3		
Edad (años)	≤75	8	9	12	5		9	8		11	5		13	4		11	6		12	5		13	4		>0,99
	>75	5	11	5	11	0,481	12	4	0,282	9	6	0,381	9	7	0,282	11	5	>0,99	12	4		12	4		
Breslow (mm)	≤3	9	9	12	6		15	3		12	5		14	4		15	3		15	3		15	3		0,418
	>3	4	11	5	10	0,284	6	9	0,010*	8	6	0,732	8	7	0,138	7	8	0,061	9	6	0,239	10	5		
Ulceración	Sí	7	6	8	12		9	11		10	8		12	8		11	9		12	8		14	6		0,431
	No	6	14	9	4	0,171	12	1	0,009**	10	3	0,232	10	3	0,456	11	2	0,132	12	1	0,056	11	2		
Mitosis	<1 mitosis/mm <sup>2</sup>	3	4	3	4		6	1		5	2		4	3		5	2		5	2		6	1		0,633
	≥1 mitosis/ mm <sup>2</sup>	7	13	9	11	>0,99	9	11	0,019*	9	9	0,419	12	8	>0,99	12	8	0,678	13	7	>0,99	13	7		
Localización	Subungueal	10	5	9	6		9	6		1	11		10	5		12	3		13	2		14	4		>0,99
	Otra	3	15	8	10	0,003**	12	6	0,692	1	9	0,330	12	6	>0,99	10	8	0,266	11	7	0,134	11	4		
Riesgo	In situ/Riesgo bajo	7	5	9	3		10	2		9	3		10	2		11	1		11	1		11	1		
	Riesgo intermedio	1	2	2	1	0,239	3	0	0,037*	2	1	0,584	2	1	0,287	2	1	0,048*	2	1	0,178	2	1		0,273
	Riesgo alto/Metástasis a distancia	5	13	6	12		8	10		9	7		10	8		9	9		11	7		12	6		

**Tabla Anexa 1. Análisis de contingencia de la presencia de amplificaciones de los genes con mayor número de amplificaciones detectadas mediante MLPA, en relación a las características clinicopatológicas de la cohorte de pacientes de MLA.** Los genes analizados fueron *CCND1*, *MYC*, *CDK4*, *FGFR1*, *CCND2*, *EGFR*, *ERBB2* y *MDM2*. El análisis estadístico realizado a partir de tablas de contingencias fue llevado a cabo mediante el test exacto de Fisher para las variables de 2x2 categorías, y Chi-cuadrado de Pearson para el resto (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

		Pacientes (n)	% Supervivencia específica MLA al año ( $\pm$ SEP)	% Supervivencia específica MLA a los 3 años ( $\pm$ SEP)	Chi-cuadrado (Log-Rank test)	p-valor
<i>CCND1</i>	WT	13	92( $\pm$ 8)	63( $\pm$ 15)	0,351	0,533
	AMP	16	81( $\pm$ 10)	68( $\pm$ 12)		
<i>MYC</i>	WT	15	86( $\pm$ 9)	69( $\pm$ 13)	0,021	0,885
	AMP	14	86( $\pm$ 9)	63( $\pm$ 13)		
<i>CDK4</i>	WT	17	94( $\pm$ 6)	82( $\pm$ 10)	5,345	<b>0,021*</b>
	AMP	12	73( $\pm$ 13)	39( $\pm$ 16)		
<i>FGFR1</i>	WT	17	82( $\pm$ 9)	60( $\pm$ 13)	0,951	0,621
	AMP	10	90( $\pm$ 9)	70( $\pm$ 14)		
<i>CCND2</i>	WT	19	83( $\pm$ 9)	70( $\pm$ 11)	0,895	0,344
	AMP	10	90( $\pm$ 9)	60( $\pm$ 15)		
<i>EGFR</i>	WT	19	83( $\pm$ 9)	77( $\pm$ 10)	2,181	0,140
	AMP	10	90( $\pm$ 9)	48( $\pm$ 16)		
<i>ERBB2</i>	WT	21	80( $\pm$ 9)	69( $\pm$ 11)	0,014	0,906
	AMP	8	100( $\pm$ 0)	60( $\pm$ 18)		
<i>MDM2</i>	WT	21	90( $\pm$ 7)	79( $\pm$ 9)	4,813	<b>0,028*</b>
	AMP	8	73( $\pm$ 16)	29( $\pm$ 17)		

**Tabla Anexa 2. Análisis de la supervivencia específica de MLA en función de la presencia de amplificación en los genes con mayor número de amplificaciones detectadas mediante MLPA.** Representación porcentual de los pacientes que sobreviven tras 1 y 3 años de seguimiento. El análisis estadístico de la supervivencia específica de MLA entre los grupos de cada variable fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001). SEP: error estándar de la proporción; N/A: valores perdidos.

		Pacientes (n)	% Supervivencia libre de enfermedad al año (±SEP)	% Supervivencia libre de enfermedad a los 3 años (±SEP)	Chi-cuadrado (Log-Rank test)	p-valor
<i>CCND1</i>	WT	12	83(±11)	73(±13)	0,496	0,481
	AMP	18	83(±13)	66(±11)		
<i>MYC</i>	WT	16	87(±9)	66(±12)	0,141	0,708
	AMP	14	79(±11)	71(±12)		
<i>CDK4</i>	WT	20	95(±5)	79(±9)	6,226	<b>0,0126*</b>
	AMP	10	58(±16)	46(±16)		
<i>FGFR1</i>	WT	19	78(±10)	60(±12)	1,346	0,510
	AMP	9	89(±10)	78(±14)		
<i>CCND2</i>	WT	21	85(±8)	69(±10)	1,439	0,230
	AMP	9	78(±14)	67(±16)		
<i>EGFR</i>	WT	21	85(±8)	80(±9)	3,884	<b>0,049*</b>
	AMP	9	78(±14)	44(±17)		
<i>ERBB2</i>	WT	22	86(±7)	71(±10)	0,578	0,447
	AMP	8	75(±15)	63(±17)		
<i>MDM2</i>	WT	22	95(±5)	80(±9)	5,782	<b>0,016*</b>
	AMP	8	50(±18)	38(±17)		

**Tabla Anexa 3. Análisis de la supervivencia libre de enfermedad en función de la presencia de amplificación en los genes con mayor número de amplificaciones detectadas mediante MLPA.** Representación porcentual de los pacientes que se mantienen sin recaer tras 1 y 3 años de seguimiento. El análisis estadístico de la supervivencia específica de MLA entre los grupos de cada variable fue realizado mediante Log-Rank test (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001). SEP: error estándar de la proporción; N/A: valores perdidos.

Citoquina	Z-score M28	Z-score WM4235	p-valor	Citoquina	Z-score M28	Z-score WM4235	p-valor
Angiogenin	0,87	-0,87	0,0003***	IL-7	-0,86	0,86	0,0020**
BDNF	-0,54	0,54	0,3779	IL-8	0,85	-0,85	0,0137*
BLC	-0,80	0,80	0,0763	IP-10	-0,87	0,87	0,00002***
EGF	0,86	-0,86	0,0063**	Leptin	0,84	-0,84	0,0263*
Eotaxin-3	0,85	-0,85	0,0225*	LIF	-0,73	0,73	0,1547
FGF-6	-0,15	0,15	0,8218	LIGHT	-0,86	0,86	0,0058**
FGF-7	0,60	-0,60	0,3047	MCP-1	-0,85	0,85	0,0134*
Flt-3 Ligand	-0,54	0,54	0,3709	MCP-3	-0,86	0,86	0,0027**
GCP-2	-0,81	0,81	0,0661	MCSF	0,35	-0,35	0,5945
GCSF	-0,73	0,73	0,1539	MDC	-0,83	0,83	0,0404*
GDNF	-0,58	0,58	0,3338	MIF	-0,86	0,86	0,0074**
GM-CSF	-0,54	0,54	0,3814	MIG	0,56	-0,56	0,3533
GRO	0,82	-0,82	0,0529	MIP-3 a	0,86	-0,86	0,0014**
GRO-a	-0,13	0,13	0,8467	NAP-2	0,86	-0,86	0,0031**
IFN- g	-0,83	0,83	0,0376*	NT-3	0,87	-0,87	0,0010**
IGF-I	-0,45	0,45	0,4792	Oncostatin M	-0,87	0,87	0,0001***
IGFBP-2	0,87	-0,87	0,0010**	Osteopontin	0,86	-0,86	0,0039**
IGFBP-3	-0,80	0,80	0,0786	Osteoprotegerin	0,85	-0,85	0,0202*
IGFBP-4	0,87	-0,87	0,0003***	PARC	0,87	-0,87	0,0002***
IL-1 b	-0,80	0,80	0,0787	PDGF-BB	-0,86	0,86	0,0110*
IL-10	0,83	-0,83	0,0397*	RANTES	0,77	-0,77	0,1093
IL-12 p70	0,48	-0,48	0,4470	SDF-1	-0,86	0,86	0,0057**
IL-13	0,80	-0,80	0,0802	TGF- b 2	-0,81	0,81	0,0698
IL-15	-0,70	0,70	0,1914	TGF-b1	-0,44	0,44	0,4947
IL-1a	-0,86	0,86	0,0058**	Thrombopoietin	-0,27	0,27	0,6909
IL-2	0,84	-0,84	0,0331*	TIMP-1	-0,30	0,30	0,6494
IL-3	-0,68	0,68	0,2134	TNF-a	-0,18	0,18	0,7922
IL-5	-0,63	0,63	0,2728	TNF-b	0,33	-0,33	0,6163
IL-6	-0,86	0,86	0,0031**	VEGF	0,87	-0,87	0,0002***

**Tabla Anexa 4. Análisis de los factores solubles detectados mediante el array de citoquinas en función del total de CNVs.** El análisis fue realizado a partir de los valores de Z-score de las líneas M28 (CNVs<sup>High</sup>) y WM4235 (CNVs<sup>Low</sup>), obtenidos de la relativización de las intensidades detectadas tras el escaneo del array de citoquinas. El análisis estadístico fue realizado mediante T-test no pareado (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

Citoquina	Z-score M28 Control	Z-score M28 CDK4 O/E	p-valor	Citoquina	Z-score M28 Control	Z-score M28 CDK4 O/E	p-valor
Angiogenin	0,54	-0,54	0,37	Leptin	0,06	-0,06	0,93
BDNF	0,32	-0,32	0,63	LIF	-0,15	0,15	0,82
BLC	-0,34	0,34	0,61	LIGHT	-0,33	0,33	0,62
EGF	0,78	-0,78	0,10	MCP-1	0,05	-0,05	0,94
ENA-78	0,73	-0,73	0,15	MCSF	0,58	-0,58	0,33
Eotaxin	0,62	-0,62	0,29	MDC	-0,34	0,34	0,60
FGF-7	-0,65	0,65	0,25	MIF	0,29	-0,29	0,66
FGF-9	-0,52	0,52	0,40	MIP-1d	0,45	-0,45	0,48
Flt-3 Ligand	-0,56	0,56	0,35	NAP-2	0,54	-0,54	0,37
GCSF	0,81	-0,81	0,07	Osteoprotegerin	0,57	-0,57	0,34
GM-CSF	0,85	-0,85	0,02*	PARC	0,46	-0,46	0,47
GRO-a	0,32	-0,32	0,63	PDGF-BB	-0,19	0,19	0,78
IFN- g	-0,22	0,22	0,75	PIGF	-0,18	0,18	0,79
IGF-I	-0,02	0,02	0,98	RANTES	0,23	-0,23	0,74
IGFBP-2	-0,14	0,14	0,84	SCF	-0,46	0,46	0,47
IGFBP-4	0,63	-0,63	0,28	SDF-1	0,14	-0,14	0,83
IL-10	0,61	-0,61	0,30	TARC	0,66	-0,66	0,24
IL-12 p70	0,07	-0,07	0,92	TGF-b1	0,07	-0,07	0,92
IL-13	-0,40	0,40	0,54	Thrombopoietin	0,43	-0,43	0,51
IL-15	-0,78	0,78	0,10	TIMP-1	0,33	-0,33	0,62
IL-2	-0,70	0,70	0,20	TIMP-2	-0,54	0,54	0,38
IL-5	-0,29	0,29	0,66	TNF-a	-0,05	0,05	0,94
IL-7	0,05	-0,05	0,94	VEGF	0,46	-0,46	0,47
IP-10	0,43	-0,43	0,51				

**Tabla Anexa 5. Análisis de los factores solubles detectados mediante el array de citoquinas en función del total de CNVs.** El análisis fue realizado a partir de los valores de Z-score de la línea M28 CDK4 O/E (infectada con un vector lentiviral de sobreexpresión) y su respectivo control (vector vacío) obtenidos de la relativización de las intensidades detectadas tras el escaneo del array de citoquinas. El análisis estadístico fue realizado mediante T-test no pareado (\*p-valor<0.05; \*\*p-valor<0.01; \*\*\*p-valor<0.001).

<b>CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS (n=9)</b>		
<b>Sexo n (%)</b>		
	Hombre	4(44,4)
	Mujer	5(55,5)
<b>Edad (años)</b>		
	Media ( $\pm$ DS)	73( $\pm$ 17,5)
	Mediana (IQR)	74(63-84)
<b>Localización tumor primario</b>		
	Manos n(%)	1(11,1)
	Subungueal	1(11,1)
	Pies n(%)	8(75,8)
	Subungueal	1(11,1)
	Planta	4(44,4)
	Dedo	3(33,3)
<b>Breslow (mm)</b>		
	Media ( $\pm$ DS)	1,16( $\pm$ 0,8)
	Mediana (IQR)	1,22(0,8-1,6)
<b>Ulceración n (%)</b>		
	Sí	2(22,2)
	No	7(77,7)
<b>Índice mitótico n (%)</b>		
	<1/mm <sup>2</sup>	1(18,2)
	$\geq$ 1/mm <sup>2</sup>	5(63,6)
	N/A	3(18,2)
<b>Estadio AJCC 7ª edición n (%)</b>		
	0	1(11,1)
	IA	3(33,3)
	IB	3(33,3)
	IIA	1(11,1)
	IIB	1(11,1)

Supervivencia específica de MLA n (%)		
	Vivo	8(88,8)
	Muerte específica por melanoma	1(11,1)
Recaída n (%)		
	Sí	1(11)
	No	8(11,1)

Tabla Anexa 6. Características clinicopatológicas de la cohorte de pacientes de MLA de los que obtuvimos plasma sanguíneo. DS: Desviación estándar; IQR: Rango intercuartílico; N/A: Valores perdidos.



TIPO DE MELANOMA CUTÁNEO Y ESTADIO AJCC (n=17)		
<b>Tipo de tumor primario</b>		
	MES	8(11,1)
	NM	3(11,1)
	Spitzoide	1(75,8)
	Otro	5(11,1)
<b>Estadio AJCC 7ª edición n (%)</b>		
	0	0(0,0)
	IA	2(11,7)
	IB	1(5,9)
	IIA	1(5,9)
	IIB	1(5,9)
	IIC	1(5,9)
	IIIA	0(0,0)
	IIIB	2(11,7)
	IIIC	8(47,1)
	IIID	0(0,0)
	IV	1(5,9)

Tabla Anexa 7. Tipo de tumor primario y estadio AJCC de la cohorte de pacientes del Hospital Clínic (Barcelona) de la que obtuvimos plasma sanguíneo. MES: Melanoma de extensión superficial; NM: Melanoma nodular.

