



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Susceptibilidad a Melanoma: nuevos aspectos clínico-patológicos, desarrollo de herramientas y modelos de estudio y evaluación de medidas preventivas

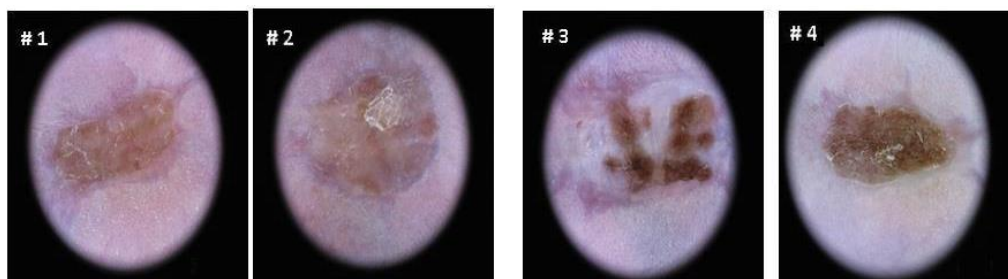
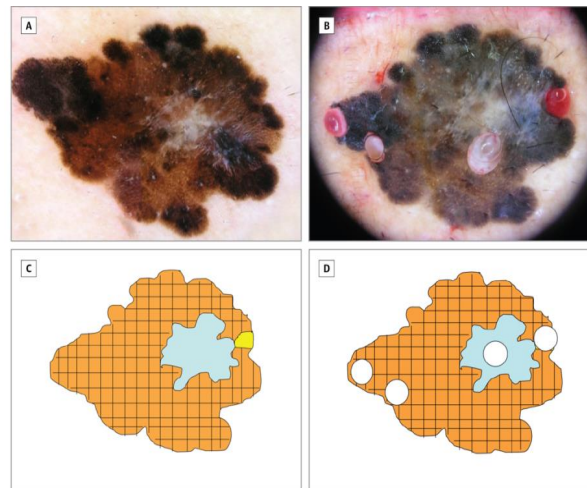
Paula Aguilera Peiró

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

SUSCEPTIBILIDAD A MELANOMA: NUEVOS ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS, DESARROLLO DE HERRAMIENTAS Y MODELOS DE ESTUDIO Y EVALUACIÓN DE MEDIDAS PREVENTIVAS



Programa de Doctorado: Anatomía Patológica

Doctorando: Paula Aguilera Peiró

Director: Susana Puig Sardà



Al Mario, al Max i a la Clara

Live as if you were to die tomorrow,

Learn as if you were to live forever

Mahatma Gandhi

Vive como si fueras a morir mañana,

Aprende como si fueras a vivir para siempre

Mahatma Gandhi

AGRADECIMIENTOS

Aquesta tesi no és el treball d'una sola persona. Molts de vosaltres hi heu col·laborat directament i, d'una manera o altra, les vostres idees, suggeriments i crítiques formen part d'aquest treball. D'altres també hi sou, d'una manera diferent però tant o més important. A tots i totes us ho vull agrair:

Als meus pares. Per haver-me fet qui sóc i ensenyar-me que amb esforç i dedicació tot es pot aconseguir.

Al Mario, per tot el temps que ha compartit al meu costat i pel temps que he hagut de robar-li per tal de desenvolupar aquesta tesi doctoral. A ell, al Max i a la Clara els brindo aquesta tesi. Ells saben la dedicació que hi he prestat, el temps que hi he invertit i que no ha estat per a ells. D'alguna manera és el moment per demanar-los disculpes, agrair-los la seva paciència i mostrar-los la meva estimació. Sobretot a tu Mario, que has patit tots els meus mals moments i desànims, i m'has ajudat a continuar, m'has animat i has estat el principal suport, com sempre. Gràcies!

Al meu germà Gerard, per creure en mi.

Un agraïment molt especial als meus Mestres, la Dra. Susana Puig i el Dr. Malvehy. Per haver-me inculcat la passió per la dermatoscòpia, la genètica, el Melanoma...però sobretot la passió per treballar amb ells, la passió per treballar bé. A la Dra. Susana Puig vull agrair la seva confiança i tot el temps dedicat en aquest projecte.

A la Dra. Teresa Estrach, per haver confiat en mi en un moment molt important i per seguir fent-ho cada dia.

A ti Cris, que has sido y espero sigas siendo una gran Maestra, no sólo en el campo de la dermatología. Contigo he descubierto la suerte que tenemos de que nos guste tanto lo que hacemos, la suerte que tenemos de no querer perdernos nada en esta vida, la suerte que tenemos de tenernos la una a la otra. Gracias por todo amiga.

Als amics i companys del laboratori, que tant m'han ensenyat i em continuen ensenyant cada dia. Molt especialment al Joan Anton Puig de qui cada dia intento

aprendre de la seva meticulositat i rigor científic. A la Dra. Celia Badenas, a la Miriam, a la Gemma, totes grans professionals i persones.

Als meus amics i companys Irene, Toni i Susana. Pel vostre suport i per fer que al vostre costat treballar sigui encara millor.

A tots els meus amics. Com que no em vull arriscar a deixar-me ningú, que es donin per agraïts tots aquells a qui en algun moment he escalfat el cap amb la tesi...i amb les angoixes concomitants. Que no s'amoïnin que sé molt bé qui són.

Al Víctor, per animar-me a escriure.

A tots els membres que formen part del servei de dermatologia o que han deixat empremta en ell: els residents passats i presents, els alumnes del Màster de Patologia Cutània Avançada, a tots els adjunts del servei. Al personal d'infermeria, molt especialment al Pablo, Dani, Maria Eugènia i Asun.

Al Gabriel Salerni i a l'Antonio Gomes a qui segueixo sentint molt a prop a pesar de la distància que ens separa.

Als pacients, co-autors anònims d'aquesta tesi.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN

I. EPIDEMIOLOGÍA DEL MELANOMA

II. SUSCEPTIBILIDAD A MELANOMA

- 2.1- Características Fenotípicas
- 2.2- Melanoma Familiar
- 2.3- Genes de Susceptibilidad a Melanoma
 - 2.3.1- Genes de Alta Penetrancia
 - 2.3.2- Genes de Mediana Penetrancia
 - 2.3.3- Genes de Baja Penetrancia

III. RADIACIÓN ULTRAVIOLETA

- 3.1- Efectos moleculares y genéticos de la Radiación Ultravioleta en la piel. Fotocarcinogénesis
- 3.2.- Radiación Ultravioleta, vías moleculares de reparación del ADN y susceptibilidad a Melanoma

IV. PREVENCIÓN DEL MELANOMA EN PACIENTES DE ALTO RIESGO

- 4.1- ¿Es posible la prevención?
- 4.2- ¿Es necesaria la prevención?
- 4.3- Prevención primaria del Melanoma en pacientes de alto riesgo. Fotoprotección
 - 4.3.1- Fotoprotectores tópicos
 - 4.3.2- Fotoprotección sistémica
- 4.4- Prevención secundaria del Melanoma en pacientes de alto riesgo

HIPÓTESIS

OBJETIVOS

RESULTADOS

- I. TRABAJO I. DERMATOSCOPIA *EX VIVO* COMO HERRAMIENTA DE ORIENTACIÓN PARA EL CORRECTO MUESTREO DE MELANOMA PARA BIOBANCO.
- II. TRABAJO II. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DE LOS MELANOMAS FAMILIARES Y ESPORÁDICOS EN BARCELONA, ESPAÑA.
- III. TRABAJO III. BENEFICIOS DEL EXTRACTO ORAL DE *POLYPODIUM LEUCOTOMOS* EN PACIENTES DE ALTO RIESGO A MELANOMA.
- IV. TRABAJO IV. LA PRESENCIA DE VARIANTES RHC EN *MC1R* INCREMENTA LA SUSCEPTIBILIDAD A MELANOMA INDUCIDA POR LA RADIACIÓN

ULTRAVIOLETA EN UN MODELO MURINO DE PIEL HUMANIZADA DE MELANOMA FAMILIAR

DISCUSIÓN

I. MELANOMA EN PACIENTES DE ALTO RIESGO. ESTRATEGIAS DE IDENTIFICACIÓN. NUEVAS APROXIMACIONES PARA SU MEJOR ENTENDIMIENTO Y PREVENCIÓN

- 1- Dermatoscopia *Ex vivo* en tumores melanocíticos. Banco de tejidos
- 2- Desarrollo de un modelo de Dermatoscopia *Ex vivo* para el correcto muestreo del MM. Validación y utilidad

II. ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN PRIMARIA Y SECUNDARIA EN PACIENTES DE ALTO RIESGO

- 1- Caracterización clínica, histológica e inmunohistoquímica del MM familiar
- 2- Impacto de la RUV en el riesgo genético a MM
- 3- Necesidad de estrategias específicas de prevención primaria
- 4- Refuerzo de las estrategias de prevención primaria en pacientes de riesgo

III. FOTOCARCINOGENÉISIS. MÁS ALLÁ DE LA PIGMENTACIÓN

- 1- De las vías de pigmentación a estrategias de prevención
- 3- Validación y utilidad de un modelo murino humanizado de MM familiar

CONCLUSIONES

REFERENCIAS

INTRODUCCIÓN

I. EPIDEMIOLOGÍA DEL MELANOMA

El melanoma (MM) constituye la causa de mayor morbilidad dermatológica, con una incidencia cada vez mayor, manteniendo un incremento anual del 6%. La incidencia de MM se ha incrementado en las últimas décadas más que ninguna otra neoplasia(1). En Estados Unidos los diagnósticos de MM se han incrementado en un 619% y la mortalidad se ha incrementado un 165% entre 1950 y 2000(2). La mayor tasa de incidencia la tienen países como Australia y Nueva Zelanda, seguidos de Norte América y el Norte de Europa(1). Estudios a nivel mundial confirman que esta tendencia al alza se mantendrá al menos en las próximas dos décadas, y se espera que la incidencia se doble de nuevo(3). Las estimaciones en nuestro medio confirman la misma tendencia en el resto de población caucásica, con el mayor incremento de incidencia que cualquier otro tumor, especialmente en mujeres jóvenes. La tasa de mortalidad continúa aumentando en mayores de 65 años, reflejando una mayor acumulación de fotodaño inducido por la Radiación Ultravioleta (RUV) y estadíos más avanzados al diagnóstico(1). La incidencia de MM se ha incrementado en varones y mujeres jóvenes, fundamentalmente a expensas de MM delgados. De forma destacada, estos MM delgados representan un 30% de la mortalidad por MM(1). Teniendo en cuenta que el MM es la segunda neoplasia más frecuente en menores de 39 años (es el tumor más frecuente en mujeres de entre 25 y 29 años y varones de 30 y 34 años), es una de las neoplasias con mayor impacto en años de vida productiva perdidos y por tanto en la economía de un país en cuanto a costes derivados de esta mortalidad prematura(4). La incidencia y mortalidad de MM en Europa varía considerablemente entre países(5), siendo las mayores tasas de incidencia en los países del norte y del oeste de Europa y las menores en los países meridionales. Estas variaciones son debidas al estilo de vida (vacaciones de invierno, conducta de

exposición solar), así como a los fototipos prevalentes y otras características clínicas como el número de nevus o la prevalencia de pelirrojos. Algunas regiones han reportado una tendencia a la baja mientras que en otras la tendencia al incremento de la incidencia persiste(6)(7).

España es una de las áreas de Europa con una tasa más baja de incidencia y mortalidad. A pesar de que hay pocos estudios sobre la epidemiología del MM en España, éstos reportan un incremento de incidencia en MM en las últimas décadas(8). En nuestra área, Cataluña, sólo existían dos registros poblacionales de cáncer, que en 2001 cubrían solamente un 19% de la población. Puig y colaboradores de la *Xarxa Catalana de Melanoma* han publicado en 2015 un trabajo en el que se demuestra que en nuestra población la incidencia de MM se ha incrementando en la última década y la tendencia es que siga subiendo en un futuro(9). La conclusión de este trabajo es que la incidencia de MM sigue subiendo en Cataluña, como en otros países mediterráneos, con tendencia a que se incremente la edad media al diagnóstico, un incremento en el número de MM *in situ*, pero la media del índice de Breslow se mantiene estable, con un posible efecto dilucional de nuevos casos de MM provenientes de inmigrantes de áreas de baja incidencia de MM. Por tanto, en Cataluña la incidencia de MM se incrementa en la población de mayor edad pero no en la población más joven, más influenciada en el periodo de estudio por flujos migratorios (9).

II. SUSCEPTIBILIDAD A MELANOMA

El desarrollo de MM depende de factores propios de las células tumorales, del propio individuo y del ambiente. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que el principal factor de riesgo ambiental es la radiación ultravioleta (RUV) (10)(11). La relación entre la exposición a la RUV y el riesgo es compleja, siendo la exposición

intermitente responsable de un mayor riesgo que la exposición crónica a lo largo de la vida(11). En el individuo existen varias características fenotípicas asociadas a un mayor riesgo a desarrollar MM: número de nevos, fototipo, color de los ojos, color del cabello y el pertenecer a una familia con varios casos de MM u otros tipos de cáncer. En la actualidad se conocen muchos de los genes implicados en esta predisposición genética a desarrollar MM. El incremento de riesgo que comporta cada uno de los genes es diferente, y se pueden clasificar en aquéllos que incrementan el riesgo más de 100 veces y hasta 500 ó 1000 veces (genes de alta penetrancia), entre 5 y 100 veces (penetrancia media) y entre 1 y 3 veces (baja penetrancia).

2.1- Características Fenotípicas

-Raza

Más del 95% de los MM se desarrollan en población de raza blanca (12). Las personas de raza blanca o piel clara son más susceptibles a la acción mutagénica de la RUV. La menor incidencia de melanoma en personas de raza negra o en Hispanos se ha atribuido al efecto protector de la melanina. La epidermis de los afroamericanos tiene un factor de protección solar natural de 13.4, filtrando de forma efectiva dos veces más la cantidad de RUV que la piel de americanos de raza blanca(13). La menor incidencia de MM entre los afroamericanos es debida a un incremento en la densidad de melanina i distribución de los melanosomas(14). Los melanosomas de mayor tamaño con un incremento en el contenido de melanina absorben y reflejan mayor energía que los melanosomas de menor tamaño de las personas de raza blanca. Por estas razones, la RUV podría jugar un papel secundario en la patogénesis del cáncer de piel en las personas de piel oscura.

-Número de Nevus

La etiología de los nevus es compleja. Gandini y colaboradores, en un metanálisis realizado para la evaluación de los factores de riesgo a MM confirman que el número de nevus y la presencia de nevus clínicamente atípicos son un factor de riesgo independiente importante para el desarrollo de MM(15). El número y la presencia de nevus clínicamente atípicos son el principal factor de riesgo independiente para el desarrollo de MM en todas las poblaciones caucásicas y la magnitud del riesgo (OR 5-20) es mucho mayor que el riesgo reportado para la exposición solar o el color de la piel (1.5-2)(16).

La presencia de múltiples nevus podría indicar una mayor susceptibilidad genética a desarrollar MM, y la posibilidad de que los genes implicados en la nevogénesis podrían jugar un papel directo en la progresión del MM no puede excluirse. Además, la presencia de múltiples nevus puede indicar una mayor exposición a la RUV, así independientemente causando un mayor número de nevus y un incremento de riesgo a MM.

-Color de los ojos

La relación entre las características fenotípicas entre sí hace difícil la atribución del riesgo a neoplasia, sin embargo, diversos estudios y metanálisis han confirmado que las personas con color claro de los ojos (verde o azul) tienen un mayor riesgo de desarrollar MM que las personas con ojos oscuros (17).

-Color del cabello

El metanálisis de Gandini y colaboradores demuestra que el color de pelo claro es consistentemente en todos los estudios un factor de riesgo para desarrollar MM, estadísticamente significativo en la mayoría de estudios(17). Las personas con pelo

rojo tienen significativamente un mayor riesgo a desarrollar MM que las personas de pelo oscuro, y las personas de pelo rubio o castaño claro tienen también significativamente un mayor riesgo que las personas de pelo oscuro, aunque el riesgo es menor que las personas de pelo rojo. Estudios de Bliss y colaboradores demuestran que el color de pelo como factor de riesgo es mayor cuando se evalúa en edades previas a los 18 años(18).

2.2-Melanoma Familiar

Aproximadamente entre el 6 y el 12 % de todos los MM ocurren en un contexto familiar, entendiéndose por MM familiar el que se desarrolla en individuos con 1 ó más familiares de primer o segundo grado afectados de MM o cáncer de páncreas(19). Generalmente se ha dicho que el MM familiar es clínica e histológicamente indistinguible del MM esporádico. De todas formas, hay diferencias en cuanto a la edad de debut, el grosor en milímetros de Breslow y la frecuencia de MM múltiple(20). El MM familiar tiene una menor edad de debut, un menor índice de Breslow y una mayor frecuencia de MM múltiple que el MM esporádico. Clásicamente se consideraba que algunos de los *clustering* familiares ocurrían por azar, siendo esto más probable en poblaciones de fototipos claros en áreas con gran exposición al sol, como Australia. De hecho, en algunos de estos casos puede ocurrir que los familiares compartan los mismos factores de riesgo genéticos como el fototipo, el color del pelo y de los ojos y la presencia de efélides o nevus clínicamente atípicos y pudieran haber compartido los mismos hábitos de exposición ambiental de riesgo. Solamente un subgrupo de pacientes con MM familiar son portadores de una mutación hereditaria en un gen de susceptibilidad a MM conocido(19).

2.3- Genes de Susceptibilidad a Melanoma

En el momento de la realización de este trabajo de investigación se han identificado tres principales genes de alta susceptibilidad a MM y dos genes de mediana susceptibilidad a MM. Se heredan de forma autosómica dominante mediante un patrón de transmisión vertical de la enfermedad y afectando por igual hombres y mujeres(21).

2.3.1- Genes de alta Penetrancia. *CDKN2A*, *CDK4*, *BAP1* y otros

- ***CDKN2A***

CDKN2A (MIM#600160), localizado en el cromosoma 9p21(22)(23) es el principal gen de alta susceptibilidad a MM identificado hasta la fecha de la realización de este trabajo. El locus *CDKN2A* comprende 4 exones y codifica dos proteínas diferentes, las cuales son transcritas en diferentes pautas de lectura y modificadas mediante *splicing* alternativo (**Figura 1**). El transcrito *alpha* que comprende el exón 1- α , el exón 2 y el exón 3, codifica para p16INK4A y actúa como un gen supresor tumoral el cual se une a la quinasa dependiente de ciclina 4 (*CDK4*) y a la quinasa dependiente de ciclina 6 (*CDK6*). Esta unión inhibe la asociación de las quinasas con la ciclina D1, evitando la formación del complejo CDK/Ciclina D. Este complejo fosforila la proteína del Retinoblastoma permitiendo al melanocito la progresión del ciclo celular atravesando el punto de control de la fase G1(24). El transcrito beta el cual comprende el exón 1 β y el exón 2, codifica para la proteína p14ARF. Esta proteína regula la función de p53 y la proteína del Retinoblastoma, uniéndose e inhibiendo la función de HDM2 y, por tanto, favoreciendo la apoptosis y bloqueando la transformación de los melanocitos en células malignas(25).

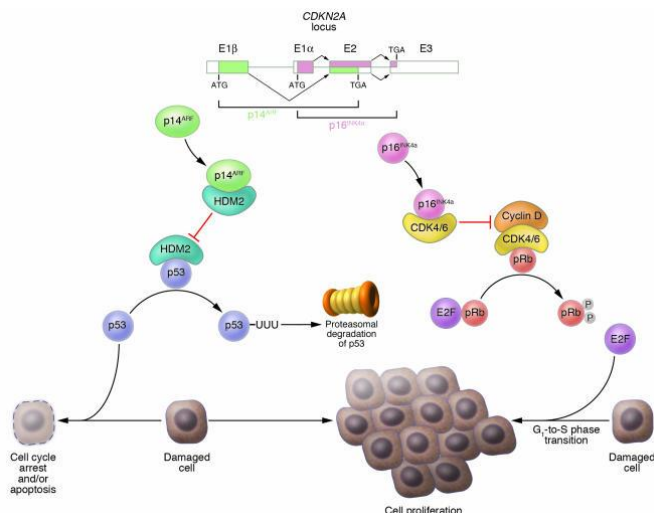


Figura 1: Función de las proteínas p16INK4 y p14ARF en el control del ciclo celular.

Aproximadamente el 20% de las familias afectadas de MM familiar tanto en Europa como en América o Australia son portadoras de mutaciones en *CDKN2A*; aunque la frecuencia varía considerablemente entre países (0-50%), siendo la frecuencia más baja la que se observa en familias de países europeos. La frecuencia de detección de mutaciones en *CDKN2A* varía considerablemente entre áreas geográficas pero está directamente relacionada con el número de pacientes con MM en la familia. La frecuencia de mutaciones aumenta a medida que se incrementan el número de casos con MM en la familia. Así pues, la frecuencia de mutación es menor del 5% en familias de 2 miembros y se incrementa a más del 50% en familias con más de 6 casos de MM(21)(26)(27). La ocurrencia de múltiples MM en un individuo también incrementa la probabilidad de encontrar mutación en *CDKN2A*. Aproximadamente el 10% de los pacientes con MM múltiple pero sin historia familiar de MM son portadores de mutación en *CDKN2A*. Igual que ocurre con el MM familiar, en los casos de MM múltiple, se incrementa la probabilidad de mutación en *CDKN2A* a mayor número de MM. Así, la frecuencia de mutación es del 10% en pacientes con dos MM y del 39.1% en pacientes con más de dos MM(28)(29). La ausencia de historia familiar en estos pacientes con MM múltiple sugiere que existen otros factores (genéticos y/o

ambientales) que afectan la expresión fenotípica de mutaciones en *CDKN2A*. La ocurrencia de MM múltiple en un paciente con historia familiar de MM incrementa también la frecuencia de detección de mutación en *CDKN2A*(21).

- ***CDK4***

CDK4 (MIM#123829), localizado en el brazo largo del cromosoma 12 (12q13), funciona como un oncogén resistente a la inhibición fisiológica normal de p16. Está involucrado en el control de la progresión hacia la fase G1 del ciclo celular. Hasta la fecha de realización del trabajo sólo se han detectado mutaciones en este gen en 12 familias(30). Las mutaciones descritas producen cambios en el dominio de unión de p16INK4A, lo que se traduce en una disminución de la inhibición de *CDK4* por p16INK4A y, subsecuentemente, una progresión del ciclo celular(31).

- ***BAP1***

BAP1(MIM# 603089), localizado en el cromosoma 3p21, es un gen supresor tumoral implicado en el fenotipo metastático de los MM uveales, en los que se ha evidenciado que el 84% de los tumores metastáticos tienen mutaciones somáticas inactivadoras(32). Las mutaciones germinales inactivadoras en *BAP1* se han asociado recientemente a un síndrome autosómico dominante que asocia tumores melanocíticos atípicos, mesotelioma maligno, MM uveal, MM cutáneo y posiblemente otras neoplasias como el carcinoma renal(33)(34)(35).

- ***POT1***

POT1(MIM #615848), localizado en el cromosoma 7q31.33, es un miembro de la familia de las telombinas y codifica para una proteína nuclear implicada en el mantenimiento de los telómeros. Esta proteína funciona como miembro de un complejo multiproteína que se une al dominio TTAGGG repetitivo de los telómeros,

regulando su longitud y protegiendo la parte final de los cromosomas de recombinaciones erróneas, inestabilidad cromosómica y segregación cromosómica anormal. Recientemente se han identificado familias en las que el MM co-segrega con variantes con pérdida de funcionalidad en el gen *POT1*, con una proporción de individuos presentando MM a edad temprana y múltiples primarios(36)(37). Se ha visto que estas variantes afectan al mRNA *splicing* de *POT-1* o alteran residuos clave en los dominios altamente conservados de unión a oligonucleótidos/oligosacáridos de *POT1*, afectando la unión proteína-telómero, lo que conlleva un incremento de longitud y fragilidad del telómero. Por tanto, las variantes en *POT1* predisponen al desarrollo de MM mediante un efecto directo en los telómeros.

- ***TERT***

TERT (MIM#615134), localizado en el cromosoma 5p15.33, codifica para la telomerasa transcriptasa inversa, que es una ribonucleoproteína polimerasa que mantiene los extremos de los telómeros por adición de repeticiones del tipo 5'-TTAGGG-3'. La enzima consta de un componente proteico con actividad transcriptasa inversa, codificada por este gen, y un componente de ARN, que sirve como molde para sintetizar la repetición telomérica. La expresión de la telomerasa juega un importante papel en la senescencia celular, por lo que es normalmente reprimida en células somáticas postnatales, lo que deriva en un acortamiento progresivo de los telómeros. La desregulación de la expresión de la telomerasa en células somáticas puede derivar en procesos de oncogénesis.

Estudios previos han sugerido la relación entre una mayor longitud telomérica y mayor riesgo a MM, mayor número y tamaño de nevus(38). El locus *TERT* se ha asociado con MM en estudios *GWAS* (*genome wide association scan*), lo que va a favor del papel de la unidad telomérica y la longevidad en este tumor(39). Recientemente, se ha descrito una mutación germinal en el promotor de *TERT* que había sido implicada en MM esporádico, como responsable de la susceptibilidad a MM en una

familia de melanoma (40). El mayor número de nevus y el incremento de riesgo a MM parecen estar asociados a una disminución de la senescencia, lo que podría producir una ventaja en cuanto a supervivencia y evolución. Se cree que esta disminución de la senescencia es lo que hace a estos individuos con elevado número de nevus y síndrome de nevus clínicamente atípico más susceptibles a cáncer, ya que el MM se encuentra a veces en el contexto de síndromes de cáncer familiar y la longevidad en estos casos podría ser compensada con un incremento de riesgo a neoplasia(16).

2.3.2 Genes de mediana Penetrancia. *MC1R*, *MITF*

- ***MITF***

El Factor de Transcripción asociado a Microftalmia (*MITF*) (MIM#614456) es una proteína con un papel crucial en la regulación de los melanocitos. Modula varios genes implicados en la diferenciación y la pigmentación y también tiene un papel en el desarrollo de MM(41). Mediante secuenciación masiva en casos índice de varias familias con MM familiar se ha descrito una nueva variante germinal de *MITF* que predispone a MM(42). La variante E318K incrementa la actividad trascricional de *MITF*, favoreciendo la clonalidad, migración e invasión del melanocito; propiedades asociadas todas ellas a un fenotipo maligno(43). Esta variante se asocia también a MM múltiple, carcinoma renal, mayor número de nevus y color no azul de ojos.

- ***MC1R***

Algunos rasgos de pigmentación están relacionados con el riesgo a MM: piel clara, pelo rojo, incapacidad para broncearse y las efélides faciales son factores de riesgo fenotípicos para desarrollar MM(17). La melanina es un pigmento que protege la piel de los efectos adversos producidos por la radiación ultravioleta (RUV). Existen dos tipos de melanina: eumelanina y feomelanina. La eumelanina es la responsable de la pigmentación constitutiva en los fototipos más oscuros.

El gen del receptor 1 de la Melanocortina (*MC1R*; MIM#155555) localizado en el cromosoma 16q24.3 codifica para un receptor de la hormona estimuladora del melanocito y está implicado en el proceso de pigmentación. El gen *MC1R* es altamente polimórfico en la población caucasoide. La activación del receptor salvaje (*wild type*) incrementa la proporción de eumelanina respecto a la de feomelanina. Los individuos con variantes germinales del *MC1R* presentan una disminución de la síntesis de eumelanina respecto a la de feomelanina y un incremento de la sensibilidad a la RUV. Algunas variantes de *MC1R* se han asociado solamente a MM (p.I155T, p.R163Q)(44), mientras que otras se han asociado a MM y cabello rojo (p.D84E, p.R142H, p.R151C, p.R160W, y p.D294H) sugiriendo diferentes vías de riesgo a MM asociadas a *MC1R*(45). El mecanismo subyacente a este incremento de riesgo a MM se ha asociado a un incremento de daño producido a los melanocitos por una mayor proporción de feomelanina, menos protectora. Aunque esta vía de incremento de riesgo a MM dependiente de la RUV es lógica, estudios recientes demuestran que la feomelanina, que se acumula en el contexto de algunas variantes de *MC1R* y causa el fenotipo de cabello rojo/piel clara, incrementa el riesgo a MM por una vía independiente de la RUV(46). Además, *MC1R* actúa como modificador de riesgo, incrementando la penetrancia de MM en portadores de mutación en *CDKN2A*, disminuyendo la edad de debut unos 20 años comparado con portadores solamente de mutación en *CDKN2A*. A los 50 años el 81% de portadores de mutación en *CDKN2A* y variantes de *MC1R* desarrollaron MM, comparado con el 57% de portadores de mutación en *CDKN2A* (47)(48).

El riesgo a MM en portadores de mutación en *CDKN2A* o en otros genes de alta penetrancia se modifica por múltiples factores que incluyen las variantes en *MC1R*, la variante E318K en *MITF*, fenotipo, rasgos de pigmentación y número de nevus. El estudio del papel de otros posibles genes modificadores, identificados como

candidatos mediante estudios de secuenciación masiva podrá ayudar en un futuro a comprender mejor la complejidad de la genética del MM.

2.3.3 Genes de baja Penetrancia.

Varios genes de baja penetrancia juegan también un papel en la susceptibilidad a MM. Son alelos de bajo riesgo como *TYR*, *ASIP*, *TYRP1*, *OCA2*, *SLC45A2*, *GSTM1*, *CYP2D6*, *VDR*, *IL-9*, *IL-10*, *TNF*, *HLA-DQB0301K* y muchos otros. Son genes relacionados con la pigmentación, el número de nevus, la respuesta inmune, la reparación del ADN, el metabolismo y el receptor de la vitamina D (*VDR*).

- **Genes de pigmentación/nevogénesis**

ASIP, localizado en el cromosoma 20q11.22, codifica para una proteína señalizadora de agouti, antagonista de la unión de *MSH* a *MC1R*. Múltiples estudios han demostrado un incremento de riesgo significativo a desarrollar MM en portadores de algunos SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) en poblaciones Europea y Australiana(49)(50).

TYR, localizado en el cromosoma 5q34, codifica para la tirosinasa, responsable del color de los ojos y de la respuesta de bronceado. Variantes en este gen se han relacionado de forma significativa con un incremento de riesgo al desarrollo de MM(51).

TYRP1, localizado en el cromosoma 9p23. Codifica para la proteína relacionada con la tirosinasa-1, encargada de estabilizar la tirosinasa. Algunos estudios han demostrado el efecto protector de la variante rs1408799 del gen *TYRP1* frente al desarrollo de MM(52).

OCA2(gen relacionado con el albinismo óculo-cutáneo tipo II), localizado en el cromosoma 15q11.2-12, codifica por una proteína transmembrana de los melanosomas que modifica el color de los ojos y la pigmentación. Se ha demostrado

una asociación significativa entre algunas variantes en este gen y el incremento de riesgo a MM y con un elevado número de nevus(53).

SNPs de 5 de los genes mencionados anteriormente (*MC1R*, *SLC45A2*, *OCA2*, *TYR* y *ASIP*) explican aproximadamente entre un tercio y una mitad de la diferencia del riesgo a MM debido a factores de pigmentación(54). Existen otros genes relacionados con la pigmentación que se están investigando como genes candidatos a la susceptibilidad a MM: *KIT*, *KITLG*, *IRF*, *HERC2*, *PAX3*(55), *EDNRB*, *ADTB3A*, *CHS1*, *MILANA*, *ATRN*, *SOX10*, *HPS*, *MGRN1*, *MYO5A*, *SLC24A4* y *PLA2G6*. La mayoría de estos genes candidatos están relacionados con la producción o el transporte de melanina, el color del cabello, la capacidad para broncearse, el número de nevus o la proliferación, diferenciación y supervivencia de los melanocitos.

- **Genes de reparación del ADN**

La RUV es principal factor de riesgo ambiental para desarrollar MM. La principal defensa del organismo frente al daño inducido en el ADN por la RUV es la vía de reparación por escisión de nucleótidos (NER)(56). Varios de los genes implicados en esta vía se han estudiado como genes candidatos a un mayor riesgo a desarrollar MM. Existen estudios que han demostrado la asociación de algunas variantes en *XPD/ERCC2*, *ERCC1*, *XPF*, *XRCC3*, *MDM2* y *APEX1* con un mayor riesgo a desarrollar MM(57).

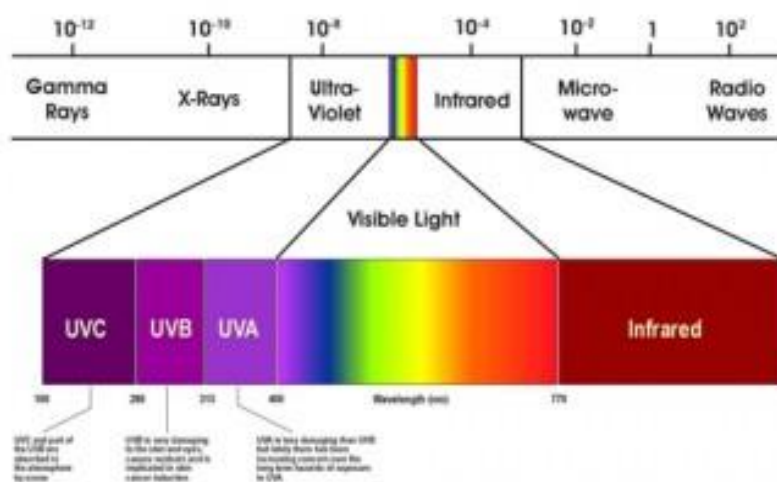
Otros estudios han demostrado un incremento de riesgo a MM asociados a algunas variantes de genes implicados en la regulación de la actividad de la telomerasa, como *TERT1* y *TRF1*, así como una disminución del riesgo a MM asociado al locus *TERT-CLPTMIL*(58).

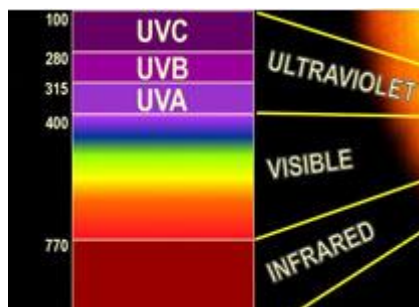
- Polimorfismos del receptor de la vitamina D

El receptor de la vitamina D (VDR) es un receptor hormonal intracelular que se une a la forma biológicamente activa de la vitamina D, 1,25-dihidroxit vitamina D o calcitriol, para mediar sus efectos interactuando con elementos de respuesta de genes diana. El gen del VDR está localizado en el cromosoma 12p12-q14 y se ha estudiado como un gen de susceptibilidad a MM, con la idea que algunos polimorfismos en este gen podrían alterar la actividad del receptor y actuar en definitiva de forma similar a un déficit sistémico de vitamina D, lo que se ha asociado a con un incremento de riesgo a determinados cánceres, incluyendo el MM(59). Estudios han demostrado la asociación de los polimorfismos en los alelos *FokI*, *BsmI*, *TaqI*, *Apal* y *A-1012G* con el incremento de riesgo a desarrollar MM(60)(61)(62).

III. RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (RUV)

La radiación UV, comprendida entre los 200-400nm del espectro electromagnético es un componente altamente energético de la radiación solar. La RUV se divide en tres categorías según su longitud de onda: UVA (320-400nm), UVB (290-320nm) y UVC (200-290nm). EL 95% del UVA y el 1-10% del UVB llegan a la superficie terrestre, mientras que el 100% de UVC es absorbido por la atmósfera y la capa de ozono.

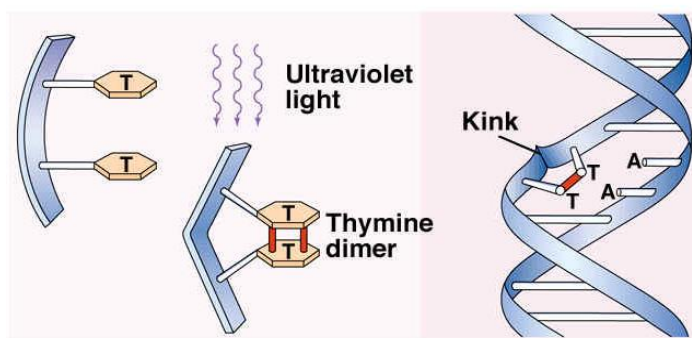




3.1- Efectos moleculares y genéticos de la RUV en la piel. Fotocarcinogénesis

La RUV en la piel es absorbida por cromóforos. Los cromóforos de la RUV en la piel son macromoléculas como las proteínas, lípidos y ADN, y produce en este último mutaciones características, fundamentalmente dos tipos de fotoproductos: los dímeros de pirimidina tipo ciclobutano (CPDs), y los fotoproductos de 6-4 pirimidina pirimidona (6-4PPs)(63). Ambas lesiones se forman exclusivamente en dímeros de pirimidinas, constituyendo los “hot spots” de mutación inducidos por RUV(64).

Pyrimidine Dimer



Ambas lesiones son reparadas por el sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER, *nucleotide excision repair*), que implica la acción de unas 20 a 30 proteínas que actúan de forma secuencial durante el reconocimiento del daño. Este mecanismo de reparación es mucho más eficaz para los fotoproductos 6-4 que para la reparación de los dímeros de pirimidina (65). Estas lesiones no reparadas, dan lugar a

mutaciones en el momento de la división celular y por ello se consideran premutaciones. La RUV induce predominantemente transiciones C-T y CC-TT en las secuencias de dímeros de pirimidina, constituyendo la característica más destacada de la mutagénesis inducida por la RUV(65). Cuando estas mutaciones ocurren en genes reguladores de la apoptosis, progresión del ciclo celular y genes implicados en mecanismos de reparación, éstos no tienen lugar y se produce como consecuencia una proliferación celular descontrolada.

La RUVB se ha considerado la responsable del mayor daño biológico a largo-medio plazo de la fotocarcinogénesis. La RUVA, clásicamente se ha considerado de menor capacidad carcinógena, más responsable de la inducción de melanina y de la fotoinmunosupresión, principalmente a través de la isomerización de la forma *trans* a la *cis* del ácido urocánico, otro cromóforo cutáneo. Sin embargo, actualmente, se ha demostrado que la RUVA por sí sola tiene capacidad de producir daño directo en el ADN, generando también CPDs (principalmente dímeros TT) por una vía independiente del daño oxidativo(66).

El cáncer cutáneo se incluiría en un modelo de carcinogénesis consistente en la iniciación, promoción y progresión tumoral, donde el acúmulo de alteraciones genéticas, sumado a la ineficacia en la eliminación de células anormales, y a factores ambientales favorecedores, explicaría la génesis tumoral. Probablemente la fotocarcinogénesis de los tumores queratinocíticos sea diferente a la que induce los melanomas. Se sabe que melanomas y carcinomas exhiben diferentes mutaciones y activación de oncogenes, lo que probablemente traduce diferente tipo de daño del ADN.

3.2- RUV, vías moleculares de reparación del ADN y susceptibilidad a melanoma

Los sistemas de reparación del ADN juegan un papel crucial en el mantenimiento de la integridad del genoma contra agentes genotóxicos que son los responsables del desarrollo tumoral(67). Se estima que a diario cada célula humana sufre una media de 25.000 cambios espontáneos de bases del global 3×10^9 que posee su genoma, a consecuencia de las agresiones que recibe. La RUV es la principal causante del daño en el ADN de las células de la piel. Para combatir este daño, el organismo tiene diferentes vías intracelulares específicas, y eficazmente dirigidas a prevenir la carcinogénesis inducida por carcinógenos, son las llamadas vías de reparación del ADN. En el caso del daño producido por la RUV (CPD's y 6-4PP), éste es reparado mediante el Sistema de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER)(64). El grado de daño determina el proceso utilizado por la célula, ya sea inicialmente mediante la detención del ciclo celular, identificación y reparación del ADN dañado, o si el daño es muy extenso o la reparación ha sido ineficaz mediante la inducción de la senescencia o muerte celular (apoptosis). Una de las vías de regulación celular ante el fotodaño es la activación de “*checkpoints*” del ciclo celular los cuales promueven el arresto del ciclo, tanto en la transición de fase G1 a S, en la de G2 a mitosis, o en la fase de replicación del ADN. Según el tipo de daño del ADN inducido por un carcinógeno, se activará o detendrá el ciclo celular mediado por una vía diferente(24), (68).

Varias proteínas están implicadas en la regulación del ciclo celular y tienen la función de inducir un estacionamiento o inhibición del ciclo, de forma que haya tiempo suficiente para la reparación del daño, como por ejemplo: p53 (gen *TP53*), p21 (gen *CDKN1A*) y p14 y p16 (ambas codificadas por *CDKN2A*). En caso de que esta detención o inhibición del ciclo no se produzca, se induce la apoptosis celular, evitando así que la célula se replique y aparezca un clon aberrante.

La alteración de estos mecanismos de reparación se pone claramente de manifiesto por la alta incidencia de tumores cutáneos que presentan los pacientes afectados por síndromes con defectos del sistema de Reparación por Escisión de Nucleótidos (NER) como el *xeroderma pigmentosum* (XP), el *Síndrome de Cockayne* (CS) y la *Tricotiodistrofia* (TTD)(69). En estos síndromes, numerosas lesiones producidas por la RUV no reparadas dan lugar a la aparición de mutaciones en genes clave que posteriormente desencadenan tumores cutáneos (MM y no-MM). Así, la mayoría de enzimas implicadas en las vías de reparación se denominan con las iniciales XP. Se conocen distintos mecanismos: 1) Escisión de bases (gen *XRCC1*); 2) Escisión de nucleótidos (genes *XPA-G* y *XPV*) y 3) Reparación de la doble cadena homóloga (gen *XRCC3*)(69)(70). Según qué polimorfismos y/o mutaciones presenten dichos genes la reparación del daño inducido por la RUV será más o menos eficiente(71).

También se ha relacionado la expresión de la proteína p16 (inducida por la exposición a RUV como mecanismo reparador del ADN) y del gen *MC1R* con la reparación. De forma que se demuestra una estrecha relación entre síntesis de melanina y reparación del ADN. El gen *MC1R* juega un papel importante en la fotocarcinogénesis estimulando la producción de p53 y p16 ante un daño fotoinducido(72) o a través de la vía *MITF* la cual está implicada en la proliferación celular tumoral, apoptosis y vías de reparación del ADN(73).

Por otra parte se ha sugerido que la RUVA podría tener incluso un mayor papel en la melanomagénesis por la combinación de daño directo del ADN e indirecto del daño oxidativo, que se potenciaría más aún a través de una mayor síntesis de melanina. En un estudio reciente se pudo demostrar que tanto la RUVB como la RUVA inducen CPDs de igual manera en melanocitos como en queratinocitos. En cambio, el daño oxidativo inducido por UVA (a través de 8-oxo-7,8-dihydroguanine) fue el doble en melanocitos, lo que apoya también la hipótesis de que a mayor síntesis de melanina en el melanocito, mayor estrés oxidativo sufre la célula(74).

IV. PREVENCIÓN DE MM EN PACIENTES DE ALTO RIESGO

4.1- ¿Es posible la prevención?

El MM cumple todos los requisitos necesarios para poder establecer una prevención eficiente. Primero, porque se conoce el principal factor ambiental implicado, la RUV, que es evitable y modificable (prevención primaria). En segundo lugar, porque el MM es visible y cada vez mejor conocido por el experto. Y en tercer lugar, porque se puede identificar mediante la historia personal, familiar y el fenotipo, el grupo de población de mayor riesgo endógeno, en quienes se puede diseñar un seguimiento específico dermatológico.

El MM se considera una de las neoplasias más prevenibles y está asociado a múltiples factores de riesgo identificables. Es una neoplasia curable cuando se diagnostica en sus estadios más precoces y se trata correctamente. La mejor estrategia para reducir la incidencia de MM es la prevención primaria, mientras que la prevención secundaria es fundamental para reducir el número de muertes por MM. Son factores de riesgo identificables para desarrollar MM el número elevado de nevus, el fototipo claro, los ojos claros y el cabello rubio o pelirrojo, la historia de quemaduras solares durante la infancia y la historia personal o familiar de MM. Dentro de este último grupo de pacientes debemos destacar el alto riesgo de pacientes portadores de mutaciones de alta susceptibilidad a MM (mutaciones en *CDKN2A*, *CDK4*, *BAP-1*, *POT-1*) o mutaciones en genes implicados en las vías de reparación (*xeroderma pigmentosum*), así como pacientes portadores de mutaciones o polimorfismos en genes de mediana susceptibilidad (*MC1R*, *MITF*) que por sí solos o asociados a otros factores de riesgo pueden ser los responsables de un incremento sustancial de riesgo. En este grupo de pacientes de alto riesgo van a ser fundamentales las medidas de prevención.

4.2- ¿Es necesaria la Prevención?

Desde la declaración del Profesor Ackerman en 1985 (75) “*Nadie debería morir ya de melanoma*”, han pasado 30 años y el MM continúa suponiendo más del 80% de las muertes por cáncer cutáneo. Ante la evidente ola creciente de nuevos diagnósticos y a pesar de una mejora en su diagnóstico y tratamiento, la mortalidad por MM no desciende, a diferencia de la mortalidad global por cáncer que tiene una tendencia mundial al descenso, aproximadamente un 1.5% al año(76).

El número de muertes por MM se ha incrementado en la mayoría de las poblaciones caucásicas en las últimas décadas, aunque en menor medida que la tasa de incidencia. Se debe tener presente, que hasta 1 de cada 10 casos de MM incipiente morirá a causa del MM a largo plazo, y puesto que actualmente no podemos predecir qué MM delgados metastatizarán, la conducta correcta es la extirpación de estos tumores de forma precoz. No debemos olvidar, que el MM avanzado o diseminado, a pesar del avance en el conocimiento molecular que ha posibilitado el desarrollo de nuevas terapias diana y una prometedora revolución terapéutica los últimos años(77)(78)(79), continúa teniendo un pronóstico infausto, con supervivencias medias de 6-12 meses. De hecho, debido a la edad de incidencia en población joven y el porcentaje de muertes que implica, se considera la segunda causa de años de vida potencialmente perdidos y de pérdida de años productivos. Se estima que por cada muerte por MM se pierden 15 años potenciales de vida productiva, lo que alcanza un gasto sanitario anual en EEUU de hasta 40 millones de dólares en morbilidad y de más de 3000 millones de dólares por mortalidad prematura(80)(81). Sin embargo, a partir de los años 90 en algunos países se ha detectado una tendencia a la estabilidad o disminución de la mortalidad por MM, atribuible al diagnóstico precoz, y por ello el descenso de mortalidad se espera que evolucione de forma paralela a la disminución del Breslow. Por tanto, no hay duda que la prevención es posible y necesaria.

4.3- Prevención primaria del MM en pacientes de alto riesgo. Fotoprotección

Es conocida la necesidad de una prevención primaria más efectiva frente al MM, ya que continúa aumentando su incidencia y mortalidad(1).

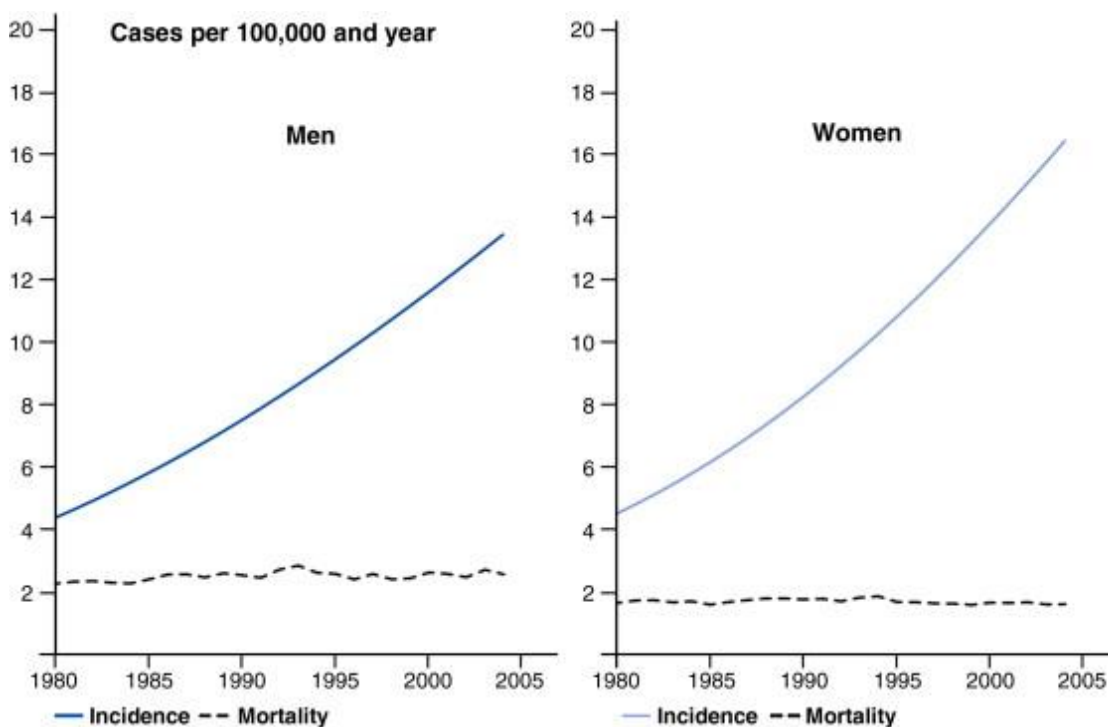


Figura 2: Estandarización por edad (población europea estándar). Tasas de incidencia y mortalidad en la República Federal Alemana durante 25 años.

La exposición a la RUV es el único factor de riesgo establecido modificable (82). La protección solar es una medida efectiva de prevención primaria frente al MM. Green y colaboradores demostraron en 1999 (83) que la correcta fotoprotección previene el cáncer cutáneo en Australia. Sin embargo hasta 10 años más tarde no pudieron demostrar que también previene la incidencia de MM, e incluso mejora el pronóstico, puesto que el Breslow medio de los MM en el grupo protegido era menor(84).

Niveles de actuación en fotoprotección

- Evitar/limitar horas de exposición solar y horarios de máxima irradiación. Información adecuada de las condiciones meteorológicas y geográficas que afectan al índice de RUV (UVI).
- Uso de barreras físicas como ropa y sombrero adecuados y gafas con cristal de protección de amplio espectro.
- Fotoprotectores tópicos: correcta información sobre cuál, cómo y cuándo se han de aplicar y renovar.
- Fotoprotección sistémica y fotoquimioprofilaxis secundaria; productos tópicos o sistémicos que pueden favorecer la protección y/o reparación del fotodaño.

4.3.1- Fotoprotectores tópicos

Los fotoprotectores solares (FPS) están compuestos por moléculas que, gracias a sus características físicas y/o químicas, evitan el eritema y quemadura inducidos por RUV, mediante mecanismos de reflexión, refracción, absorción, y/o transformación de la energía que llega a la superficie cutánea en forma de fotones.

Un FPS ha de cumplir unos requisitos de seguridad y fotoestabilidad. El ideal debería absorber la RUV en su amplio espectro desde UVB a UVA, ser estable a pesar de recibir la energía de la RUV; no provocar reacciones de fototoxia o fotoalergia, ni ser mutagénico, no debe absorberse, y de forma idónea, debería evitar la formación de radicales libres de oxígeno.

CLASIFICACIÓN DE MOLÉCULAS USADAS EN FPS

- **Químicos/Orgánicos:** moléculas con capacidad de absorber y reflejar fotones, transformar su estructura química y convertir la energía en calor. Los más habituales y aprobados por la FDA y la Unión Europea incluyen:

Principalmente UVB:

- Cinamatos (Parsol MCX)
- Salicilatos
- Octocrileno
- Benzofenonas (oxybenzonas)

Principalmente UVA:

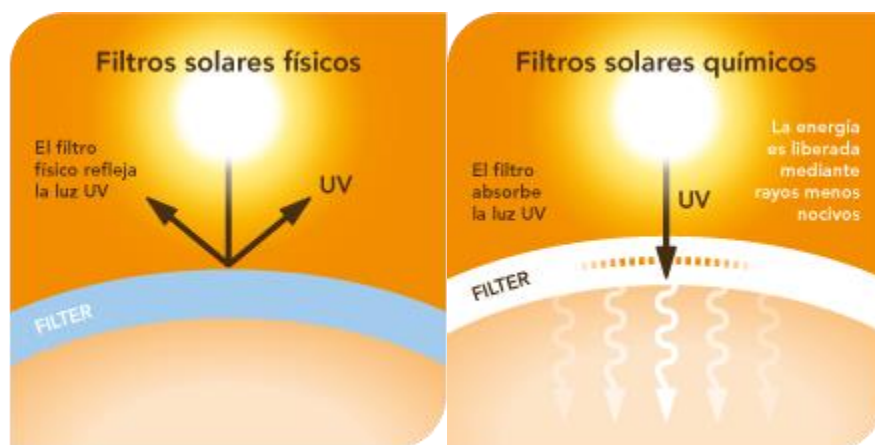
- Avobenzona (Parsol 1789)
- Ácido sulfónico de tereftalidenodialcanfor (Maxoryl®SX)

Amplio espectro:

- Drometizol trisloxano (Mexoryl®XL)
- Tinosorb M o S

- **Físicos/Inorgánicos:** partículas minerales de mayor tamaño, con capacidad de dispersar, reflejar y absorber la energía fotónica incidente. Permiten evitar prácticamente toda la franja de RUV, y también la luz visible y la infraroja. Básicamente se usan el óxido de zinc y el dióxido de titanio micronizados.

Habitualmente, la mayoría de productos comercializados combinan ambos tipos de moléculas, generalmente los químicos son más cosméticos y fáciles de aplicar, pero los físicos son más seguros en cuanto a al amplio espectro de cobertura.



ÍNDICE DE PROTECCIÓN SOLAR

Desde COLIPA (Federación Europea de Cosmetics, Toiletry and other Perfumery products Association) se consensuó en 2006 que toda la industria farmacosmética debía estandarizar los métodos de medición de capacidad de absorción de la RUV. En la Unión Europea los FPS son considerados productos cosméticos, y para testar su efectividad tanto *in vivo* como *in vitro*, se utilizan las medidas de SPF (sun protection factor), el factor de protección frente a UVA (PF-UVA), el ratio entre uno y otro (SPF/PF-UVA) y la longitud de onda crítica.

El SPF es un índice que indica el incremento de tiempo en aparición de eritema sin protección frente al tiempo con protección, es decir mide una proporción del incremento de tiempo que en condiciones ideales de cantidad y homogeneidad en la aplicación de la crema se podría exponer la piel sin aparición de quemadura solar.

CONDICIONES REALES DE LA FOTOPROTECCIÓN TÓPICA

Algunos estudios demuestran que las cremas de protección solar no se aplican según las recomendaciones de la FDA ($2\text{mg}/\text{cm}^2$) sino en menor cantidad, y además, existen factores externos como el nadar en el agua, el sudor, la actividad física, el contacto con la arena de la playa o con la ropa, pueden reducir la cantidad de

fotoprotector y por tanto, el efecto. Estos estudios evidencian que incluso en pacientes con fotodermatosis (teóricamente motivados para la aplicación de fotoprotector) la cantidad media aplicada de fotoprotector es de $0.5\text{mg}/\text{cm}^2$ (85). Otros factores de error con la aplicación de cremas fotoprotectoras es la no aplicación en algunas áreas de difícil acceso o la exposición a RUV antes de la aplicación del producto.

Parece pues que en personas con un alto riesgo a desarrollar MM hay que implementar factores de protección adicionales para reforzar las estrategias de prevención primaria. La medida más usada como protección solar es el uso de cremas fotoprotectoras, y por todo lo citado anteriormente, un agente fotoprotector sistémico tendría una ventaja sobre los fotoprotectores tópicos, ya que proveería una fotoprotección total y uniforme sin la variabilidad en la fotoprotección obtenida con las cremas fotoprotectoras.

4.3.2-Fotoprotección sistémica

La exposición de la piel a la RUVA y RUVB proveniente del sol provoca efectos indeseados en la piel como quemadura solar, inmunosupresión, cambios pigmentarios, fotoenvejecimiento y cáncer de piel(11). El mecanismo de inducción de todos estos cambios cutáneos es complejo, pero se puede dividir en daño directo independiente de oxígeno causado por la absorción de fotones, y en daño oxidativo, causado por la formación de radicales libres y especies reactivas de oxígeno. Por este motivo varios estudios han intentado identificar propiedades fotoprotectoras en los antioxidantes sistémicos. Pero los antioxidantes como el tocoferol, el ascorbato o los carotenoides han demostrado efectos variables, así algunos estudios muestran un incremento de mínimo a moderado en la dosis eritematogénica mínima (DEM) en humanos(86)(87)(88)(89), mientras que otros estudios no han demostrado un incremento en la DEM (90), una disminución del número de *sunburn cells*, o

protección frente al daño generado en el ADN(91). El extracto oral de *Polypodium Leucotomos* ha demostrado también ser efectivo como agente fotoprotector sistémico en humanos al provocar un incremento significativo de la DEM y una disminución del número de *sunburn cells* y del daño producido en el ADN(92). Los polifenoles contenidos en el te verde ingeridos vía oral han demostrado efectos fotoprotectores mediante incremento de la DEM en humanos(93), y en estudios *in vitro* y en animales han demostrado , cuando se aplican tópicamente, un incremento de la DEM y una disminución del daño producido en el ADN (94). Todas estas medidas que han demostrado su eficacia en la protección frente a los efectos nocivos de la RUV, van a ser fundamentales para la prevención primaria del MM en toda la población, pero aún más en pacientes de alto riesgo (portadores de mutaciones en genes de susceptibilidad, genes implicados en la reparación del ADN), en los que será fundamental no añadir más riesgo al que ya tienen estos pacientes.

4.4- Prevención secundaria del MM en pacientes de alto riesgo.

El término detección precoz de la enfermedad significa detectar una enfermedad en una fase anterior a la que suele detectarse en la práctica clínica habitual. La finalidad básica de la prevención secundaria a través del cribado es la disminución de la incidencia de complicaciones derivadas de una determinada patología. En el caso del MM la prevención secundaria va destinada al diagnóstico precoz del tumor para disminuir la morbilidad y mortalidad derivadas de tumores de mayor índice de Breslow al diagnóstico (**Figura 3**).

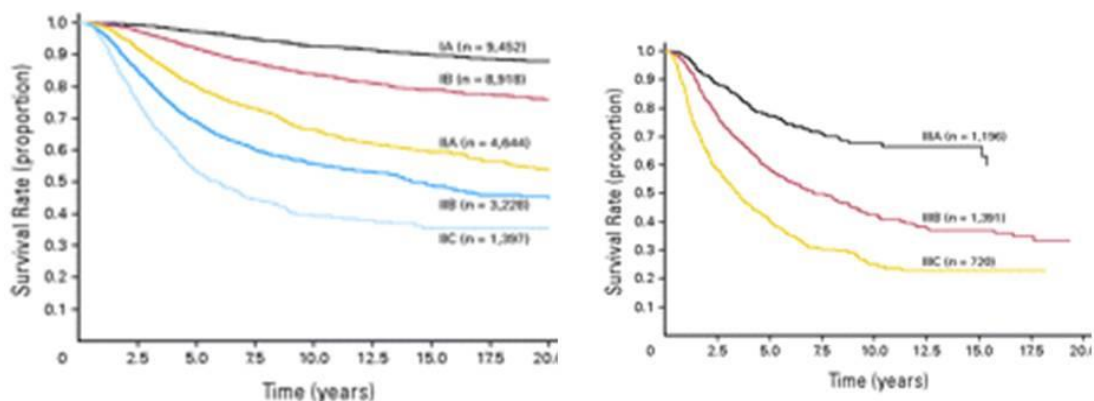


Figura 3: Curvas de Supervivencia global de MM estadio I-II y estadio III según la JCO 2009.

Es preciso identificar a los pacientes de alto riesgo y muy alto riesgo (95) y realizar un seguimiento periódico. Este grupo de pacientes estaría representado por los pacientes con defectos en las vías de reparación del ADN, inmunodeprimidos, pacientes con múltiples nevus y con nevus clínicamente atípicos, con historia familiar de MM y pacientes portadores de mutaciones de riesgo en genes de susceptibilidad a MM(95). Se han sugerido varias estrategias para la detección precoz del MM en pacientes de alto riesgo como la autoexploración cutánea(96), exploración cutánea completa y exploración dermatoscópica con mapas corporales totales(97). Está ampliamente demostrado que la autoexploración cutánea es insuficiente para el diagnóstico de MM incipiente (98)mientras que la dermatoscopia ha demostrado incrementar la precisión diagnóstica en la mayoría de tumores cutáneos, incluyendo el MM (99)(100). El seguimiento con el método de los dos pasos (mapas corporales totales y dermatoscopia digital) de una población seleccionada de pacientes de alto riesgo a MM ha demostrado ser capaz de detectar MM en estadios precoces con una baja tasa de exéresis(97).

Aunque estas estrategias de detección precoz deben continuar, los clínicos debemos tener en mente que los MM delgados contribuyen sustancialmente a la mortalidad global por MM, a pesar de su pronóstico favorable(101)(102). Los futuros estudios

Susceptibilidad a Melanoma: nuevos aspectos clínico-patológicos, desarrollo de herramientas y modelos de estudio y evaluación de medidas preventivas

deberían dirigirse a la identificación de características clínicas, histológicas y moleculares de los MM delgados que les confieran un peor pronóstico.

HIPÓTESIS

- 1- La presentación clínica e histológica de los pacientes con MM familiar y portadores de mutación en *CDKN2A* difiere de la presentación en la población general. Los melanomas de pacientes con melanoma familiar tienen mejor pronóstico.
- 2- Ciertas características clínicas, histológicas y moleculares permiten identificar subtipos de Melanomas de peor pronóstico, útil especialmente en melanoma delgados.
- 3- La identificación de individuos de alto riesgo a desarrollar MM permite dirigir estrategias de prevención hacia estos individuos de riesgo elevado. La ingesta de extracto de *Polypodium Leucotomos* evita el daño inducido por la RUV en estos pacientes.
- 4- Métodos como la dermatoscopia *ex vivo* permiten una correcta selección de muestras biológicas del tumor para poder realizar dichos estudios moleculares.
- 5- Existe un modelo de carcinogénesis del cáncer cutáneo y un modelo de génesis de melanoma. La presencia de mutaciones germinales en genes de susceptibilidad a Melanoma podría modificar / favorecer este modelo de carcinogénesis.

OBJETIVOS

- 1- Desarrollar un nuevo método de muestreo tumoral de melanoma mediante dermatoscopia *ex vivo* que permita una mejor obtención de muestras para el estudio molecular del tumor.
- 2- Identificar características propias de los pacientes afectos de melanoma en contexto familiar, mediante la caracterización clínica, histológica e inmunohistoquímica de una serie de pacientes con melanoma familiar.
- 3- Testar la eficacia de la fotoprotección sistémica en diferentes tipos de pacientes de alto riesgo a melanoma mediante un extracto oral de *Polypodium Leucotomos* (portadores de mutaciones en genes de alta susceptibilidad y pacientes con síndrome de nevus displásico).
- 4- Desarrollar un modelo murino *in vivo* ortotópico humanizado de melanoma familiar que permita reproducir y estudiar la relación de los principales genes implicados en melanoma y respuesta a la RUV.

MATERIAL Y MÉTODOS

RESULTADOS

PUBLICACIONES

TRABAJO I

Ex Vivo Dermoscopy for Biobank-Oriented Sampling of Melanoma

Joseph Malvehy, Paula Aguilera, Cristina Carrera, Gabriel Salerni, Louise Lovatto, Alon Scope, Ashfaq A. Marghoob, Josep Palou, Llúcia Alós, Susana Puig.

JAMA Dermatol. 2013;149(9):1060-1067

Factor de Impacto: 4.3

Objetivo

Descripción de un método basado en el uso de la dermatoscopia *ex vivo* para la correcta toma de muestras de melanoma en fresco que permita preservar las áreas tumorales claves para el diagnóstico histopatológico.

Metodología

Estudio prospectivo para la validación de la dermatoscopia *ex vivo* como técnica para el correcto muestreo tumoral. Se incluyeron tumores clínicamente sospechosos de MM de los que se tomaron muestras guiadas por dermatoscopia mediante punch de 3mm. Se tomaron imágenes de dermatoscopia *in vivo* y *ex vivo*.

Resultados

En el primer estudio las muestras obtenidas se procesaron para su estudio histopatológico y se realizó la comparación del índice de Breslow de dichas muestras con el Breslow del tumor restante. El área de máximo Breslow fue preservada en los

10 tumores estudiados, permaneciendo disponible para el correcto diagnóstico histopatológico.

En el segundo estudio se incluyeron 43 melanomas de los que se tomaron muestras para el biobanco de forma prospectiva. Dos observadores independientes evaluaron las imágenes dermatoscópicas *in vivo* y *ex vivo* de cada tumor y la concordancia en establecer el área más profunda del tumor fue del 93%. Asimismo hubo una alta concordancia ($\kappa > 0.8$) en la categorización del patrón dermatoscópico global, estructuras dermatoscópicas y colores, entre las imágenes de dermatoscopia *in vivo* y *ex vivo*. La correlación fue baja ($\kappa < 0.2$) para la identificación de vasos atípicos y colores rosado o rojo.

Original Investigation

Ex Vivo Dermoscopy for Biobank-Oriented Sampling of Melanoma

Joseph Malveyh, MD; Paula Aguilera, MD; Cristina Carrera, MD; Gabriel Salerni, MD, PhD; Louise Lovatto, MD; Alon Scope, MD; Ashfaq A. Marghoob, MD; Josep Palou, MD; Lúcia Alós, MD; Susana Puig, MD

IMPORTANCE In the era of targeted therapy for cancer, translational research identifying molecular targets in melanoma offers novel opportunities for potential new treatments.

OBJECTIVES To describe a method for sampling fresh tissue from primary melanoma and to test whether the area of maximal thickness can be identified with dermoscopy to ensure it remains available for routine histopathological diagnosis.

DESIGN, SETTING, AND PARTICIPANTS Tumors clinically suspicious for melanoma with diameter exceeding 5 mm were included. Dermoscopy-guided sampling was performed using a 2-mm to 3-mm punch through not the thickest part of the tumor. In vivo and ex vivo dermoscopic images obtained were available to the diagnosing pathologist. Melanoma samples were obtained in a referral melanoma unit.

MAIN OUTCOMES AND MEASURES In study 1, Breslow thickness in 10 melanomas was compared between sampled tissue and the remaining specimen to confirm that the area of maximal thickness remained available for the histopathological diagnosis. In study 2, forty-three additional melanomas were sampled for biobanking prospectively. Agreement between 2 independent observers on dermoscopic identification of the thickest part of the melanoma was studied.

RESULTS In study 1, the area of maximal Breslow thickness in all 10 melanomas was not sampled and remained in the main specimen. In study 2, sampling was performed by one of the investigators. Concordance was 93% between 2 independent observers for the dermoscopic selection of the thickest portion of the melanoma. Pathologists asserted that the sampling procedure did not compromise their ability to evaluate melanoma specimens. A limitation is that this is a single-center study. Each case required joint evaluation by expert dermoscopists and dermatopathologists.

CONCLUSIONS AND RELEVANCE In applying the dermoscopy-guided sampling protocol, we make the following 5 recommendations: Samples should only be obtained from areas that will not interfere with the pathologist's diagnosis and prognostic information. Sampling should not be obtained from tumors for which one suspects that the histopathological evaluation may prove difficult. Sampling should not be performed on small melanomas; we recommend a minimum diameter of 10 mm. All the dermoscopy-guided sampling should be documented with images, available to pathologists and clinicians, and reflected in the pathology report. Finally, the frozen biobank samples should be made available for routine hematoxylin-eosin histopathological evaluation until the final pathology report is produced. Ex vivo dermoscopy may serve to guide the procurement of small samples from primary melanoma for fresh tissue biobanking without compromising the histopathological evaluation.

JAMA Dermatol. 2013;149(9):1060-1067. doi:10.1001/jamadermatol.2013.4724
Published online July 17, 2013.

← Editorial page 1023

+ CME Quiz at
jamanetworkcme.com and
CME Questions page 1123

Author Affiliations: Author affiliations are listed at the end of this article.

Corresponding Author: Susana Puig, MD, Melanoma Unit, Department of Dermatology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Calle Villarreal 170, 08036 Barcelona, Spain (spuig@clinic.ub.es).

In the era of targeted therapy for cancer, translational research identifying molecular targets in melanoma offers novel opportunities for potential new treatments. There is increasing evidence at the molecular level that melanoma is composed of distinct mutational subsets,¹ each harboring different potential targets for therapy.² Fresh or frozen tissue is required for the performance of cellular studies (including tissue cultures from primary tumors) and molecular studies (including genomics and proteomics) and for the design and production of biologic treatments. The aforementioned studies cannot be adequately conducted on formalin-fixed, paraffin-embedded samples.^{3,4} Needless to say, the development of fresh-frozen tissue banks procured from primary melanomas will likely lead to heightened translational research and may greatly influence diagnosis, prognosis, and therapeutic strategies in the coming years.

Histopathological study of formalin-fixed, paraffin-embedded specimens is crucial for the diagnosis and staging of melanoma.^{4,5} The risk in randomly procuring samples from freshly excised melanoma specimens for biobanking is that the remaining specimen, which is submitted for formalin-fixed, paraffin-embedded examination, could sustain damage that would preclude adequate histopathological processing. In addition, the random removal of tissue may compromise the ability of the pathologist to evaluate and adequately diagnose the remaining specimen on routine histopathological examination, with untoward clinical and medicolegal consequences.^{6,7} In a previous study,⁸ researchers evaluated a method for the procurement of fresh tissue from excisional specimens of melanocytic nevi based on examination with the naked eye; they concluded that the procurement of fresh tissue for research had no influence on the final diagnosis. A method has been described for the use of ex vivo dermoscopy for gross pathological evaluation in the histopathology laboratory.⁹ Subsequently, ex vivo dermoscopy was used in 517 cutaneous biopsy specimens,¹⁰ determining that it provides useful ancillary information for the histopathological diagnosis of melanocytic neoplasms. Indeed, dermoscopy can be useful for guiding tissue sectioning for the histopathological correlates,¹¹⁻¹⁸ and certain dermoscopic structures can be used to predict melanoma thickness.^{19,20}

Given the added value of dermoscopy for performing gross pathological evaluation of melanocytic neoplasms and for predicting microscopic findings on the histopathological examination, we reasoned that dermoscopy can be used to select areas within excisional specimens that could be safely removed for molecular studies without compromising the histopathological evaluation of the specimen. This idea prompted us to explore the use of dermoscopy as an ancillary method for guiding and precisely documenting the procurement of fresh tissue from primary melanoma excisional specimens for molecular research.

Methods

The protocol of ex vivo dermoscopy-oriented sampling of melanoma (DOS-M) was approved by the institutional review board

at the Hospital Clinic, Barcelona, Spain. The study setting was an outpatient clinic specializing in melanoma diagnosis and treatment in a tertiary medical center. Within this framework, inclusion criteria for the study were the following: (1) a lesion for which the most likely diagnosis, based on clinical and dermoscopic criteria, was primary cutaneous melanoma; (2) the clinically measured diameter of the lesion exceeded 5 mm in greatest length and width; and (3) informed consent was given by the patient. Exclusion criteria were the following: (1) a lesion for which it was anticipated that the histopathological evaluation may prove problematic or difficult (eg, dermoscopic criteria suggestive of a spitzoid neoplasm) and (2) patients younger than 18 years.

DOS-M Protocol Overview

The entire protocol described below is also depicted via a series of images from a melanoma (Figure). Six components of the study protocol include the following:

First, all eligible lesions were evaluated with dermoscopy before surgery (in vivo dermoscopy). Areas of interest for sampling within the lesions were identified.

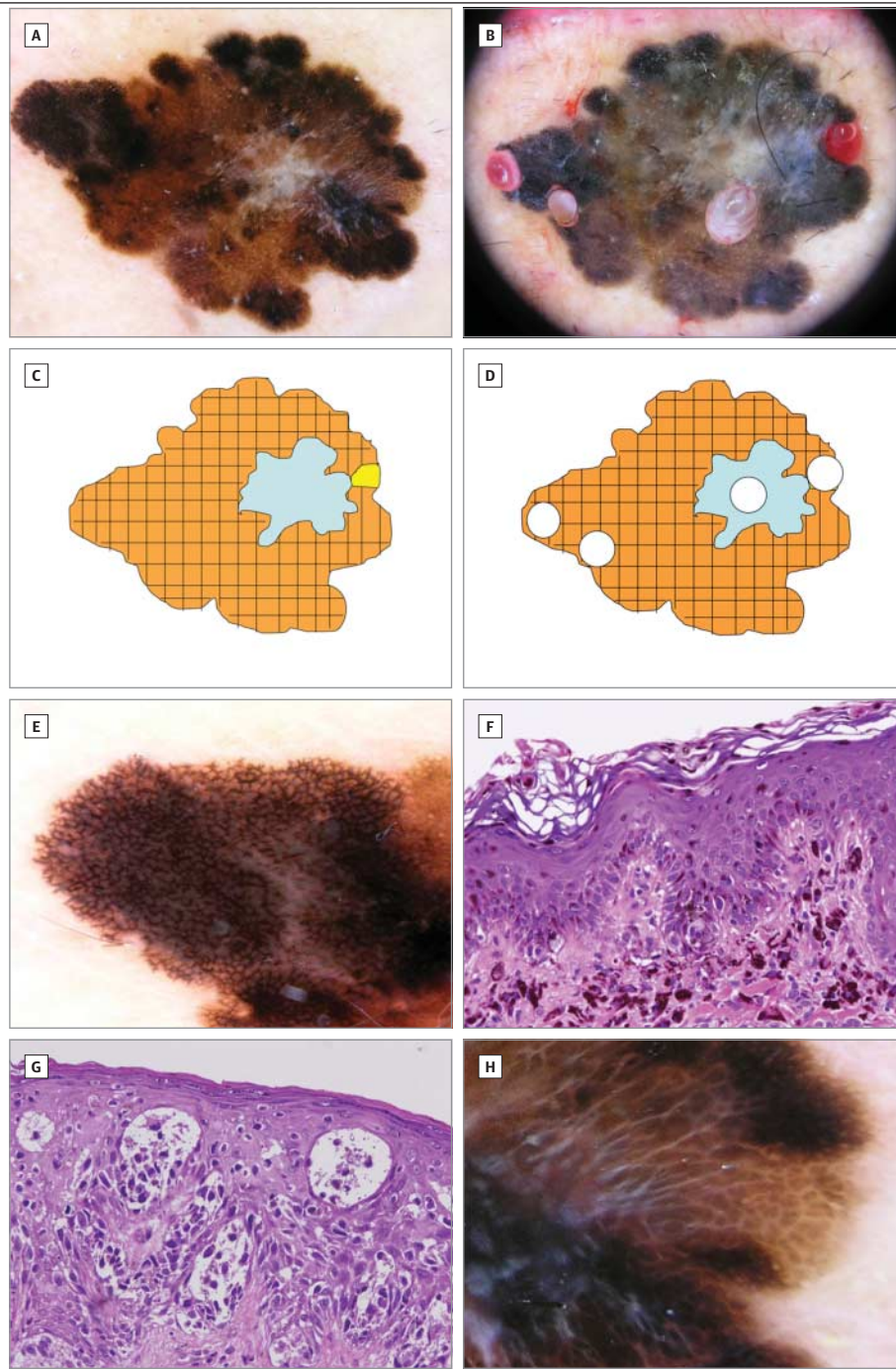
Second, lesions were surgically excised with narrow margins. These were 2 mm or 5 mm, according to routine practice.

Third, dermoscopy was used on the freshly excised specimen (ex vivo dermoscopy) to identify the previously identified (in vivo) areas of interest for sampling. Tissue samples were incised from within the excisional specimen using a 2-mm to 3-mm punch (Figure) according to the size of the tumor; a 3-mm punch was used when the diameter exceeded 20 mm. Areas anticipated as being the thickest portion of the lesion (see the evaluation of melanoma thickness below under the Study 1 and Study 2 subheadings) were not sampled by incision but were preserved for the assessment of Breslow thickness during the histopathological analysis. For example, if a nodule was identified within the melanoma, only the peripheral part of the nodule was incised for fresh tissue sampling, while the center of the nodule, predicted to be the thickest part, was preserved for the histopathological analysis. Incisional sampling was also not obtained from areas showing dermoscopically equivocal findings that precluded the prediction of thickness.

Fourth, the excisional specimen was submitted for routine pathology laboratory processing. Excised tissue specimens underwent routine formalin fixation and paraffin embedding; vertical sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E). The final histopathological diagnosis was based on the evaluation of slides obtained from step-sectioning of the remaining excisional specimens. All histopathological slides were evaluated by at least 2 pathologists (J.P. and L.A.) and analyzed for mitoses, Clark level, Breslow thickness, neural invasion, lymphatic invasion, type of inflammatory infiltrate, growth phase (radial vs vertical), and the presence of ulceration, regression, and microsatellites.

Fifth, incised tissue samples were embedded in formalin in study 1 (comparison of Breslow thickness between incised samples and the remaining specimen). Alternatively, they were cryopreserved at -80°C for biobanking in study 2 (dermoscopic agreement study).

Figure. Superficial Spreading Melanoma (Breslow Thickness of 0.60 mm and Clark Level II) 18.9 mm in Maximal Diameter



A, In vivo dermoscopy (original magnification $\times 10$). B, Ex vivo dermoscopic image of 4 dermoscopy-guided samples (2-mm punch), 2 of them for the histopathological correlation (the one on the left corresponds to dermoscopy in E and histological findings in F, and the one on the right corresponds to dermoscopy in H and histological findings in G). The 2 punch biopsies in the center were frozen and placed in the tissue bank. C, Dermoscopic mapping of the melanoma. D, Location of tissue sampling from within the melanoma. E, Ex vivo dermoscopic image with an atypical pigmented network with thick dark lines and a blue hue. F, Correlates on histopathological examination with a junctional proliferation of atypical melanocytes as solitary units and small nests and with the presence of melanophages in the superficial dermis (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 100$). G, Histopathological correlation of the area in H reveals nests of atypical melanocytes in the epidermis and along the dermoepidermal junction (hematoxylin-eosin, original magnification $\times 100$). H, Ex vivo dermoscopic image of an area that exhibits brown globules with a negative network.

Sixth, all cases were discussed during a clinicopathological conference (CPC), in the presence of the dermatologists and pathologists (J.P. and L.A.) involved in the study, to determine whether incisional sampling of the melanoma could adversely influence the diagnosis and staging of the melanomas. The frozen samples of the melanomas were not processed for molecular studies until after the participants of the CPC had reached a consensus decision that H&E histopathological analy-

sis of the frozen samples was unlikely to change the diagnosis or staging of the melanoma.

Imaging of Lesions and Documentation of Sampling

We obtained clinical and contact polarized dermoscopic images of all primary melanomas included in the study to precisely document sampling of tissue from within the lesions (Figure). Images of the melanomas were acquired in the fol-

lowing sequence: (1) before surgical excision (clinical and in vivo dermoscopic images), (2) immediately after surgical excision (ex vivo dermoscopic images), and (3) after obtaining incisional punch samples from within the excised melanoma specimen (ex vivo dermoscopic images). All ex vivo images were acquired before formalin fixation of specimens.

Images were obtained with a camera (PowerShot G7; Canon Inc or CoolPix 4500; Nikon Inc). All in vivo dermoscopic images were captured using the same cameras attached to a polarized contact dermoscopic lens (DermLite Foto; 3GEN, LLC). During ex vivo contact dermoscopic photography, the excised specimen was covered with a sterile plastic wrap (transparent wrap used for instrumental or dressing sterilization) to avoid contamination of the lens. As described by Zampino and coworkers,^{21,22} we affirm that obtaining the dermoscopic images through a plastic wrap does not alter image quality.

In addition to the clinical and dermoscopic images, a schematic drawing of the lesion was generated before formalin fixation (Figure) to annotate the sites of tissue sampling within the excised melanoma specimen. Annotation included a description of the clinical findings (colors, ulceration, and mapping of flat areas or papules or nodules) and the dermoscopic features (specifically, ulceration, blue-white veil, and atypical vessels).

All clinical and dermoscopic images and schematic drawings were sent to the pathology laboratory together with the formalin-fixed specimens. Special attention was given to the identification and annotation of areas within the melanoma that were predicted to have the greatest Breslow thickness in the histopathological analysis; these areas were clearly marked in the in vivo dermoscopic image and in the schematic drawing of the melanoma to guide the gross pathological examination in the pathology laboratory (Figure).

Study 1 (Comparison of Breslow Thickness Between Incised Samples and the Remaining Specimen)

As a proof of principle, study 1 tested the notion that the thickest portion of the melanoma can be preserved for the histopathological examination based on gross (clinical and dermoscopic) assessment before the procurement. In a subset of 10 melanomas, the incisional punch samples were not cryopreserved for biobanking but rather were submitted for routine histopathological analysis with the remaining excisional specimen. The Breslow thickness of the incisional punch samples was compared with the maximal Breslow thickness measurement of the remaining excisional specimen.

Study 2 (Dermoscopic Agreement Study)

Study 2 determined agreement between 2 independent observers on dermoscopic identification of the thickest part of the melanoma. This study was performed on 43 additional melanomas.

Agreement on Dermoscopic Identification of the Thickest Portion of the Melanoma

The prediction of the thickest portion was based on gross evaluation (clinical and dermoscopic) of the melanoma using criteria previously defined by Argenziano et al.¹⁹ According to this method, the thickest parts of the mel-

noma correlate clinically and dermoscopically. Clinically, the thickest parts correlate with (1) nodular parts of the tumor and (2) areas of ulceration. Dermoscopically, the thickest parts correlate with (1) gray-blue areas, also known as blue-white veil, that correspond to irregular, confluent, gray-blue diffuse pigmentation present focally within the lesion (ie, does not occupy the entire surface area of the lesion) and (2) areas showing an atypical vascular pattern, particularly in hypomelanotic melanomas.

To test the reproducibility of the prediction of the thickest portion of melanoma, an interobserver agreement study was performed. Specifically, in vivo and ex vivo images of 43 melanomas were mapped using a digital grid constructed for the study, which divided the melanoma into numbered blocks. These images were evaluated by 2 independent observers (G.S. and L.L.), who were asked to select the block most likely to contain the thickest part of the melanoma.

Concordance of Dermoscopic Features Between In Vivo and Ex Vivo Images

Implementation of the DOS-M protocol is contingent on good bedside (in vivo) to bench (ex vivo) concordance on the identification of the morphological attributes of the melanoma. To test this concordance, we performed an interobserver agreement study between dermoscopic features identified in vivo and ex vivo. The 2 sets of dermoscopic images were separately analyzed for global dermoscopic pattern, the distribution of dermoscopic structures (asymmetry), the presence of colors (light brown, dark brown, black, blue-gray, white, pink, and red), and the presence of dermoscopic structures (blue-white veil, atypical vessels, regression structures, atypical pigment network, atypical dots and globules, streaks or atypical streaks, and blotches or atypical blotches).

Statistical Analysis

Descriptive statistics were used to characterize the histopathological attributes of included melanomas. To compare the findings of in vivo and ex vivo dermoscopy in study 2, correlation statistics (Spearman rank correlation coefficient and Pearson product moment correlation R and κ) were calculated. A κ statistic exceeding 0.8 denotes excellent correlation, while a κ statistic of less than 0.2 is considered poor correlation.

Results

Study 1 (Comparison of Breslow Thickness Between Incised Samples and the Remaining Specimen)

Ten consecutive melanomas, diagnosed at the melanoma clinic, were included in study 1 and processed using the DOS-M procedure of dermoscopy-guided tissue sampling (Table 1). The study set comprised 9 invasive melanomas with a mean Breslow thickness of 2.25 mm (range, 0.55-6.00 mm) and 1 in situ melanoma. Of 9 invasive melanomas, 7 were superficial spreading, 1 was acral lentiginous, and 1 was a desmoplastic melanoma arising in a lentigo maligna melanoma. Histopathologically identified ulceration was present in 2 of the melanomas. Two blinded pathologists evaluated both parts of each tu-

Table 1. Comparison of Breslow Thickness Between Incised Samples and the Remaining Main Specimen of Melanomas Included in Study 1

Patient No.	Type of Melanoma	Breslow Thickness, mm	
		Sampling	Main Tumor
1	Superficial spreading	0.50	0.55
2	Superficial spreading	0.30	0.70
3	Superficial spreading	Melanoma in situ	0.72
4	Superficial spreading	Melanoma in situ	Melanoma in situ
5	Superficial spreading	1.60	3.25
6	Acral lentiginous	2.00	6.00
7	Superficial spreading	Melanoma in situ	2.20
8	Superficial spreading	0.20	1.40
9	Superficial spreading	Melanoma in situ	1.00
10	Desmoplastic melanoma in lentigo maligna	Melanoma in situ	4.50

mor. The maximal Breslow thickness was measured and compared between the incised sample and the remaining main tissue specimen for each of 10 melanomas. In all 10 melanomas, the area of maximal Breslow thickness was not sampled and remained in the main tumor specimen.

Study 2 (Dermoscopic Agreement Study)

Forty-three consecutive melanomas were prospectively included in study 2 and processed using the DOS-M procedure (Table 2). The mean clinical diameter of the melanomas (in the smaller dimension) was 16.5 mm (range, 6.0-41.0 mm). In the histopathological analysis, the study set comprised 35 invasive melanomas (81%) with a mean Breslow thickness of 1.49 mm (median, 1.10 mm; range, 0.40-5.40 mm) and 8 in situ melanomas (19%). Histopathologically identified ulceration was present in 4 of 43 melanomas (9%). Of 35 invasive melanomas, 29 (83%) were classified as superficial spreading melanoma, 4 (11%) as nodular melanoma, 1 (3%) as acral lentiginous melanoma, and 1 (3%) as lentigo maligna melanoma.

Agreement on Dermoscopic Identification of the Thickest Portion of the Melanoma

Two independent observers (G.S. and L.L.) retrospectively analyzed the dermoscopic images from each melanoma and selected the sector on the study grid most likely to contain the thickest part of the melanoma. Concordance was 93% on the selection of the sector likely to be the thickest.

Concordance of Dermoscopic Features Between In Vivo and Ex Vivo Images

Dermoscopic attributes were compared between in vivo and ex vivo images of the melanomas (Table 3). There was excellent agreement ($\kappa > 0.8$) on the categorization of global dermoscopic pattern, the distribution of dermoscopic structures (asymmetry), the presence of colors (light brown, dark brown, black, blue-gray, and white), and the presence of dermoscopic structures (streaks, blue-white veil, regression structures, atypical dots and globules, atypical pigment network, and blotches or atypical blotches). Poor correlation ($\kappa < 0.2$) was observed for the presence of atypical vessels and the finding

of pink or red; blood vessels and vascular blush were not observable under ex vivo dermoscopy.

CPC on Sampled Melanomas

All 43 melanomas included in study 2 were jointly analyzed at a CPC to determine whether incisional sampling of the melanoma could adversely influence the diagnosis and staging of the melanomas. Although all frozen incisional samples were readily available from the tissue bank and, if needed, could have been subjected to H&E histopathological assessment, the consensus opinion by participating pathologists and dermatologists was that this was unlikely to change the diagnosis and final staging for any of the melanomas included in study 2.

Discussion

This study introduces the use of dermoscopy for guiding tissue sampling. Dermoscopy can serve as a bridge between clinicians and pathologists because it provides a gross pathological map of the melanoma, available both at the bedside (in vivo) and pathology bench (ex vivo).¹⁰ Indeed, the findings reported herein suggest that dermoscopic evaluation and imaging of tissue can be performed ex vivo, with proficiency comparable to that of in vivo dermoscopy, and that the dermoscopic images can be used to create a tumor map, which in turn can serve as a guide for fresh tissue sampling.

In addition, the present study supports prior observation that dermoscopic criteria for tumor thickness can be applied in a reproducible manner.¹⁸ High concordance was shown between 2 independent observers in the clinical and dermoscopic identification of the thickest area of the melanomas. Furthermore, the area with maximal Breslow thickness of the melanoma was shown to be retained within the excised melanoma specimen under the DOS-M technique. Indeed, in a subset of 10 melanomas, the incised samples were submitted for routine H&E histopathological analysis (rather than being diverted to biobanking) and were shown to be thinner in Breslow thickness than the remaining main excisional specimen. Experience in dermoscopy is required to perform gross thick-

ness evaluation to minimize the risk that sampling will remove portions of the melanoma that are important for the final diagnosis and staging.

For the DOS-M protocol described herein, it is important to precisely document areas sampled by annotating the dermoscopic images and schematics (Figure); these documents should be included in the report sent to the tissue bank registry and to the pathology laboratory registry. This allows clinicians and pathologists to know exactly which parts of the melanoma were sampled and which parts of the melanoma

were available for routine H&E processing. The prepathological sampling of the lesion using the DOS-M method should be reflected in the pathology report. The successful implementation of the DOS-M protocol is contingent on having an interactive and collegial multidisciplinary research team composed of dermatologists, surgeons, pathologists, and biologists. In the present study, while the cryopreserved procured tissues were available for H&E histopathological analysis, our pathologists did not deem it necessary to use them in rendering a final histopathological diagnosis. They reasoned that dermoscopy-guided sampling and availability of precise documentation of the gross pathological examination probably lead to comparable, if not better, sampling of melanoma compared with routine, blinded, mostly random tissue gross pathological examination.

At present, this procedure should be restricted to experienced research centers with a well-defined protocol that will ensure the precise diagnosis and staging of patients. Nevertheless, highly specialized skin pathology providers might embrace similar protocols in the future.

In applying the DOS-M protocol, we note the following 5 points: (1) Samples should only be obtained from areas that will not interfere with the pathologist's ability to render a definitive diagnosis and to provide accurate prognostic information. (2) Sampling should not be obtained from tumors for which one suspects that the histopathological evaluation may prove difficult or for which the evaluation of the entire tumor would be crucial (eg, dermoscopically equivocal lesions, melanoma arising in a nevus, and lesions with extensive regres-

Table 2. Clinical Characteristics of the Melanomas Included in Study 2

Characteristic	Value (n = 43)
Diameter, mm	
Mean (SD)	16.5 (7.0)
Median (range)	15.1 (6.0-41.0)
90% Diameter	>10
Type of melanoma, No./total No. (%)	
Superficial spreading	29/35 (83)
Nodular	4/35 (11)
Acral lentiginous	1/35 (3)
Lentigo maligna	1/35 (3)
In situ	8/43 (19)
Invasive	35/43 (81)
Breslow thickness, mm	
Mean (SD)	1.49 (1.21)
Median (range)	1.10 (0.40-5.40)

Table 3. Correlation of Dermoscopic Colors and Structures Between In Vivo and Ex Vivo Dermoscopic Images

Variable	κ Statistic	Spearman Rank Correlation Coefficient	Pearson Product Moment Correlation <i>R</i>	<i>P</i> Value
No. of colors	Not applicable	0.768	0.845	<.001
Asymmetry	0.837	0.838	0.838	<.001
Light brown	0.838	0.850	0.850	<.001
Dark brown	0.959	0.960	0.960	<.001
Black	0.975	0.975	0.975	<.001
Blue	0.930	0.933	0.933	<.001
Gray	0.909	0.910	0.910	<.001
Red	0.171	0.264	0.264	.01
Pink	0.107	0.237	0.237	.03
White	0.933	0.935	0.935	<.001
Atypical pigment network	0.943	0.943	0.943	<.001
Dots and globules	0.662	0.703	0.703	<.001
Atypical dots and globules	0.883	0.889	0.889	<.001
Regression structures	0.838	0.844	0.844	<.001
Streaks	1 [Reference]	1 [Reference]	1 [Reference]	<.001
Atypical streaks	0.930	0.930	0.930	<.001
Blotches	1 [Reference]	1 [Reference]	1 [Reference]	<.001
Atypical blotches	0.930	0.931	0.931	<.001
Blue-white veil	0.908	0.908	0.908	<.001
Atypical vessels	0.170	0.304	0.304	.004

sion). (3) Sampling should not be performed on small melanomas; we recommend a minimum diameter of 10 mm because sampling from larger melanomas leaves behind sufficient tissue for the histopathological evaluation. (4) A CPC should be held regularly to review the cases together with the clinical images, in vivo and ex vivo dermoscopy images, and the annotated maps. (5) The procured frozen biobank tissue samples for molecular analyses should be made available for routine H&E histopathological evaluation until the final pathology report is produced if deemed necessary by CPC consensus.

Our study has limitations. First, the single-study includes few cases. Second, the determination of Breslow thickness among incisional samples was only performed for a subset of the melanomas. Third, only lesions recognized clinically and dermoscopically as likely melanomas were included. If molecular studies are to be used for the differentiation of melanoma from benign lesions, sampling should probably also include cases with an equivocal diagnosis.

In conclusion, we have developed a technique for dermoscopy-guided sampling of small portions of any given melanoma. This technique is the first step in sampling melanomas for the purpose of biobanking freshly excised tissue for molecular studies. Dermoscopy can be applied ex vivo to freshly excised tissues, with the findings comparable to those of in vivo examination. The thickest portion of the melanoma can be reproducibly identified and documented under the DOS-M protocol, allowing incisional sampling of areas within the melanoma that would not compromise the final histopathological diagnosis and staging. Finally, it is fundamental to restrict this DOS-M procedure to medical centers with an interdisciplinary team composed of clinicians with expertise in dermoscopic evaluation of melanoma and of dermatopathologists with expertise in the evaluation of melanocytic neoplasms. In our experience, such a strategy translates to better communication among dermatopathologists, clinicians, and researchers.

ARTICLE INFORMATION

Published Online: July 17, 2013.

doi:10.1001/jamadermatol.2013.4724.

Author Affiliations: Melanoma Unit, Department of Dermatology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain (Malveyh, Aguilera, Carrera, Salerni, Lovatto, Palou, Puig); Centro de Investigación Biomedica en Red Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain (Malveyh, Puig); Dermatology Service, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, New York (Scope, Marghoob); Department of Dermatology, Sheba Medical Center, and Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel (Scope); Melanoma Unit, Department of Pathology, Hospital Clinic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain (Palou, Alós).

Author Contributions: Drs Malveyh, Aguilera, Lovatto, and Puig had full access to all the data in the study and take responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study concept and design: Malveyh, Puig.

Acquisition of data: Malveyh, Aguilera, Carrera, Salerni, Lovatto, Palou, Alós, Puig.

Analysis and interpretation of data: Malveyh, Salerni, Scope, Marghoob, Palou, Alós, Puig.

Drafting of the manuscript: Malveyh, Aguilera, Puig.
Critical revision of the manuscript for important intellectual content: Malveyh, Salerni, Lovatto, Scope, Marghoob, Palou, Alós.

Statistical analysis: Malveyh, Aguilera, Salerni, Puig.

Obtained funding: Malveyh, Puig.

Administrative, technical, and material support: Malveyh, Lovatto.

Study supervision: Malveyh.

Conflict of Interest Disclosures: None reported.

Funding/Support: The research at the Melanoma Unit is partially funded by grants O3/O019, O5/O302, O6/O265, and O9/O1393 from Fondo de Investigaciones Sanitarias; by the Centro de Investigación Biomedica en Red Enfermedades Raras of the Instituto de Salud Carlos III; by the AGAUR 2009 SGR 1337 of the Catalan Government; by contract LSHC-CT-2006-O18702 (GenoMEL) from the European Commission under the 6th

Framework Programme; and by grant CA83115 from the National Cancer Institute, National Institutes of Health.

Role of the Sponsors: The sponsors had no role in the design or conduct of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; or in the preparation, review, or approval of the manuscript.

Additional Contributions: This work was performed with the participation of the following other members of the Melanoma Unit: Lúcia Alós, MD, Ana Arance, MD, Pedro Arguis, MD, Antonio Campo, MD, Teresa Castel, MD, Carlos Conill, MD, Daniel Gabriel, MD, Pablo Iglesias, MD, Jose Palou, MD, Ramon Rull, MD, Marcelo Sánchez, MD, Sergi Vidal-Sicart, MD, Antonio Vilalta, MD, and Ramon Vilella, MD. Helena Krueyer, PhD, assisted with the English-language editing of the manuscript. We are grateful to all the clinicians who referred the patients to our unit, the fellows involved in the project, and those patients who kindly agreed to allow us to image and sample their tumors and use them for scientific purposes.

REFERENCES

- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med*. 2005;353(20):2135-2147.
- Carlson JA, Ross JS, Slominski A, et al. Molecular diagnostics in melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(5):743-778.
- Florell SR, Coffin CM, Holden JA, et al. Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank protocol. *Mod Pathol*. 2001;14(2):116-128.
- Kunz M, Ibrahim SM, Koczan D, Scheid S, Thiesen HJ, Gross G. DNA microarray technology and its applications in dermatology. *Exp Dermatol*. 2004;13(10):593-606.
- Kornstein MJ, Byrne SP. The medicolegal aspect of error in pathology: a search of jury verdicts and settlements. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(4):615-618.
- Troxel DB. Medicolegal aspects of error in pathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130(5):617-619.
- Dyson SW, Bass J, Pomeranz J, Jaworsky C, Sigel J, Somach S. Impact of thorough block sampling in the histologic evaluation of melanomas. *Arch Dermatol*. 2005;141(6):734-736.
- Florell SR, Smoller BR, Boucher KM, et al. Sampling of melanocytic nevi for research purposes: a prospective, pilot study to determine effect on diagnosis. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59(5):814-821.
- Scope A, Busam KJ, Malveyh J, et al. Ex vivo dermoscopy of melanocytic tumors: time for dermatopathologists to learn dermoscopy. *Arch Dermatol*. 2007;143(12):1548-1552.
- Amin K, Fraga GR. Ex vivo dermoscopy of cutaneous biopsies for melanocytic neoplasms: a retrospective review of 517 cases with histopathologic correlation. *Am J Dermatopathol*. 2012;34(7):710-715.
- Soyer HP, Kenet RO, Wolf IH, Kenet BJ, Cerroni L. Clinicopathological correlation of pigmented skin lesions using dermoscopy. *Eur J Dermatol*. 2000;10(1):22-28.
- Yadav S, Vossaert KA, Kopf AW, Silverman M, Grin-Jorgensen C. Histopathologic correlates of structures seen on dermoscopy (epiluminescence microscopy). *Am J Dermatopathol*. 1993;15(4):297-305.
- Braun RP, Kaya G, Masouyé I, Krischer J, Saurat JH. Histopathologic correlation in dermoscopy: a micropunch technique. *Arch Dermatol*. 2003;139(3):349-351.
- Soyer HP, Smolle J, Hödl S, Pachernegg H, Kerl H. Surface microscopy: a new approach to the diagnosis of cutaneous pigmented tumors. *Am J Dermatopathol*. 1989;11(1):1-10.
- Massi D, De Giorgi V, Soyer HP. Histopathologic correlates of dermoscopic criteria. *Dermatol Clin*. 2001;19(2):259-268; vii.
- Kaya G, Braun RP. Histopathological correlation in dermoscopy. In: Marghoob AA, Braun RP, Kopf AW, eds. *Atlas of Dermoscopy*. New York, NY: Taylor & Francis; 2005:23-41.
- Bauer J, Metzler G, Rassner G, Garbe C, Blum A. Dermoscopy turns histopathologist's attention to

the suspicious area in melanocytic lesions. *Arch Dermatol*. 2001;137(10):1338-1340.

18. Ferrara G, Argenyi Z, Argenziano G, et al. The influence of clinical information in the histopathologic diagnosis of melanocytic skin neoplasms [published correction appears in *PLoS One*. 2009;4(6). doi:10.1371/annotation/512cb17b-934c-4a06-9dbb-114d43052a2b]. *PLoS One*. 2009;4(4):e5375. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2671836/>. Accessed May 25, 2013.

19. Argenziano G, Fabbrocini G, Carli P, De Giorgi V, Delfino M. Clinical and dermatoscopic criteria for the preoperative evaluation of cutaneous melanoma thickness. *J Am Acad Dermatol*. 1999;40(1):61-68.

20. Malvey J, Puig S. Breslow depth prediction by dermoscopy. In: Marghoob AA, Braun RP, Malvey J, Kopf AW, eds. *Atlas of Dermoscopy*. New York, NY: Taylor & Francis; 2006:257-270.

21. Zampino MR, Borghi A, Corazza M, Virgili A. A preliminary evaluation of polyvinyl chloride film use in dermoscopic analysis of mucosal areas. *Arch Dermatol*. 2005;141(8):1044-1045.

22. Zampino MR, Borghi A, Caselli E, et al. Virologic safety of polyvinyl chloride film in dermoscopic analysis of mucosal areas. *Arch Dermatol*. 2007;143(7):945-946.

NOTABLE NOTES

Abigail Adams, Smallpox, and the Spirit of 1776

Walter H. C. Burgdorf, MD; Leonard J. Hoenig, MD

Contemporary portraits of Abigail Adams (1744-1818) show a woman with a genteel, mild-mannered appearance. Behind this calm look, however, was one of America's most colorful and dedicated patriots.

She and her husband, John Adams, were at the heart of the American Revolution. While John Adams served as a Massachusetts delegate to the Continental Congress, Abigail Adams melted down her treasured pewter spoons to make bullets for Minutemen troops.¹ As advisor to her husband, Abigail Adams helped formulate the arguments he used to sway the Continental Congress to adopt the Declaration of Independence on July 2, 1776.

Americans faced another terrible enemy besides British forces: smallpox. During 1776, a deadly epidemic of smallpox gripped the Boston area. Alarmed, the Massachusetts legislature, on July 3, 1776, lifted a ban on variolation, a controversial, risky procedure in which people were inoculated with variola virus taken from skin lesions of smallpox victims. Variolation usually caused a milder, potentially less fatal case of smallpox than did naturally acquired infection and produced immunity.

To protect her children from smallpox, Abigail Adams bravely took her family from Braintree, Massachusetts, to Boston to be inoculated. The physician who performed the inoculation was Dr Thomas Bullfinch, an expert in the Suttonian method of variolation.²

Developed in England, this technique sought to reduce the risks of variolation in several ways: (1) by minimizing lengthy preprocedure emetic regimens, (2) by using a superficial skin incision rather than a deep cut, and (3) through a careful selection of infected material obtained from the skin lesions of inoculated persons rather than from patients with natural smallpox.³ During the 19th century, variolation was replaced by Jennerian vaccination.

On July 12, 1776, Abigail Adams and her 4 children were inoculated in the arm. Abigail Adams and John Quincy, age 9 years and the future sixth American President, had mild skin reactions. Daughter Nabby, age 11 years, developed an extensive smallpox eruption. Charles, age 6 years, and Thomas, age 4 years, required reinoculation having failed to develop any skin reaction. Thomas subsequently had a mild skin reaction, but Charles developed a more extensive eruption. Everyone recovered from the procedure.

On July 18, 1776, Abigail Adams attended, with much pride, the public reading of the Declaration of Independence in Boston. John and Abigail Adams would later serve our country as its second President and First Lady.

The Declaration of Independence was written and signed by men. Yet, this great document also embodies the spirit of many courageous women, such as Abigail Adams, who shared with their husbands the dreams of liberty and the struggle for American freedom. Despite epidemics of disease and hardships of war, these women stood firm in their resolve to give birth to a new nation in which all Americans would enjoy the blessings of life, liberty, and the pursuit of happiness.

Author Affiliations: Retired (Burgdorf); private practice (Hoenig).

Corresponding Author: Leonard J. Hoenig, MD, 601 N Flamingo Rd, Ste 201, Pembroke Pines, FL 33028 (gooddocljh@yahoo.com).

1. Bober NS. *Abigail Adams: Witness to a Revolution*. New York, NY: Atheneum Books for Young Readers; 1995:59.

2. My Dearest Friend. In: Hogan MA, Taylor CJ, eds. *Letters of Abigail and John Adams*. Cambridge, MA: Belknap Press of Harvard University Press; 2007:128-132.

3. Fenn EA. *Pox Americana: The Great Smallpox Epidemic of 1775-1782*. New York, NY: Hill and Wang; 2001:35-36.

TRABAJO II

Clinical and Histopathological Characteristics between Familial and Sporadic Melanoma in Barcelona, Spain

Paula Aguilera, Josep Malvehy, Cristina Carrera, Josep Palou, Joan Anton Puig-Butillé, Lúcia Alós, Celia Badenas, Susana Puig.

J Clin Exp Dermatol Res. 2014;5(5):231 *Factor de Impacto: 1.28*

Objetivo

Caracterizar clínica e histopatológicamente melanomas dentro del grupo de melanoma familiar, con el fin de proveer una mayor información a los clínicos y contribuir al mejor entendimiento de la interrelación genética-ambiente en la patogénesis del MM.

Metodología

Para el estudio se eligieron todos los MM familiares de los que se disponía muestra tumoral en parafina (n=62) y por cada caso de MM familiar se eligieron dos MM esporádicos de los que se disponía muestra en parafina (n=127). Un total de 189 muestras tumorales se evaluaron histológicamente. De los pacientes con MM familiar se realizó el estudio de mutaciones germinales en *CDKN2A* y *CDK4*.

Para la evaluación inmunohistoquímica se construyeron 4 *Tissue Microarrays* (TMAs), seleccionando dos áreas representativas de cada tumor. Se evaluó la positividad para Survivina y AURORA-A.

Resultados

Se encontraron como variables asociadas a MM familiar: una menor edad de debut (44.26 años *versus* 56.87, $p < 0.05$), (OR 1.036; 95% IC 1.017-1.055), un menor índice de Breslow (1.22 vs 2.35mm, $p < 0.05$), (OR 1.288; 95% IC 1.013-1.683) y el diagnóstico de MM *in situ* (35.5% vs 19.7%, $p < 0.05$), (OR 2.645; 95% IC 1.211-5.778). En cuanto al subtipo histológico, el 82.3% de los MM familiares fueron MM de extensión superficial (MMES) *versus* el 61.4% de los MM esporádicos, $p < 0.05$.

Como variables asociadas a tumores de portadores de mutación en *CDKN2A* se encontraron una menor edad de debut (37.51 *versus* 54.19 años, $p < 0.05$), (OR 1.060; 95% IC 1.016-1.105), el diagnóstico de MM *in situ* (58.8% *versus* 21.3%, $p < 0.05$), (OR 6.961, 95% IC 1.895-25.567), la presencia de MM múltiple (64.7% *versus* 16.6%, $p < 0.05$), (OR 8.920, 95% IC 2.399-33.166) y la inmunopositividad citoplasmática para survivina (93.8% *versus* 72.7%, $p = 0.05$), (OR 9.072, 95% IC 1.025-85). En cuanto a otras características histopatológicas, en el análisis univariante se detectó una mayor presencia de células grandes y redondas en los tumores pertenecientes a pacientes con mutación en *CDKN2A* (35.3% *versus* 4,7%, $p < 0.05$) y un menor índice mitótico en estos tumores.



HHS Public Access

Author manuscript

J Clin Exp Dermatol Res. Author manuscript; available in PMC 2015 April 16.

Published in final edited form as:

J Clin Exp Dermatol Res. 2014 September ; 5(5): 231–. doi:10.4172/2155-9554.1000231.

Clinical and Histopathological Characteristics between Familial and Sporadic Melanoma in Barcelona, Spain

Paula Aguilera^{1,*}, Josep Malvehy^{1,2}, Cristina Carrera^{1,2}, Josep Palou¹, Joan Anton Puig-Butillé^{2,3}, Llúcia Alòs⁴, Celia Badenas^{2,3}, and Susana Puig^{1,2}

¹Dermatology Department, Melanoma Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

²CIBER on Rare Diseases, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

³Biochemistry and Molecular Genetics Department, Melanoma Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

⁴Pathology Department, Melanoma Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

Abstract

Background—About 6 to 14% of melanoma cases occur in a familial setting. Germline mutations in *CDKN2A* are detected in 20 to 40% of melanoma families.

Objective—To characterise the clinical and histopathological characteristics of familial melanoma thus providing more information to clinicians and contribute to the understanding of the genetic-environment interplay in the pathogenesis of melanoma.

Methods—Clinical, histological and immunohistochemical characteristics of 62 familial melanomas were compared with 127 sporadic melanomas.

Results—variables associated with familial melanoma were earlier age at diagnosis (OR 1.036; 95% CI 1.017–1.055), lower Breslow thickness (OR 1.288; 95% CI 1.013–1.683) and in situ melanomas (OR 2.645; 95% CI 1.211–5.778). Variables associated with *CDKN2A* mutation carriers were earlier age at diagnosis (OR 1.060; 95% CI 1.016–1.105), in situ melanomas (OR 6.961; 95% CI 1.895–25.567), the presence of multiple melanomas (OR 8.920; 95% CI 2.399–33.166) and the immunopositivity of the tumours for cytoplasmic survivin (OR 9.072; 95% CI 1.025–85.010).

Conclusions—Familial melanoma was significantly associated with the earlier age of onset, lower Breslow thickness and with a higher number of in situ melanomas; and also carriers of *CDKN2A* mutations were associated with a higher risk of multiple melanomas and cytoplasmic survivin immunostaining.

Copyright: © 2014 Aguilera P, et al.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

*Corresponding author: Paula Aguilera, MD, Dermatology Department, Melanoma Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS, Villarroel 170, 08036. Barcelona, Spain, Tel: 696673323; aguilisha@hotmail.com.

Keywords

Melanoma; Familial melanoma; CDKN2A; Genes; p16; Survivin; Histology; Multiple primary

Introduction

Melanoma (MM) is the human malignancy that has undergone the greatest increase in incidence during the last few decades.

Population Studies suggest that approximately 6 to 14% of melanoma cases occur in a familial setting [1]. In Spain, familial Melanoma is considered when there is at least one invasive melanoma and one more case of melanoma and/or pancreatic cancer among first-degree relatives on the same side of the family [2]. In these families two major melanoma susceptibility genes have been identified. The oncogene *CDK4* has been found in a few melanoma families (estimated 2%) [3]. Germline mutations in *CDKN2A* are found in approximately 20 to 40% of melanoma families [4]. Several studies have reported that patients with melanoma and a *CDKN2A* mutation have an earlier age of onset and an increased risk of multiple primary melanomas (MPM) [5–7]. Not only melanomas occurring in mutation carriers but familial melanoma has been demonstrated to share some characteristics in previous studies [8].

Survivin represents a multifunctional protein that suppresses apoptosis and regulates cell division at the G2-M phase. It is a nuclear shuttle protein that is actively exported from the nucleus [9]. Survivin seems to exist in 2 subcellular pools (in the cytoplasm and nuclear). This is consistent with its function in the regulation of both cell viability and cell division. Growing evidence suggests that survivin expression in cancer cell nuclei may represent an important prognostic marker to predict disease outcome. Current reports in this research area are however inconsistent and propose opposing conclusions regarding the significance and prognostic value of survivin nuclear expression [10,11]. Survivin has been recently identified as a metastasis-associated gene for Melanoma [12].

The purpose of this study was to further characterize and expand the knowledge of the clinical and histopathologic characteristics of familial melanoma to provide more information to clinicians and also contribute to the understanding of the complex interplay of genetic and environmental factors in the pathogenesis of melanoma.

Material and Methods

The study was approved by the institutional review board.

All familial melanoma patients from whom the paraffin block of the tumour was available were eligible for the study, and two sporadic melanoma patients from whom the paraffin block was also available were also eligible for the study.

We compiled 189 paraffin blocks and the corresponding slides of 189 MMs (62 familial MMs and 127 sporadic MMs). The following variables were evaluated:

Epidemiological data

Included sex, age, age at diagnosis, histopathological subtype, melanoma site, Breslow thickness, presence of metastases and follow up.

Phenotype data

Included eye and hair colour, phototype and nevi count.

Analysis of Histological Features

All histopathological evaluations were carried out on routinely stained HE sections. Cases were classified as superficial spreading melanoma (SSM), lentigo malignant melanoma (LMM), nodular melanoma (NM), acral lentiginous melanoma (ALM) according to the WHO classification [13]. Breslow thickness and Clark level of invasion were evaluated for each tumour. Based on the work of Viros and coworkers [14], we evaluated the following histological features:

Solar elastosis, type of cells, inflammatory infiltrate, regression, mitotic rate, pagetoid invasion, nest formation, lentiginous hyperplasia and cellular atypia.

Immunohistochemical analysis TMAs

For immunohistochemical evaluation of all the tumours we constructed tissue microarrays (TMAs). We selected a minimum of 2 areas per tumour and a total of 4 TMAs blocks were performed. Each TMA block was cut into four micrometer sections.

Immunohistochemical studies were performed from tissue microarrays with the automated immunohistochemical system TechMate 500[®] (Dako Co, Carpinteria, CA), using the EnVision system (Dako). Briefly, 4 µm sections were deparaffinized and hydrated through graded alcohols and water. Peroxidase was blocked for 7.5 minutes in ChemMate peroxidase-blocking solution (Dako). Then, the slides were incubated with the primary antibodies for 30 minutes and washed in ChemMate buffer solution (Dako). The peroxidaselabelled polymer was then applied for 30 minutes. After washing in ChemMate buffer solution, the slides were incubated with the AEC substrate chromogen solution, washed in water, counterstained with hematoxylin and mounted. The primary antibody used in the study was Survivin (Abcam, Cambridge, UK; 1/500 dilution).

***CDKN2A* mutation analysis**

Blood samples were taken from all patients belonging to the familial MM group. The PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) was used to isolate genomic DNA from lymphocytes according to the manufacturer's instructions.

Promoter (-34G>T variant), intronic (IVS2-105) and coding regions of the *CDKN2A* gene (exons 1α, 2 and 3 of the p16INK4A protein and exon 1β corresponding to p14ARF protein) were amplified by PCR using primers and conditions previously described [15].

Statistical analysis

Descriptive analysis of the sample was performed, including percentages for categorical variables, and mean, minimum, maximum and standard deviation values for continuous variables. Comparisons of continuous variable means were performed using Student's exact t-test when variables followed a normal distribution. Comparisons of discrete variable means were performed using the Mann–Whitney non parametric test. Comparisons between categorical variables were performed with χ^2 tests and Fisher corrections were required. Kaplan Meyer analysis and Cox proportional hazards regression models were used to analyze associations between available variables and overall survival. All variables on univariate analysis were incorporated into a multivariable model. Statistical analyses were performed with SPSS (version 18.0; SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

Descriptive results

We included 189 MMs, 62 (38.8%) belonging to the Familial MM group.

Patients included 88 men (46.6%) and 101 women (53.4%) with a median age of 62.83 year \pm 18.35. In the Familial MM group 17 patients (25.8%) were carriers of a *CDKN2A* mutation and 39 (20.6%) of all patients had multiple MM (MMM). For the analysis, the first tumour from 10 MMM patients (25.6%) was included and successive tumours in 29 patients (74.4%). In the familial patients, 37 (61.7%) were the index case and 23 (38.3%) were not. We included two related patients in the familial group.

The median Breslow thickness was 1.53 mm \pm 3.072 (min 0.2 max 3mm). Taking into account MM histopathological subtype 128 (67.7%) were SSMM, 14 (7.9%) LMM, 35 (18.5%) ALM and 11 (5.8%) NM.

Comparison of familiar and sporadic MMs

Of 189 patients included in the study, 62 (38.8%) had a positive family history of melanoma. Patient characteristics and demographic data are presented in Table 1. Patients in the familial melanoma group had a significantly younger age of melanoma onset (median: 44.26 vs 56.87), $p < 0.05$. Melanomas belonging to the sporadic melanoma group had a significantly higher Breslow thickness (mean: 2.35 vs 1.22), $p < 0.05$. There was a significantly higher number of *in situ* melanomas in the familial group than in the sporadic group (35.5% vs 19.7%), $p < 0.05$ (OR. 1.662, 95% CI 1.111–2.485). We found differences, although not significant, in the median Breslow thickness in the MMM group depending on whether the MM was the first or successive (0.64 mm vs 0.33 mm), $p = 0.065$. Although not significant, successive MM were more frequently of the *in situ* type than first MM in those patients (48.3% vs 20%), $p = 0.152$. We found differences, also not significant, in the median Breslow thickness in the familial group depending on whether the patient was the index case or was not (1.4 mm vs 0.73 mm), $p = 0.713$. Non index cases were more frequently of the *in situ* type than index cases (52.2% vs 25%), $p = 0.033$ (Table 2). Taking into account melanoma site, a significantly higher percentage of melanomas in the lower limbs was found in the familial melanoma group (30.6% vs 13.4%), and no melanoma was found on palms in

this group, $p < 0.05$. Comparing the histological subtype of MM between the two groups we found significant differences among SSMM; we found that 82.3% of the familial melanoma tumours were of SSMM type vs the 61.4% of the sporadic melanomas, $p < 0.05$.

Phenotypic characteristics and histopathological features of tumours are given in Table 3.

Interestingly a higher number of familial tumours had cytoplasmatic positivity (83.9 vs 70.1), $p = 0.05$. Multivariate regression analysis showed that the most representative variables associated with familial melanoma were earlier age at diagnosis (OR 1.036; 95% CI 1.017–1.055), lower Breslow thickness (OR 1.288; 95% CI 1.013–1.683) and *in situ* melanomas (OR 2.645; 95% CI 1.211–5.778) (Table 4).

Comparison of *CDKN2A* mutated and non mutated MMs

We studied p16 mutations and we found that 17 patients were carriers of a *CDKN2A* mutation, all of them belonging to the familial group. Patient characteristics and demographic data are presented in Table 5. Carriers of a *CDKN2A* mutation had a significantly earlier age of melanoma onset (mean: 37.51 vs 54.19 year), $p < 0.05$. Melanomas belonging to non-carriers had a significantly higher Breslow thickness (2.12 vs 0.74), $p < 0.05$. There was a significantly higher number of *in situ* melanomas in the mutation carrier group (58.8% vs 21.3%), $p < 0.05$. As regards melanoma site, we found a higher number of lower limb melanomas (47.1% vs 16.6%), $p < 0.05$. All the tumours in the carrier group were of the SSMM type, $p < 0.05$.

Phenotypic characteristics and histopathological features of tumours are given in Table 6. Tumours of *CDKN2A* mutated patients had significantly more big round cells than tumours of non-carriers (35.3% vs 4.7%), $p < 0.05$ (Figure 1). No differences were observed in the other histopathological characteristics evaluated. No differences were observed in immunopositivity for nuclear survivin between the two groups, but a higher number of tumours from *CDKN2A* mutated patients had cytoplasmatic positivity (93.8 vs 72.7%), $p = 0.052$.

Multivariate regression analysis showed that the most representative variables associated with *CDKN2A* mutation carriers were earlier age at diagnosis (OR 1.060; 95% CI 1.016–1.105), *in situ* melanomas (OR 6.961; 95% CI 1.895–25.567), the presence of multiple melanomas (OR 8.920; 95% CI 2.399–33.166) and immunopositivity of the tumours for cytoplasmic survivin (OR 9.072; 95% CI 1.025–85.010) (Table 7).

Kaplan Meyer analysis and Cox proportional hazards regression models were used to analyze associations between available variables and overall survival. Mean time of follow up for our patients was 73.78 months (SD 41.53 months, minimum 0 months and maximum 217 months). All the variables in the univariate analysis were included into a multivariate model. On univariate analysis sex, Breslow thickness, Clark level, histopathological subtype, Sporadic or Familial MM group, cellular atypia, inflammatory infiltrate and number of mitoses were associated with overall survival (Table 8). On multivariable analysis, sex carried significant prognostic value for overall survival (hazard ratio (HR) 4.802, 95% confidence interval (CI) 1.779–12.956). Breslow thickness was a significant

independent predictor of overall survival (HR:1.571, 95% CI 1.366–1.806). Cellular atypia was also a prognostic value on overall survival on the multivariable model.

Discussion

We compared the clinical and histopathological characteristics of 62 patients with familial melanoma and 127 patients with sporadic melanoma in our Mediterranean area. We also studied the presence of *CDKN2A* mutation in patients belonging to the familial melanoma group and compared clinical and histopathological characteristics of 17 patients with *CDKN2A* mutation and 168 non-carriers. The characterization of familial cases has been shown to result in early detection of new melanomas by elaborating specific educating and surveillance plans for all the members [16].

Several significant differences were found between familial and sporadic groups. When the variables were included in a multivariable analysis, the earlier age of onset, lower Breslow thickness and a higher proportion of *in situ* melanomas maintained their significance in the model.

Of the 62 familial melanoma patients, 17 were found to be carriers of a *CDKN2A* mutation. Several significant differences were found between carriers and non-carrier groups. When the variables were included in a multivariable analysis the earlier age of onset, a higher proportion of *in situ* melanomas, the higher risk of multiple melanomas and the cytoplasmic survivin immunostaining maintained their significance.

Our results agree with previous reports; other studies reported a younger age at diagnosis of familial melanoma, an increased risk of multiple primary melanomas and a higher proportion of *in situ* and superficial spreading malignant melanoma [6,7]. Nagore and coworker's also studied a Mediterranean population of familial cases and they found no familial melanoma on hand or foot and no histological ALM. Similarly, in our series we found no familial melanoma on palms and a lower proportion of ALM than in the sporadic group, and no cases of ALM in carriers [6]. An increased proportion of superficial spreading type melanomas in familial melanoma have been reported before [6]. It has been suggested that this is because a relatively large proportion of melanomas in patients with familial melanoma arises from nevi as familial melanoma is associated with increased nevi number. Melanomas that are associated with nevi are usually of the superficial spreading type. Our results are in accordance with this hypothesis as we found a higher proportion of superficial spreading melanomas in the familial and p-16 group and also a larger number of nevi, but we did not analyse the proportion of melanomas arising from nevi.

A higher frequency of melanomas located on the lower limbs was found in familial melanomas and in p-16 melanomas compared with sporadic and non-carriers. In a study by our group Carrera and coworkers found that a higher proportion of the early melanomas on the limbs studied belonged to familial cases [17].

The finding of thinner tumours in familial and p-16 cases could be explained by these patients being high risk patients already under close surveillance, although we and others found that patients with familial melanomas still manifested earlier ages at diagnosis even

when only the first cases in each family were considered, which points to an earlier occurrence in this group because of a genetic predisposition [18]. In accordance to that, we found no statistical differences in median Breslow thickness in the familial group depending on whether the patient was the index case or not. The higher frequency of multiple melanomas in individuals with a familial form of cutaneous melanoma is an unquestionable fact, widely reported in the literature and intimately related with the presence of mutations in the *CDKN2A* gene [14]. In our study, the presence of multiple primary melanomas was a predictive factor of being a familial case, and the strongest predictive factor of being a *CDKN2A* carrier, even after multivariate analysis. Our results suggest a higher expression of cytoplasmic survivin in familial and p-16 tumours, a characteristic that is maintained on the multivariate analyses for p-16 tumours. Vetter and co-workers found that cytoplasmic survivin is mainly expressed in metastatic melanomas [12]. We know that somatic loss of p16 is seen in the majority of human melanomas and that this accelerates melanomagenesis [19]. The fact that Vetter and co workers found cytoplasmic survivin mainly expressed in metastatic melanomas could be related to p16 loss, and would be in agreement with our finding that germline p16 mutated melanomas stained for cytoplasmic survivin. The mean Breslow thickness in those p16 germline mutated tumours positive for cytoplasmic survivin was 0.8mm, and we were not able to value survivin as a prognostic marker in this subset of patients because none died or developed metastases.

Our results in the familial and p-16 mutated population are in accordance with the inherited increased susceptibility with, most of them reported before in other founder populations including: (1) younger age of onset; (2) high risk of MPM; (3) lower Breslow thickness and a higher proportion of *in situ* melanomas and (4) higher proportion of cytoplasmic surviving [7].

Taken together, our findings agree with the hypothesis of at least two pathways for cutaneous melanoma pathogenesis proposed by Whiteman and co-worker's, one associated with increased numbers of nevi, intermittent sun exposure, younger age at diagnosis and location on the trunk (nevus pathway) [20]. The second pathway is associated with chronic sun exposure, fewer nevi, older age at diagnosis, and location in the head and neck region (ultraviolet B pathway). In our familial and p-16 population, the increased number of nevi, the high proportion of superficial spreading type melanomas and low proportion of lentiginous melanomas, the low proportion of tumours located on the head and neck area (with no cases in the p-16 population) and the higher proportion of sunburns during childhood suggest that melanomas in these patients develop predominantly through the nevus pathway.

In summary, our study shows that familial occurrence of cutaneous melanoma was significantly associated with earlier age of onset, lower Breslow thickness and a higher proportion of *in situ* melanomas; and also with higher risk of multiple melanomas and the cytoplasmic survivin immunostaining in the case of carriers of *CDKN2A* mutations. As reported in other founder populations with other *CDKN2A* mutations our findings are in concordance with the so-called divergent pathways hypotheses: familial melanomas tend to follow the nevus pathway.

These findings were based on patients with melanoma in the Mediterranean area. More studies are necessary to determine whether our results apply to other populations.

Acknowledgement

We thank the research nurses from the Melanoma Unit, Daniel Gabriel and Pablo Iglesias for collecting phenotype data of patients and to Maria Eugenia Moliner the clinical nurse of the Melanoma Unit for all her support.

Funding Source

National Cancer Institute (NCI) of the US National Institute of Health (NIH) (CA83115).

References

1. Ang CG, Kelly JW, Fritschi L, Dowling JP. Characteristics of familial and non-familial melanoma in Australia. *Melanoma Res.* 1998; 8:459–464. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 9835460]
2. Leachman SA, Carucci J, Kohlmann W, Banks KC, Asgari MM, et al. Selection criteria for genetic assessment of patients with familial melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2009; 61:677. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 19751883]
3. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Gillanders EM, Hayward NK, et al. High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res.* 2006; 66:9818–9828. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 17047042]
4. Kefford RF, Newton Bishop JA, Bergman W, Tucker MA. Counseling and DNA testing for individuals perceived to be genetically predisposed to melanoma: A consensus statement of the Melanoma Genetics Consortium. *J Clin Oncol.* 1999; 17:3245–3251. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 10506626]
5. Goldstein AM, Struwing JP, Chidambaram A, Fraser MC, Tucker MA. Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92:1006–1010. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 10861313]
6. Nagore E, Botella-Estrada R, Garcia-Casado Z, Requena C, Serra-Guillen C, et al. Comparison between familial and sporadic cutaneous melanoma in Valencia, Spain. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008; 22:931–936. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 18355200]
7. van der Rhee JI, Krijnen P, Gruis NA, de Snoo FA, Vasen HF, et al. Clinical and histologic characteristics of malignant melanoma in families with a germline mutation in CDKN2A. *J Am Acad Dermatol.* 2011; 65:281–288. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 21570156]
8. Barnhill RL, Roush GC, Titus-Ernstoff L, Ernstoff MS, Duray PH, et al. Comparison of nonfamilial and familial melanoma. *Dermatology.* 1992; 184:2–7. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 1558990]
9. Rodríguez JA, Span SW, Ferreira CG, Kruyt FA, Giaccone G. CRM1-mediated nuclear export determines the cytoplasmic localization of the antiapoptotic protein Survivin. *Exp Cell Res.* 2002; 275:44–53. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 11925104]
10. Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J Cancer.* 2005; 114:509–512. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 15578717]
11. Piras F, Murtas D, Minerba L, Ugalde J, Floris C, et al. Nuclear survivin is associated with disease recurrence and poor survival in patients with cutaneous malignant melanoma. *Histopathology.* 2007; 50:835–842. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 17543072]
12. Vetter CS, Müller-Blech K, Schrama D, Bröcker EB, Becker JC. Cytoplasmic and nuclear expression of survivin in melanocytic skin lesions. *Arch Dermatol Res.* 2005; 297:26–30. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 15906050]
13. McGovern VJ, Cochran AJ, Van der Esch EP, Little JH, MacLennan R. The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: a revision of the 1972 Sydney

- classification. *Pathology*. 1986; 18:12–21. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 3725419]
14. Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med*. 2008; 5:e120. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 18532874]
 15. Puig S, Malvey J, Badenas C, Ruiz A, Jimenez D, et al. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol*. 2005; 23:3043–3051. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 15860862]
 16. van der Rhee JJ, de Snoo FA, Vasen HF, Mooi WJ, Putter H, et al. Effectiveness and causes for failure of surveillance of CDKN2A-mutated melanoma families. *J Am Acad Dermatol*. 2011; 65:289–296. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 21570154]
 17. Carrera C, Palou J, Malvey J, Segura S, Aguilera P, et al. Early stages of melanoma on the limbs of high risk patients: clinical, dermoscopic, reflectance confocal microscopy and histopathological characterization for improved recognition. *Acta Derm Venereol*. 2011; 91:137–146. [PubMed: 21240454]
 18. Anderson DE. Clinical characteristics of the genetic variety of cutaneous melanoma in man. *Cancer*. 1971; 28:721–725. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 5096934]
 19. Monahan KB, Rozenberg GI, Krishnamurthy J, Johnson SM, Liu W, et al. Somatic p16(INK4a) loss accelerates melanomagenesis. *Oncogene*. 2010; 29:5809–5817. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 20697345]
 20. Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, Hughes MC, Hayward NK, et al. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95:806–812. See comment in PubMed Commons below. [PubMed: 12783935]

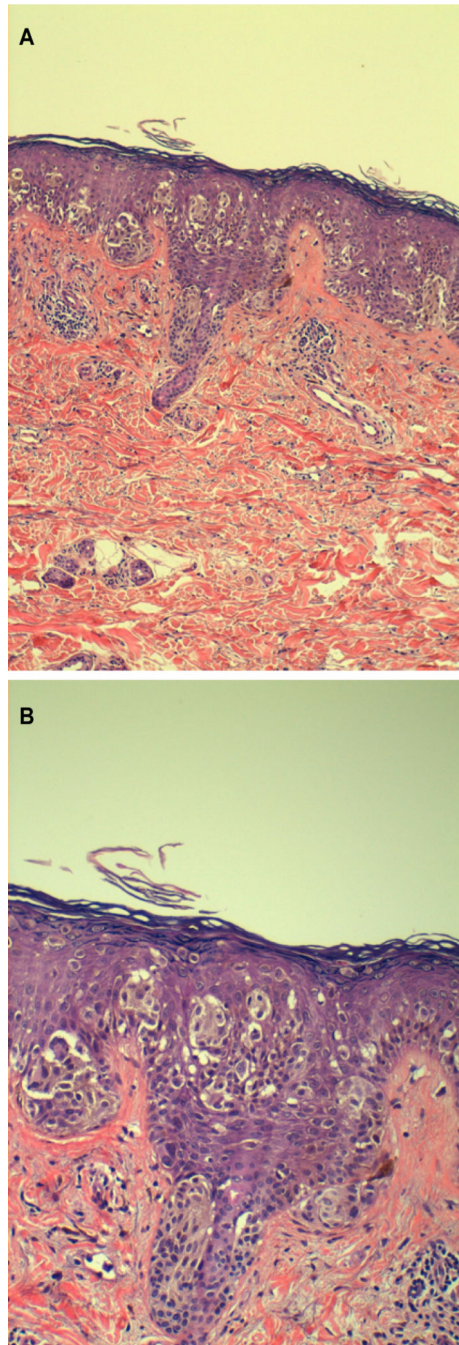


Figure 1.
a and b: Big round cells in p16 mutated tumour.

Table 1

Patient and tumour characteristics. Familial versus Sporadic group.

Features	Familial Melanoma (N=62)	Non Familial Melanoma (N=127)	P	CI 95%	OR
Age: Mean (SD)	55.47 (15.980)	66.60 (18.042)	0	6.016–16.255	
Sex: Men	24 (38.7%)	64 (50.4%)	0.131		
Women	38 (61.3%)	63 (49.6%)			
Age at diagnosis			0	7.226–18.004	
Mean (SD)	44.26 (17.198)	56.87 (18.267)			
Melanoma site			0.01		
-head/neck	4 (6.5%)	20 (15.7%)			
-upper limbs	6 (9.7%)	15 (11.8)			
-lower limbs	19 (30.6%)	17 (13.4%)			
-palms	0 (0%)	10 (7.9%)			
-soles	7 (11.3%)	19 (15%)			
-trunk	26 (41.9%)	46 (36.2%)			
Breslow thickness: Mean (SD)	0.79 (1.634)	2.34 (3.79)	0.021	0.169–2.37	
MM in situ	22 (35.5%)	25 (19.7%)	0.018	1.111–2.485	1.662
Histological subtype			0.031		
-LMM	3 (4.8%)	11 (8.7%)			
-SSM	51 (82.3%)	78 (61.4%)			
-NM	1 (1.6%)	10 (7.9%)			
-ALM	7 (11.3%)	28 (22%)			
Multiple Melanomas	20 (32.3%)	19 (15%)	0.006	1.229–2.730	1.832
Past history of sunburns	35 (87.5%)	50 (61.7%)	0.004	1.264–6.951	2.965
Intense solar exposure before 18 years	18 (45%)	18 (21%)	0.006	1.063–2.132	1.506

Table 2

Multiple and familial melanoma. Mean Breslow thickness and percentage of in situ type melanomas.

Multiple Melanoma	Mean Breslow	p	<i>In situ</i>	p
First tumor N=10 (25.6%)	0.64	0.065	20%	0.152
Successive N= 29 (74.4%)	0.33		48.30%	
Familial Melanoma	Mean Breslow	p	<i>In situ</i>	p
Index case N=37 (61.7%)	1.4	0.713	25%	0.033
Not index case N=23 (38.3%)	0.73		52.20%	

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Table 3

Phenotypic characteristics and histopathological features. Familial versus Sporadic group.

Features	Familial Melanoma (N=62)	Non Familial Melanoma (N=127)	P
Phototype			0.989
-I-II	22 (44%)	43 (43.9%)	
-III-IV	28 (56%)	55 (56.1%)	
Hair colour			0.138
-brown/black	36 (67.9%)	75 (78.9%)	
-blond/red	17 (32.1%)	20 (21.1%)	
Eye colour			0.441
-dark	31 (58.5%)	61 (64.9%)	
-fair	22 (41.5%)	33 (35.1%)	
Nevi count			0.021
50	22 (46.8%)	49 (68.1%)	
50	25 (53.2%)	23 (31.9%)	
Elastosis			0.086
-not present	51 (82.3%)	89 (70.6%)	
-present	11 (17.7%)	37 (29.4%)	
Type of cells			0.663
-epithelioid	45 (72.6%)	101 (79.5%)	
-sarcomatoid	4 (6.5%)	6 (4.7%)	
-big round	7 (11.3%)	7 (5.5%)	
-fusocellular	4 (6.5%)	9 (7.1%)	
-dendritic	2 (3.2%)	4 (3.1%)	
TIL			0.713
-not present	10 (16.1%)	16 (12.6%)	
-mild	45 (72.6%)	99 (78%)	
-severe	7 (11.3%)	12 (9.4%)	
Regression			0.236
-present	13 (21%)	18 (14.2%)	
-not present	49 (79%)	109 (85.8%)	
Mitoses			0.042
-1	46 (74.2%)	75 (59.1%)	
1	16 (25.8%)	52 (40.9%)	
Pagetoid invasion			0.976
-not present			
-mild	1 (1.6%)	2 (1.6%)	
-severe	20 (32.3%)	39 (30.7%)	
	41 (66.1%)	86 (67.7%)	

Features	Familial Melanoma (N=62)	Non Familial Melanoma (N=127)	P
Nests			0.517
-present	47 (77%)	103 (81.1%)	
-not present	14 (23%)	24 (18.9%)	
Lentiginous hyperplasia			0.722
-present			
-not present	31 (50%)	60 (47.2%)	
	31 (50%)	67 (52.8%)	
Cellular atypia			0.996
-mild	15 (24.2%)	31 (24.4%)	
-moderate	31 (50%)	64 (50.4%)	
-severe	16 (25.8%)	32 (25.2%)	
Nuclear Survivin			0.821
-positive	13 (23.2%)	29 (24.8%)	
-negative	43 (76.8%)	88 (75.2%)	
Cytoplasmic Survivin			0.05
-positive	47 (83.9%)	82 (70.1%)	
-negative	9 (16.1%)	35 (29.9%)	

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Table 4

Multivariate analysis for characteristics associated with familial melanoma.

Variables	Univariate *			Multivariate **		
	P	OR	95% CI	P	OR	95% CI
Age at diagnosis	0		7.226–18.004	0	1.036	1.017–1.055
Breslow	0.021		0.169–2.025	0.049	1.288	1.013–1.683
MM in situ	0.018	1.662	1.111–2.485	0.015	2.645	1.211–5.778

* Only significant variables in the multivariate logistic regression model are included in the table.

** Forward stepwise multivariate logistic regression.

Table 5

Patient and tumour characteristics Carriers of a CDKN2A mutation versus non-carriers.

Features	CDKN2A Melanoma (N=17)	Non CDKN2A Melanoma (N=168)	P	CI 95%	OR
Age: Mean (SD)	49.53 (12.674)	64.29 (17.973)	0	7.782–21.731	
Sex: Men	6 (35.3%)	80 (47.3%)	0.342		
Women	11 (64.7%)	89 (52.7%)			
Age at diagnosis			0	8.567–24.402	
Mean (SD)	37.71 (14.581)	54.19 (18.502)			
Melanoma site			0.015		
-head/neck	0 (0%)	23 (13.6%)			
-upper limbs	1 (5.9%)	19 (11.2%)			
-lower limbs	8 (47.1%)	28 (16.6%)			
-palms	0 (0%)	10 (5.9%)			
-soles	0 (0%)	26 (15.4%)			
-trunk	8 (47.1%)	63 (37.3%)			
Breslow thickness: Mean (SD)	0.74 (0.532)	2.12 (3.490)	0	0.823–1.910	
MM <i>in situ</i>	10 (58.8%)	36 (21.3%)	0.002	1.756–10.765	4.348
Histological subtype			0.031		
-LMM	0 (0%)	14 (8.3%)			
-SSM	17 (100%)	109 (64.5%)			
-NM	0 (0%)	11 (6.5%)			
-ALM	0 (0%)	35 (20.7%)			
Multiple Melanomas	11 (64.7%)	28 (16.6%)	0	2.727–17.513	6.91
Past history of sunburns	7 (100%)	76 (67.9%)	0.1		
Intense solar exposure before 18 year	8 (80%)	27 (23.9%)	0.001		

Table 6

Phenotypic characteristics and histopathological features Carriers of CDKN2A mutation versus non-carriers

Features	CDKN2A Melanoma (N=17)	Non CDKN2A Melanoma (N=168)	P
Phototype			0.919
-I-II	6 (42.9%)	58 (44.3%)	
-III-IV	8 (57.1%)	73 (55.7%)	
Hair colour			0.555
-brown/black	11 (68.8%)	97 (75.2%)	
-blond/red	5 (31.3%)	32 (24.8%)	
Eye colour			0.833
-dark	9 (60%)	81 (62.8%)	
-fair	6(40%)	48 (37.2%)	
Nevi count			0.055
50	5 (35.7%)	65 (62.5%)	
50	9 (64.3%)	39 (37.5%)	
Elastosis			0.569
-not present	14 (82.4%)	125 (74.4%)	
-present	3 (17.6%)	43 (25.6%)	
Type of cells			0
-epithelioid	10 (58.5%)	133 (78.7%)	
-sarcomatoid	1 (5.9%)	9 (5.3%)	
-big round	6 (35.3%)	8 (4.7%)	
-fusocellular	0 (0%)	13 (7.7%)	
-dendritic	0 (0%)	6 (3.6%)	
TIL			0.441
-not present	4 (23.5%)	22 (13%)	
-mild	11 (64.7%)	131 (77.5%)	
-severe	2 (11.8%)	16 (9.5%)	
Regression			0.742
-present	2 (11.8%)	29 (17.2%)	
-not present	15 (88.2%)	140 (82.8%)	
Mytoses			0.242
-1	13 (76.5%)	105 (62.1%)	
1	4 (23.5%)	64 (37.9%)	
Pagetoid invasion			0.34
-not present	1 (5.9%)	2 (1.2%)	
-mild	5 (29.4%)	54 (32%)	
-severe	11 (64.7%)	113 (66.9%)	
Nests			0.743

Features	CDKN2A Melanoma (N=17)	Non CDKN2A Melanoma (N=168)	P
-present	14 (87.5%)	134 (79.3%)	
-not present	2 (12.5%)	35 (20.7%)	
Lentiginous hyperplasia			0.945
-present			
-not present	8 (47.1%)	81 (47.9%)	
	9 (52.9%)	88 (52.1%)	
Cellular atypia			0.408
-mild	2 (11.8%)	42 (24.9%)	
-moderate	9 (52.9%)	85 (50.3%)	
-severe	6 (35.3%)	42 (24.9%)	
Nuclear Survivin			1
-positive	4 (25%)	38 (24.7%)	
-negative	12 (75%)	116 (75.3%)	
Cytoplasmic Survivin			0.052
-positive	15 (93.8%)	112 (72.7%)	
-negative	1 (6.3%)	42 (27.3%)	

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Table 7

Multivariate analysis for characteristics associated with p-16 melanoma.

Variables	Univariate*			Multivariate**		
	P	OR	95% CI	P	OR	95% CI
Age at diagnosis	0		8.567–24.402	0.007	1.06	1.016–1.105
MM <i>in situ</i>	0.002	4.348	1.756–10.765	0.003	6.961	1.895–25.567
Multiple MM	0	6.91	2.727–17.513	0.001	8.92	2.399–33.166
Cytoplasmatic survivin +	0.052	0.197	0.027–1.447	0.049	9.072	1.025–85.010

* Only significant variables in the multivariate logistic regression model are included in the table.

** Forward stepwise multivariate logistic regression.

Table 8

Kaplan Meyer analysis and Cox proportional hazards regression models results.

Variable	Survival days	Univariate analysis		Multivariable analysis		P Value	95% CI	P Value
		Log Rank		Hazard Ratio				
Sex								
-Men	5279.871	3.922				0.048	1.779–12.956	0.002
-Women	5713.971							
Breslow								
1 mm	6348.898	28.948				0	1.366–1.806	0
1 mm	2996.119							
Breslow								
2 mm	6108.325	52.918				0		
2 mm	2120.635							
Breslow								
5 mm	5948.213	110.925				0		
5 mm	917.667							
Clark level								
-I	6470.2	61.614				0		
-II	5985.921							
-III	4631.688							
-IV	1944.356							
-V	1285.625							
Tumor Location								
Group						0.299		
-Sporadic MM	5264.739	7.456				0.006		
-Familiar MM								
	5995.199							
MMM								
-Yes	6072.296	1.505				0.22		
-No	4236.897							

Variable	Survival days	Univariate analysis Log Rank	P Value	Multivariable analysis Hazard Ratio	95% CI	P Value
Nuclear Survivin						
-Positive		0.499	0.48			
-Negative	4555.304					
	4622.521					
Cytoplasmic						
Survivin		0.033	0.856			
-Positive	4643.208					
-Negative	4369.296					
Cellular atypia						
-1	6212.268	13.461	0.001	2.386	2.137–5.869	0.049
-2	4582.507					
-3	4498.736					
Inflammatory infiltrate						
0		8.077	0.044			
-1						
-2						
-3						
Mytoses						
1	6208.659	20.441	0			
1	4229.195					
Pageoid invasion						
Nests		2.049	0.562			
		1.975	0.16			
Elastosys		1.582	0.663			

TRABAJO III

Benefits of Oral Polypodium Leucotomos extract in MM high-risk patients

Paula Aguilera, Cristina Carrera, Joan Anton Puig-Butillé, Celia Badenas, Mario Lecha, Salvador González, Josep Malvehy, Susana Puig.

JEADV. 2013;27:1095-1100

Factor de Impacto: 3.105

Objetivos

Analizar el posible papel del extracto de *Polypodium Leucotomos* (PL) vía oral como fotoprotector sistémico en pacientes de alto riesgo a desarrollar MM. Estudiar la interacción entre los polimorfismos en *MC1R* y el estatus *CDKN2A* con la mínima dosis eritematogena (DEM) y su influencia en la respuesta al PL.

Metodología

Estudio prospectivo intervencionista en el que se incluyeron 61 pacientes de riesgo a MM (25 con MM familiar o múltiple, 20 con MM esporádico y 16 con síndrome de NCA sin historia de MM). Los pacientes fueron expuestos a dosis crecientes de radiación UVB para la determinación de la DEM, sin medicación y tras la administración de una dosis total de 1080mg de PL.

Resultados

La media de la DEM basal en nuestros pacientes fue de 0.124 ± 0.04 J/cm². Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres, teniendo las mujeres de nuestra serie una DEM basal mayor que los hombres (0.14 versus 0.11 J/cm²), $p < 0.05$.

La administración de PL incrementó la DEM de forma significativa en todos los grupos (0.123-0.161 J/cm²), $p < 0.05$. El tratamiento fue efectivo en cuanto al incremento de la DEM en todos los grupos, y se observó un mayor efecto, aunque no fue estadísticamente significativo, del PL en el incremento de la DEM en los pacientes con MM familiar en comparación con los pacientes con MM esporádico.

El análisis multivariante ajustado por edad y sexo reveló el tener los ojos oscuros y un valor de DEM basal bajo como predictores de buena respuesta al efecto del PL en cuanto al incremento de la DEM.

ORIGINAL ARTICLE

Benefits of oral *Polypodium Leucotomos* extract in MM high-risk patients

P. Aguilera,^{†,*} C. Carrera,[†] J.A. Puig-Butille,^{‡,††} C. Badenas,[‡] M. Lecha,[§] S. González^{†,**,††}
J. Malvehy,^{†,††} S. Puig^{†,††}

[†]Melanoma Unit, [‡]Genetic Unit, [§]Photobiology and Phototherapy Unit, Dermatology Department, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Universidad de Barcelona, Spain

^{*}Dermatology Service, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA

^{**}Dermatology Service, Ramon y Cajal Hospital, Madrid, Spain

^{††}2 U726 CIBERER, Instituto de Salud Carlos III, Barcelona, Spain

*Correspondence: Paula Aguilera. E-mail: aguiliisha@hotmail.com

Abstract

Background UV radiation and the presence of melanocytic nevi are the main risk factors of sporadic melanoma (MM). Protection of skin by an oral photoprotective agent would have substantial benefits.

Objective We investigated the possible role of an oral *Polypodium leucotomos* (PL) extract to improve systemic photoprotection in patients at risk of skin cancer analyzing the ability to decrease UV-induced erythema. We also studied the interaction among *MC1R* polymorphisms and *CDKN2A* status with the minimal erythematous dose (MED) and their influence in the response after oral PL.

Methods A total of 61 patients (25 with familial and/or multiple MM, 20 with sporadic MM and 16 with atypical mole syndrome without history of MM) were exposed to varying doses of artificial UVB radiation without and after oral administration of a total dose of 1080mg of PL.

Results Oral PL treatment significantly increased the MED mean in all group patients (0.123 to 0.161 J/cm², $p < 0.05$). Although not significant, we noticed a stronger effect of PL on the MED of patients with familial MM compared to those with MM ($U = 273$, $p = 0.06$). Among the patients with familial MM, those exhibiting a mutated *CDKN2A* and/or polymorphisms in *MC1R* had the bigger differences in response to treatment with PL.

Limitations Reduced number of patients. No control population.

Conclusions Administration of PL leads to a significant reduction of sensitivity to UVR ($p < 0.05$) in all patients. Dark-eye patients and patients with higher UVR sensibility (lower basal MED) would be the most benefited from oral PL treatment.

Received: 07 February 2012; Accepted: 26 June 2012

Conflict of Interest

Dr Gonzalez serves as consultant to Industrial Farmaceutica Cantabria (IFC).

Funding Sources

This study was supported in part by Grants 03/0019, 05/0302 and 06/0265 from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Spain; by the CIBER de Enfermedades Raras of the Instituto de Salud Carlos III, Spain; by the AGAUR 2009 SGR 1337 of the Catalan Government, Spain; by the European Commission under the 6th Framework Programme, Contract nr: LSHC-CT-2006-018702 (GenoMEL) and by the National Cancer Institute (NCI) of the US National Institute of Health (NIH) (CA83115). This specific work was funded by a personal grant to Paula Aguilera, 'Premi Josep Font' from the Hospital Clínic of Barcelona, Spain. The study was partially supported by Industrial Farmaceutica Cantabria (IFC), Madrid, Spain.

Introduction

Melanoma (MM) is the human malignancy that has undergone the greatest increase in incidence during the last few decades. To improve prognosis, it is critical to identify patients bearing high

risk of suffering MM, as well as genetic factors of predisposition and progression. Ninety per cent of MMs are considered sporadic, and the main risk factors implicated are ultraviolet radiation (UVR) and the presence of melanocytic nevi.^{1–5} Exposure of

human skin to sunlight containing both A and B UVR leads to deleterious cutaneous effects, the most remarkable being skin cancer.⁶ Currently, the most widely used method of protection against UV-induced damage is the use of topical sunscreens, which act through physical particles enriched with chemical molecules that reflect and/or absorb UVR. A systemic photoprotective agent would have several advantages over topical protection, as this would provide more uniform, prolonged, and total body surface protection, independently of the specific properties of the creams, the amount applied, and other individual factors such as sweating or water bathing.

Polypodium Leucotomos (PL) is a tropical fern that has long been used for the treatment of inflammatory disorders by Native Americans.⁷ Extracts of PL, topically applied or orally taken, have been shown to have a variety of potentially beneficial properties. Administration of PL to mice decreases the degree of histological parameters of photoaging damage resulting from UVB radiation exposure and lowers the incidence of UVB radiation-induced non-MM skin cancers.⁸ Furthermore, PL extract activates tumour suppressor p53, inhibits UV-induced Cox-2 expression, reduces inflammation, enhances the removal of UV-induced photoproducts, such as cyclobutane pyrimidine dimers, as well as reduces oxidative DNA damage and decreased UV-induced mutagenesis.⁹ Finally, oral administration of PL extracts to humans decreases UVR-induced skin damage^{10,11} as well as psoralen-UVA radiation-induced phototoxicity and pigmentation^{10,12} and, recently, also has been shown to prevent UVA-induced common deletions and mitochondrial DNA damage.¹³

Heritable alleles for MM susceptibility range from high-risk genes, high-penetrance alleles that are rare, to low-risk genes, low-penetrance alleles that are rather ubiquitous. This has been captured in the adage 'common variants (i.e. polymorphisms) cause common disease (i.e. sporadic MM), whereas rare variants (i.e. mutations) cause rare disease (i.e. hereditary MM).' The high-penetrance alleles can be responsible for rare familial clusters of MM, but, fortunately, they do not participate in common sporadic cases.

Low-penetrance alleles are quite prevalent in the general population, but are not as closely associated with the ultimate development of MM. Thus, whereas more patients with MM have a combination of these low-risk allelic mutations, most patients with these variants will not ever develop MM.

The cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor 2A gene (*CDKN2A*) is the best-established high-risk locus for MM. It has been determined that, in aggregate, 25–50% of familial MM kindred are affected by a *CDKN2A* mutation. This prevalence increases as the number of affected cases increase in the index family. In smaller studies, up to 10% of patients with multiple primary MM (MPMs) have been identified to display a *CDKN2A* mutation. In a large population-based study, however, reported *CDKN2A* mutation rates are about 1% for the unselected MM patient and about 3% for individuals with

MPM.^{14,15} Although most familial cases of MM are caused by mutations in *CDKN2A*, some families are affected by genetic mutations downstream of *CDKN2A*. Mutations in cyclin-dependent protein kinase 4 (*CDK4*) have been identified in some MM kindreds.¹⁶

Beyond genes known to confer a high degree of susceptibility to cutaneous MM, other genes have been proposed to confer moderate risk. Fair skin and red hair colour have been associated with increased MM risk. Specific variants in the Melanocortin 1 receptor (*MC1R*) gene produce variable quantity of the red/yellow pheomelanin pigment, which induces oxidative cell-damage, instead of the brown to black eumelanin, which is photoprotective. Depending on these *MC1R* variants and other pigment track genes (*OCA*, *TYR*, ...), the most common phenotype is that of individuals of blond or red hair, Fitzpatrick's skin phototype I, tendency to sun-induced freckling and reduced tanning response.^{17,18} Variants in *MC1R* are relatively common in the white population and have been proposed to confer low-to-moderate MM susceptibility risk.^{19,20} One large study noted a 2.2-fold increase in the relative odds of developing cutaneous MM among individuals with one 'red hair' variant (RHV), and a 4.1-fold increased relative odds in those with two variants. Increased risk remained unchanged for carriers who had non-RHV and darker skin. RHV of *MC1R* also has been demonstrated to increase the rate of MM in individuals who have *CDKN2A* mutations.^{21,22} More than 30 allelic variants of the human *MC1R* have been identified, mainly in Northern European populations and in Australia. The consequences of these variants on physiological function of the product of the *MC1R* gene have just begun to be elucidated. For example, it is known that R160W homozygote and R151C/D294H, R160W/D294H compound heterozygote fail to couple to cAMP activation, show impaired tyrosinase activation in response to α MSH stimulation and display a pronounced sensitivity to UVR.²³

The aim of this study was to test the possible role of an oral PL extract to improve systemic photoprotection in patients at risk of skin cancer. The first goal was to further analyse the ability to decrease UV-induced erythema. A second aim was the study of the interaction among *MC1R* polymorphisms and *CDKN2A* status with the minimal erythematous dose (MED) and their influence in the response after oral PL.

Patients and methods

Participant selection

We included 61 patients belonging to the following groups: 25 patients with familial and/or multiple MM (two or more first-degree relatives with MM and/or two or more MMs in the same patient), 20 patients with sporadic MM and 16 patients with atypical mole syndrome without history of MM.

Patients were included after they read and signed a written informed consent form approved by the ethical committee of

Hospital Clinic de Barcelona, Barcelona, Spain. Exclusion criteria were history of abnormal photosensitivity (defined by any photo-induced dermatosis or demonstration of a decreased minimal erythemathous dose to UVB; lower than 100 mJ/cm²), or photosensitivity-induced drugs intake, UVR (natural or artificial) exposure 6 weeks before the study.

Descriptive study Patient phenotyping: Skin type of each individual was determined in accordance with Fitzpatrick classification (I–IV), eye colour was categorized as ‘brown’, ‘black’, ‘green’ or ‘blue’ and hair colour was recorded as ‘brown’, ‘black’, ‘blonde’ or ‘red’. Number and clinical and dermoscopic description of nevi were studied.

Patient genotyping: Blood samples were taken from all patients. The PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) was used to isolate genomic DNA from lymphocytes according to the manufacturer’s instructions.

Promoter (–34G>T variant), intronic (IVS2-105) and coding regions of the *CDKN2A* gene (exons 1 α , 2 and 3 of the p16INK4A protein and exon 1 β corresponding to p14ARF protein) were amplified by PCR using primers and conditions previously described.²⁴ *MC1R* was amplified using primers described by Chaudru *et al.*²⁵ SSCP analysis was carried out. Samples with abnormal migration products were sequenced as follows: PCR products were purified using the GFXTM PCR DNA and Gel Band purification kit (Amersham Bioscience, London, UK) and automatically sequenced using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and an ABI3100 automatic sequencer (Applied Biosystems).

UVR sensitivity assessment

UVB MED was assessed in each patient by means of a Waldmann UV800 lamp as performed in The Fotobiology Unit of the Hospital Clinic, Barcelona. Normal skin on the central back of patients was irradiated in six consecutive increasing dose-exposure windows (doses of 0.02, 0.05, 0.07, 0.10, 0.15 and 0.20 J/cm²) on a 2-cm²

area at 20 cm distance from the lamp. The UVB-MED was defined as the minimal dose of radiation per cm², which induces confluent erythema at 24 h with four sharp borders of the exposed skin site.

Intervention assay design

After basal MED assessment, all participants received the same oral dose of a commercial form of PL (120 mg each capsule; Difur[®], Industrial Farmaceutica Cantabria, SA, Madrid, Spain); 720 mg of oral PL in three doses, (240 mg every 8 h) and 360 mg in a single dose were administered one day and 3 h, respectively, before a second MED assessment (total dose of 1080 mg).

Clinical evaluation of both basal and post-treatment MED were performed by two experienced dermatologists.

Statistical analysis

Descriptive analysis of the sample was performed, including percentages for categorical variables, and mean, minimum, maximum and standard deviation values for continuous variables. Comparisons of continuous variable means were performed using Student’s exact *t*-test when variables followed a normal distribution. Comparisons of discrete variable means were performed using the Mann–Whitney non-parametric test. Comparisons between categorical variables were performed with χ^2 tests and Fisher corrections were performed when required. Categorical multivariable analysis was performed to evaluate independent risk factors of reduced MED after oral treatment with PL extract using a stepwise forward approach.

Results

Descriptive results

Phenotyping: A total of 61 patients were included in the study belonging to the following groups: 20 (33.3%) sporadic MM, 25 (41.7%) familial MM and 16 (25%) dysplastic nevus syndrome. The mean age was 47.79 \pm 14.75 years with a minimum of 15 years and a maximum of 76 years. Gender distribution was 29 male

Table 1 Distribution of studied variables in men and women

	Men	Women	Whole sample	
	<i>N</i> = 29 (48.3%)	<i>N</i> = 32 (51.7%)	<i>N</i> = 61 (100%)	
MM	<i>N</i> = 8 (40%)	<i>N</i> = 12 (60%)	<i>N</i> = 20 (33.3%)	
Familial MM	<i>N</i> = 13 (52%)	<i>N</i> = 12 (48%)	<i>N</i> = 25 (41.7%)	
Dysplastic nevus syndrome	<i>N</i> = 8 (50%)	<i>N</i> = 8 (50%)	<i>N</i> = 16 (25%)	
Mean age	50.03 years	45.75 years	47.79 years	0.261
Skin type I-II	<i>N</i> = 15 (53.6%)	<i>N</i> = 17 (58.6%)	<i>N</i> = 32 (56.1%)	0.701
Skin type III-IV	<i>N</i> = 13 (46.4%)	<i>N</i> = 12 (41.4%)	<i>N</i> = 25 (43.9%)	0.701
Dark hair	<i>N</i> = 22 (78.6%)	<i>N</i> = 22 (73.3%)	<i>N</i> = 44 (75.9%)	0.641
Blond/red hair	<i>N</i> = 6 (21.4%)	<i>N</i> = 8 (26.7%)	<i>N</i> = 14 (24.1%)	0.641
Dark eyes	<i>N</i> = 20 (71.4%)	<i>N</i> = 17 (56.7%)	<i>N</i> = 37 (63.8%)	0.242
Clear eyes	<i>N</i> = 8 (28.6%)	<i>N</i> = 13 (43.3%)	<i>N</i> = 21 (36.2%)	0.242
Actinic lentigos (moderate–severe)	<i>N</i> = 12 (42.9%)	<i>N</i> = 18 (62.1%)	<i>N</i> = 30 (52.6%)	0.146

(48.3%) and 31 female (51.7%). Individuals from our study population mainly exhibit dark eyes and hair phenotype as follows: 75.9% dark hair and 63.8% brown eyes. However, the most frequent skin type was II (47.4%) followed by skin type III (36.8%). Nevertheless, a non-depreciating percentage of our patients showed at least one phenotypic risk factor: 56.1% of individuals showed fair skin pigmentation, 36.2% green or blue eyes, 24.1% red or blonde hair (10.3% red hair) and 53.5% accumulated photodamage such as actinic lentigos (Table 1).

Study of mutations on the *CDKN2A* gene was performed in 37 individuals. Of these, nine (24.3%) were mutation carriers, all of them belonging to the familial MM group. From the familial MM patients, nine (33%) were mutation carriers. Fifty-five patients were studied for polymorphism in the *MC1R* gene of whom 17 (30.9%) were wild type (WT). Twenty-seven patients were carriers of one functional variant, nine patients were carriers of two functional variants and two patients were carriers of three functional variants of the *MC1R* gene. Three patients were carriers of two red hair variants (RHV) in the *MC1R*. The distribution of variants on our sample is shown in Table 2.

Basal photosensitivity The mean basal MED in overall population was 0.124 ± 0.04 J/cm², with a minimum of 0.07 and a maximum of 0.20 J/cm². Interestingly, men and women presented differences in basal MED values. Women had a higher basal MED than men (0.14 vs. 0.11 J/cm²), $U = 232.5$, $P < 0.05$. In addition, a high percentage of patients with familial MM had a higher basal

MED value (≥ 0.15 J/cm²) than the rest of the patients (sporadic MM and dysplastic nevus syndrome), but this was not statistically significant. Nor differences in basal MED were found between patients with past history of MM ($N = 45$); also, differences were not statistically significant when we compared with patients with dysplastic nevus syndrome without MM history ($N = 16$), (0.127 J/cm² vs. 0.117 J/cm², $U = 293$; $P = 0.23$). None of these depended on the presence of actinic lentigos, hair colour, eye colour, or *MC1R* polymorphisms (Table 3).

Despite the lack of statistically significant associations between a lower basal MED value and having RHV, non-RHV or WT *MC1R*, we observed that patients with at least one RHV had a tendency to lower basal MED values.

Photosensitivity after treatment The mean of MED after PL treatment was 0.161 ± 0.047 J/cm², with a minimum of 0.07 and a maximum of 0.3 J/cm². Again, we found significantly different MED values after PL depending on gender, with a higher post-PL MED in women than in men (0.18 vs. 0.14 J/cm²), $U = 286$, $P < 0.05$.

Importantly, oral PL treatment significantly increased the MED mean in patients in all groups (0.123–0.161 J/cm², $P < 0.05$).

We noted that patients without history of MM tended towards higher MED post-PL value (≥ 0.15 J/cm²) than patients with MM (93.3% vs. 77.8%), but this was not statistically significant. Also, we found no significant differences in MED values after PL treatment between patients with and without history of MM (0.167 vs. 0.157 J/cm², $U = 326.5$, $P = 0.83$). We did not observe differences depending on the presence of actinic lentigos, the hair colour, the eye colour or *MC1R* variants.

The effect of PL in increasing the mean MED was similar in all patients, independently of the group (with vs. without MM, patients with familial MM vs. without familial MM). The treatment was effective in terms of increasing mean MED in all groups. Although not significant, we noticed a stronger effect of PL on the MED of patients with familial MM compared with those with MM ($U = 273$, $P = 0.06$). Among the patients with familial MM, those exhibiting a mutated *CDKN2A* and/or polymorphisms in *MC1R* displayed larger differences in response to treatment with PL.

Table 2 Distribution of the *MC1R* variants

Variant	Frequency	%
D294H	6	12.5
R151C	12	25
R160W	3	6.3
R163Q	2	4.2
F45L	1	2.1
Q233Q	1	2.1
V60L	12	25
V92M	5	10.4
Y152X	1	2.1

Table 3 Basal MED means comparison between groups

Group	Basal MED mean	U	p
Lentigos ($N = 30$) vs. no lentigos ($N = 26$)	0.123 vs. 0.124 J/cm ²	401	0.945
Dark eye colour ($N = 37$) vs. light ($N = 21$)	0.120 vs. 0.128 J/cm ²	348.5	0.486
Dark hair colour ($N = 44$) vs. fair ($N = 14$)	0.122 vs. 0.123 J/cm ²	308	1
<i>MC1R</i> polymorphisms yes ($N = 38$) vs. no ($N = 17$)	0.120 vs. 0.123 J/cm ²	309	0.784
RH polymorphisms yes ($N = 19$) vs. no ($N = 36$)	0.114 vs. 0.125 J/cm ²	297	0.398
Men ($N = 29$) vs. women ($N = 32$)	0.107 vs. 0.140 J/cm ²	232.5	<0.05
MM ($N = 45$) vs. no MM ($N = 16$)	0.127 vs. 0.116 J/cm ²	293	0.238
<i>CDKN2A</i> ($N = 9$) vs. WT ($N = 28$)	0.122 vs. 0.118 J/cm ²	302	0.795

Table 4 Phenotypic characteristics of responders and non-responders

	Skin type	Hair colour	Eye colour
Responders	I N = 3 (7.9%) II N = 17 (44.7%) III N = 15 (38.5%) IV N = 3 (7.9%)	Dark N = 28 (73.7%) Blond-red N = 10 (26.3%)	Dark N = 28 (73.7%) Blue-green N = 10 (26.3%)
Non-responders	I N = 2 (10.5%) II N = 10 (52.6%) III N = 6 (31.6%) IV N = 1 (5.3%)	Dark N = 16 (80%) Blond-red N = 4 (20%)	Dark N = 9 (45%) Blue-green N = 11 (55%)

Of the 61 patients studied, 21 (35%) did not show any effect in MED value after orally administered PL, whereas an increase in the MED values was demonstrated in the other 40 (65%) patients. The increase in the MED after PL was associated with dark eyes ($\chi^2 = 4.67$, $P < 0.05$) (OR 4.47, CI 95% 1.22–16.34) and a lower basal MED value ($\chi^2 = 6.90$, $P < 0.05$) (OR 4.59, CI 95% 1.23–7.47). Phenotypic characteristics of responders and non-responders are shown in Table 4. Multivariable analysis adjusted for age and gender revealed dark eyes and a lower basal MED to be independent risk factors for increasing MED after treatment. In this way, having dark eyes and a higher sensibility to UVR may be predictors of a good response to PL.

Discussion

This study demonstrates that oral administration of PL leads to a significant reduction in sensitivity to UVR in terms of increased UVB–MED values ($P < 0.05$). This improvement in sensitivity to UVR could be observed in all the groups included in this study, which are patients with dysplastic nevus syndrome, patients with sporadic MM and patients with familial MM.

MM is the most devastating form of skin cancer. The steady increase in the incidence of MM and its resistance to chemotherapy, together with its high potential to metastasize, have emphasized the importance of its prevention. It is becoming clear that solar UVR is a main risk factor in the aetiology of MM²⁶ and its protection is the only primary prevention against MM development. Besides avoiding sun exposure, using a sunscreen is the most accepted photoprotection method in developed countries, and the preventive effect of using a sunscreen in non-MM skin cancer has often been suggested. However, there is still debate whether it provides adequate protection against MM and nevus induction. Inadequate sunscreen application has been found to be a common failing leading to deficient photoprotection.^{27,28} There is increasing evidence that a number of substances when taken orally exert a preventive effect against UV-induced skin damage without adverse effects. The mechanisms of action are highly varied, affecting diverse signalling pathways and resulting in an antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory activity.²⁹ A systemic photoprotective agent would have an advantage over topical protection, as this would provide uniform, total body surface protection. In addition, patients with familial MM have other risk

factors, which represent the main burden of risk, such as mutations in *CDKN2A* gene. Certain allelic variants in *MC1R* gene, namely R151C, R160W and D294H, are strongly associated with red hair phenotype and increased MM susceptibility. Natural expression of two of these variants sensitizes melanocytes to the cytotoxic effect of UV, and increases the burden of DNA damage and oxidative stress.³⁰ In this study, patients with RHV of *MC1R* had no statistically significant lower basal MED values than patients without RHV, but we found a trend to lower basal MED values in patients with at least one red hair polymorphism. It could be possible that the number of patients included in the study is insufficient to achieve statistical significance. Moreover, patients with *wild type* *MC1R* did not have basal MED values than patients with no red hair *MC1R* polymorphisms. Interestingly, a high percentage (56%) of our patients with familial MM have a high basal MED value ($\text{MED} \geq 0.15 \text{ J/cm}^2$), and they did not bear *MC1R* polymorphisms or red hair polymorphisms. In these familial MM cases, the risk is probably most associated with high-penetrance genes like *CDKN2A* and less to low medium penetrance genes like *MC1R* or other genes related to fair skin. Despite these findings, the exposition to RUVB is a modifying environmental factor that increases the risk of MM also in this context.³¹ The results of this study are very promising and suggest that patients with familial MM could benefit from orally PL as far as it reduces significantly sensitivity to RUVB in terms of increased MED UVB ($P < 0.005$). Due to the intrinsic high predisposition to these patients, any positive intervention to reduce their risk is very positive. Also very interesting and promising is the fact that orally PL reduces significantly RUVB effect in patients with sporadic MM and patients with dysplastic nevus syndrome in which the effects of UVR are mainly responsible in the MM genesis.

Analysis of the basal MED values by gender reveals that women had a higher basal MED value than men, which means a lower sensitivity to UVR. No other differences between groups were observed although patients with red hair polymorphisms in *MC1R* had lower basal MED values than patients without, but this was not statistically significant (Table 3). The same results were found when analysing MED values post treatment, women had statistically significant higher MED values posttreatment than men.

We found that patients exhibiting a positive effect of PL had more frequently dark eyes and a lower basal MED. The

multivariable analysis adjusting by age and gender showed that dark eyes and lower basal MED are independent factors to predict a better response to PL.

Therefore, we can conclude that dark-eyed patients and patients with higher UVR sensibility (lower basal MED) would be the most benefited from oral PL treatment. Previous studies have demonstrated that a single dose of orally administered PL decreases UVR-induced damage of human skin.^{10,11} However, the present study pioneers the effect of orally administered PL in patients with high risk to develop MM. Our results are very promising and suggest the need to perform long-term follow-up and long-term administration of PL studies in patients bearing high risk of developing MM.

Acknowledgement

We are indebted to other members of the Melanoma Unit in Hospital Clinic in Barcelona: Lúcia Alós, Ana Arance, Pedro Arguís, Antonio Campo, Teresa Castel, Carlos Conill, Daniel Gabriel, Pablo Iglesias, Jose Palou, Ramon Rull, Marcelo Sánchez, Sergi Vidal-Sicart, Antonio Vilalta, and Ramon Vilella. We are grateful to all the clinicians who sent the patients to our Unit and those patients who kindly agree to participate in the project.

References

- Bataille V. Genetic epidemiology of MM. *Eur J Cancer* 2003; **39**: 1341–1347.
- Bataille V, Winnett A, Sasieni P, Newton Bishop JA, Cuzick J. Exposure to the sun and sunbeds and the risk of cutaneous MM in the UK: a case-control study. *Eur J Cancer* 2004; **40**: 429–435.
- Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW. The incidence of malignant MM in the United States: issues as we approach the 21st century. *J Am Acad Dermatol* 1999; **34**: 839–847.
- Gilchrist B, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of MM induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999; **340**: 1341–1348.
- Naldi L, Imberti GL, Parazzini F, Gallus S, La Vecchia C. Pigmentary traits, modalities of sun reaction, history of sunburns, and melanocytic nevi as risk factors for cutaneous malignant MM in the Italian population. *Cancer* 2000; **88**: 2703–2710.
- Walker SL, Hawk JLM, Young AR. Acute and chronic effects of ultraviolet radiation on the skin. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, eds. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 6th edn. McGraw-Hill Companies Inc, New York, NY, 2003: 1275–1282.
- Horvath A, Alvarado F, Szocs J, de Alvarado ZN, Padilla G. Metabolic effects of calagualine, an antitumoral saponine of *Polypodium leucotomos*. *Nature* 1967; **214**: 1256–1258.
- Alcaraz MV, Pathak MA, Rius F, Kollias N, Gonzalez S. An extract of *Polypodium leucotomos* appears to minimize certain photoaging changes in a hairless albino mouse animal model. A pilot study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1999; **15**: 120–126.
- Zattra E, Coleman C, Arad S et al. *Polypodium leucotomos* extract decreases UV-induced Cox-2 expression and inflammation, enhances DNA repair, and decreases mutagenesis in hairless mice. *Am J Pathol* 2009; **175**: 1952–1261.
- González S, Pathak MA, Cuevas J, Villarrubia VG, Fitzpatrick TB. Topical or Oral treatment of an extract of *Polypodium leucotomos* prevents acute sunburn and psoralen-induced phototoxic reactions as well as depletion of Langerhans cells in human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1997; **13**: 50–60.
- Middelkamp-Hup MA, Pathak MA, Parrado C et al. Oral *Polypodium leucotomos* extract decreases ultraviolet-induced damage of human skin. *J Am Acad Dermatol* 2004; **51**: 910–918.
- Middelkamp-Hup MA, Pathak MA, Parrado C et al. Orally administered *Polypodium leucotomos* extract decreases psoralen-UVA-induced phototoxicity, pigmentation, and damage of human skin. *J Am Acad Dermatol* 2004; **50**: 41–49.
- Villa A, Viera MH, Amini S et al. Decrease of ultraviolet A light-induced 'common deletion' in healthy volunteers after oral *Polypodium leucotomos* extract supplement in a randomized clinical trial. *J Am Acad Dermatol* 2009; **62**: 511–513.
- Nelson AA, Tsao H. MM and genetics. *Clin Dermatol* 2009; **27**: 46–52 (Review).
- Berwick M, Orlow I, Hummer AJ et al. The prevalence of CDKN2A germ-line mutations and relative risk for cutaneous malignant MM: an international population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; **15**: 1520–1525.
- Zuo L, Weger J, Yang Q et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial MM. *Nat Genet* 1996; **12**: 97–99.
- Box NF, Wyeth JR, O'Gorman LE, Martin NG, Stum RA. Characterization of melanocyte-stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 1891–1897.
- Palmer JS, Duffy DL, Box NF et al. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of MM: is the association explained solely by pigmentation phenotype? *Am J Hum Genet* 2000; **66**: 176–186.
- Valverde P, Healy E, Sikkink S et al. The Asp84Glu variant of the melanocortin 1 receptor (MC1R) is associated with MM. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 1663–1666.
- Valverde P, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 1995; **11**: 328–330.
- van der Velden PA, Sandkuijl LA, Bergman W et al. Melanocortin-1 receptor variant R151C modifies MM risk in Dutch families with MM. *Am J Hum Genet* 2001; **69**: 774–779.
- Box NF, Duffy DL, Chen W et al. MC1R genotype modifies risk of MM in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet* 2001; **69**: 765–773.
- Scott MC, Suzuki I, Abdel-Malek ZA. Regulation of the human melanocortin 1 receptor expression in epidermal melanocytes by paracrine and endocrine factors and by ultraviolet radiation. *Pigment Cell Res* 2002; **15**: 433–439.
- Puig S, Malvey J, Badenas C et al. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary MMs. *J Clin Oncol* 2005; **23**: 3043–3051.
- Chaudru V, Laud K, Avril MF et al. Melanocortin-1 receptor (MC1R) gene variants and dysplastic nevi modify penetrance of CDKN2A mutations in French MM-prone pedigrees. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; **14**: 2384–2390.
- Kadekaro AL, Wakamatsu K, Ito S, Abdel-Malek ZA. Cutaneous photoprotection and MM susceptibility: reaching beyond melanin content to the frontiers of DNA repair. *Front Biosci* 2006; **11**: 2157–2173.
- Yang HP, Chen K, Ju M, Chang BZ, Wang LY, Gu H. A study of the way in which dermatologists and photosensitive patients apply sunscreen in China. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2009; **25**: 245–249.
- Szepietowski JC, Nowicka D, Reich A, Melon M. Application of sunscreen preparations among young Polish people. *J Cosmet Dermatol* 2004; **3**: 69–72.
- Gilaberte Y, Gonzalez S. Update on photoprotection. *Actas Dermosifilog* 2010; **101**: 659–672.
- Abdel-Malek ZA, Knittel J, Kadekaro AL, Swope VB, Starner R. The Melanocortin 1 receptor and the UV response of human melanocytes-A shift in paradigm. *Photochem Photobiol* 2008; **84**: 501–508.
- Bishop DT, Demenais F, Iles MM et al. Genome-wide association study identifies three loci associated with melanoma risk. *Nat Genet* 2009; **41**: 920–925.

TRABAJO IV

The presence of red hair MC1R variants enhance MM sun-induced susceptibility in a CDKN2A skin-humanized mouse model of cutaneous familial Melanoma

Maria José Escámez, Paula Aguilera , Joan Anton Puig-Butille, Celia Badenas, Cristina Carrera, Lucía Martínez-Santamaría, Eva García, Sara G Llamas, Josep Malvehy, Joaquín Dopazo, Marcela del Río, Susana Puig.

Submitted data

Objetivo

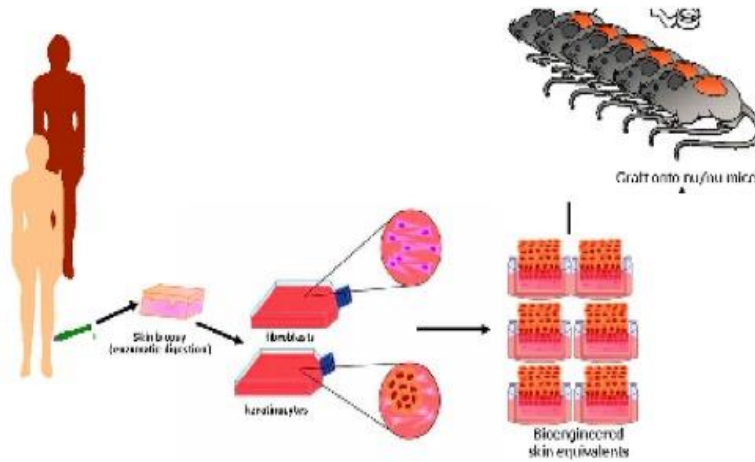
Desarrollar un modelo murino de MM familiar con piel humanizada, mediante trasplante ortotópico de una piel de bioingeniería que contiene queratinocitos, melanocitos y fibroblastos de miembros de dos familias con MM familiar.

Evaluar la contribución de las mutaciones germinales en *CDKN2A* o las variantes *red hair* (RH) en *MC1R* en la respuesta a la RUV.

Metodología

Se tomaron biopsias de piel sana del antebrazo de 4 miembros de dos familias de MM familiar, recreando 4 genotipos distintos basados en el *status* de *CDKN2A* y *MC1R*. Se generaron ratones con piel humanizada mediante el trasplante ortotópico de piel de bioingeniería en la espalda de ratones desnudos inmunodeficientes.

Estos ratones se irradiaron con UVB y se evaluó la repuesta de fotodaño mediante tinciones inmunohistoquímicas de biopsias de la zona irradiada para p16, dímeros de pirimidina (CPD), p53 y s100.



Resultados

La RUV indujo daño en el ADN mediante formación de CPD en la piel derivada de los individuos RHC. La expresión de p53 fue inducida en la piel de los ratones derivados de pacientes *CDKN2A wild type* en los que p53 mantiene su integridad celular y genética. Por otro lado, se observó un déficit de expresión de p53 y p16 en la piel de ratones de pacientes portadores de mutación en *CDKN2A*, lo que resulta en un déficit de reparación de mutaciones inducidas por la RUV (dependientes de p-53). También se observó una falta de expresión de p16 en la piel derivada del individuo RHC y *CDKN2A wild type*.

TITLE: The presence of red hair *MC1R* variants enhance melanoma sun-induced susceptibility in a *CDKN2A* skin-humanized mouse model of cutaneous familial melanoma

Maria José Escámez (1,2,3,4), Paula Aguilera (3,5), Joan Anton Puig-Butille (3,6), Celia Badenas (3,6), Cristina Carrera (3,5), Lucía Martínez-Santamaría (2,1,4), Eva García (2,3,4), Sara G Llames (7,,3,4), Maria Luisa Retamosa (1,3,4), Almudena Holguín (1,3,4), Blanca Duarte (1,3,4), Nuria Illera (1,4), Francisco Garcia-Garcia (8,9), Josep Malvehy (3, 5), Joaquín Dopazo (3,8,9,), Marcela del Río (1, 2 3,4), Susana Puig (3,5).

1 Regenerative Medicine Unit, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Madrid, Spain

2 Department of Bioengineering, Universidad Carlos III de Madrid, Spain

3 Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), Valencia, Spain

4 Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

5 Melanoma Unit, Dermatology Department, Hospital Clinic & IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer).

6. Melanoma Unit, Biochemistry and Molecular Genetics Department, Hospital Clinic & IDIBAPS (Institut d'Investigacions Biomèdiques Agustí Pi i Sunyer).

7 Tissue Engineering Unit, Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias (CCST), Oviedo, Spain

8 Functional Genomics Node, National Institute of Bioinformatics, CIPF Valencia, Spain

9 Department of Bioinformatics, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain

KEY WORDS:

Melanoma prone families, melanoma genetic susceptibility, *CDKN2A*, *MC1R*, photodamage, tissue engineering, skin humanized mouse models.

BACKGROUND

Cutaneous melanoma results from the interaction of environmental factors such as Ultraviolet radiation (UV) and host factors and is the leading world cause of death from skin cancer with increasing incidence rates in Caucasian populations (1). The complexity of the disease has hindered the development of reliable *in vivo* models (2)(3)(4) and the generation of accurate animal models that recreate human cutaneous melanoma remains a priority. Kiowsky *et al.* reported an orthotopic, humanized *in vivo* model by regenerating human skin in immunocompromised rats that were orthotopically grafted with a dermo-epidermal substitute containing keratinocytes and fibroblasts, and artificially mixed with melanocytes from healthy donors or with melanoma cells from patients (5). The main advantage of using humanized orthotopic models is the structural and functional reconstruction of both the physiological/native cellular and parenchyma microenvironment (allowing the native signaling cross-talk involved in melanoma initiation) (5)(6)(7).

Here, we describe the development of an innovative orthotopic humanized *in vivo* model of familial melanoma by grafting dermo-epidermal substitutes containing the natural mixture of keratinocytes, fibroblast and melanocytes obtained from healthy skin of patients from melanoma prone-families. Familial melanoma accounts for 10% of total melanoma cases. High susceptibility germline mutations in *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) are detected in 20-50% of familial melanoma cases and p.G101W is the most recurrent mutation observed in Mediterranean pedigrees(8)(9)(10)(11)(12)(13)(14). The *CDKN2A* locus encodes for p16INK4A and 14ARF proteins by alternative splicing. Both proteins act as tumor suppressors by regulating melanocyte cell cycle progression through the inhibition of the cyclin D1-CDK4 complex and promoting melanocyte apoptosis through a p53-mediated DNA damage response, respectively (15). The *CDKN2A* p.G101W mutation located in exon 2 impacts on both proteins and abolishes their function.

The *MC1R* (melanocortin 1 receptor) gene which is the master regulator of human pigmentation acts as a low-medium penetrance gene in melanoma and non-melanoma skin cancer (16). Certain loss-of function *MC1R* polymorphisms are responsible for the red hair color (RHC) phenotype (red hair, fair skin, poor tanning response and high UV-radiation sensitivity)(17). RHC *MC1R* variants modify the penetrance of *CDKN2A* mutations (18)(19)(20), and modify the clinical appearance of melanomas (21)(22). Under such

genotypic conditions (*CDKN2A* mutation carrier and/or *MC1R* RHC variants carrier), lower doses of discontinuous sun exposure (the major environmental factor involved in the disease) induce the development of nevi associated with a high risk of developing melanoma(23)(9). However, the underlying mechanisms accounting for the high risk observed in *CDKN2A* mutation carriers and/or RHC *MC1R* variants carriers need to be clarified.

QUESTIONS ADDRESSED

To develop a familial melanoma skin-humanized mouse model by orthotopic transplantation of a bioengineered skin containing keratinocyte/melanocytes and fibroblasts from four members of two melanoma-prone families. The study was focused in assess the specific contribution of of *CDKN2A* mutation and/or RHC *MC1R* variants to UVB photoresponse.

EXPERIMENTAL DESIGN

Skin biopsies from non-lesional skin of four members of two melanoma-prone families were obtained, recreating four different genotypic conditions based on *CDKN2A* and *MC1R* status: one p.G101W-*CDKN2A* carrier with 2 red hair color variants (RHV) in *MC1R*, another p.G101W carrier with *MC1R* wild type, one *CDKN2A* wild type with 2 RHV in *MC1R* and one wild type for both *CDKN2A* and *MC1R* (Figure 1A). *CDKN2A* p.G101W carriers were haplo-insufficient (one mutated and one wild-type allele) which is the most frequent condition in familial melanoma. Skin-humanized mice were generated by orthotopic transplantation of bioengineered cutaneous equivalents on the back of immunodeficient nude mice (24) (25). This setting contains human fibroblasts assembled in a fibrin-based matrix as the dermal component and keratinocytes/melanocytes in their native proportion as the epidermal component (26)(27). Human cells from 6mm skin biopsies of 4 individual belonging to the two melanoma prone families were obtained by mechanical and enzymatic digestion. A total of 4 mice were grafted for each genotypic condition. Mature stably regenerated human skin (16 weeks post grafting) were irradiated with a single dose of 3360 J/m² as previously described(28). Photodamage response analysis was performed 24 hours post-irradiation. Non-irradiated skin was used as a basal control. 3mm punch from non-irradiated and 24h post irradiation were obtained and immunohistochemical staining against p16 (1:1, p16 INK4a, Biocare Medical), CPD (mouse monoclonal antibodies 1:1000; H3 clone 4F6, Afitech),

p53 (mouse monoclonal antibodies 1:20; clone DO-7, Dako), and S100 (1:400; polyclonal rabbit anti-S100, Dako) was performed.

RESULTS

After stable engraftment, the skin-humanized mouse model of familial melanoma (Figure 1B, bottom panels) retained donor's pigmentation phenotype (upper panels) as shown by *in vivo* dermoscopy images at 9 weeks post-grafting. Red hair donor skin regenerated on the immunodeficient mice retained the pheomelanin reddish pigmentation pattern (pedigree A). The Eumelanin brownish pigmentation is associated with regenerated skin from donors of pedigree B (Figure 1B).

UV irradiation induced considerable DNA damage by CPD formation in the skin derived from RHC individuals (ind.1 and 2) but also in the skin derived from the wild-type *CDKN2A* and wild-type *MC1R* individual (ind. 4) (Figure 2A). The expression of p53 was induced in *CDKN2A* wild type skin in which p53 maintains its genetic and cellular integrity allowing either CPD repair or apoptosis. In contrast, we observed a lack of p53 and p16 response in skin from *CDKN2A* mutation carriers which results in a deficiency to repair sun-induced mutation (p53-dependent). Lack of p16 responses was also observed in regenerated skin from the RHC individual 2 (Figure 3).

CONCLUSION

MC1R plays a role in the UV-induced p16 expression (29). Thus, RHC *MC1R* variants impact the ability to increase p16 expression and disrupting the UV-induced checkpoint arrest with potential effects on genomic integrity.

Regenerated skin from patient 1 is highly susceptible to accumulating sun-induced mutations (Figure 2B) compared with the other regenerated skins due to a low UV-protection capacity (30) and low UV-induced p16 expression capacity (29) caused by RHC *MC1R* variants; and a reduced capacity to activate p53- and p16-dependent DNA repair pathways caused by a *CDKN2A* mutation. Individual 1 exhibits an accumulation of pheomelanin which has a carcinogenic effect regardless of UV exposure (30). Expression array analyses of the primary skin cell co-cultures used in these bioengineered skins indicate that non functional *MC1R* variants promote DNA damage by intrinsic UV-independent mechanisms(31). The exacerbated amount of eumelanin which protects from CPD may result in the lack of CPD formation observed in skin from individual 3. The deregulation of cell-cycle control in

CDKN2A mutated skin may cause a hyperproliferation of melanocytes resulting in overproduction of eumelanin compared to wild-type *CDKN2A* skin (Figure 2C).

Our familial melanoma model reproduces the physiopathological and mechanistic characteristics of donor's skin in terms of phototype damage and UV-response, recreating the native (non-artificial) environment in which melanoma is initiated in individuals from prone-families. *In vivo* studies of UVB effects on human skin are not recommended by ethical and technical arguments on volunteers (32) and are extremely difficult and limited in cancer-prone patients(33). Thus, the present familial melanoma model acquires particular relevance for studies to test and design preventive therapies focused on UV protection, that is highly effective/recommended in melanoma prone families (34)(35).

In conclusion, our humanized model would be an invaluable tool for investigating the biology of familial melanoma analyzing the interaction between environment and genetic background allowing us to test therapies at the pre-clinical level, including preventive treatments.

Limitations: Individuals from Pedigree B have blue eyes, and this suggest mutation in other pigmentation-related genes that may contribute to the observed differences in the biological responses to UV radiation.

REFERENCES

- 1- Thompson, J.F., Scolyer, R. a & Kefford, R.F. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *Lancet*,2009; 374(9687):362–5.
- 2- Walker GJ, Soyer HP, Terzian T,et. al. Modelling melanoma in mice. *Pigment Cell Melanoma Res*,2011; 24(6):1158–76.
- 3- Larue, L. & Beermann, F. Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment Cell Res*,2007; 20(6):485–97.
- 4- Noonan FP, Dudek J, Merlino G, et.al. Innovative Technology Animal Models of Melanoma: An HGF / SF Transgenic Mouse Model May Facilitate Experimental Access to UV Initiating Events. *Pigment Cell Res*,2003; 16(1):16–25.
- 5- Kiowski G, Biedermann T, Widmer DS,et al. Engineering melanoma progression in a humanized environment in vivo. *J Invest Dermatol*,2012; 132(1):144–53.
- 6- Khavari, P. A. Modelling cancer in human skin tissue. *Nat Rev Cancer*,2006; 6(4):270–80.
- 7- Ma L, Reinhardt F, Pan E, et al.. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol*,2010; 28(4):341–7.
- 8- Ruiz A, Puig S, Malveyh J, et al. CDKN2A mutations in Spanish cutaneous malignant melanoma families and patients with multiple melanomas and other neoplasia. *J Med Genet*,1999;36(6):490–3.
- 9- Puig S, Malveyh J, Badenas C, et al.Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol*,2005: 23(13):3043–51.
- 10- Goldstein AM, Chan M, Harland M, et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet*,2007;44(2):99–106.
- 11- Larre Borges A, Cuéllar F, Puig-Butillé JA, et al. CDKN2A mutations in melanoma families from Uruguay. *Br J Dermatol*,2009;161(3):536–541.
- 12- Graziotin TC, Rey MC, Bica CG, et al. Genetic variations of patients with familial or multiple melanoma in Southern Brazil. *J Eur Acad Dermatol Venereol*,2012; 27(2):e179-85.
- 13- Potrony M, Puig-Butillé JA, Aguilera P, et al.Increased prevalence of lung, breast, and pancreatic cancers in addition to melanoma risk in families bearing the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A mutation: Implications for genetic counseling. *J Am Acad Dermatol*,2014;018702:1–8.
- 14- Ciotti P, Struewing JP, Mantelli M, et al. A single genetic origin for the G101W CDKN2A mutation in 20 melanoma-prone families. *Am J Hum Gen*,2000;67(2):311–9.
- 15- Li J, Poi MJ, Tsai M. The Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor P16INK4A and Relevance to Cancer. *Biochemistry*,2011;50(25):5566-82.
- 16- Bastiaens MT1, ter Huurne JA, Kielich C, et.al. Melanocortin-1 receptor gene variants determine the risk of nonmelanoma skin cancer independently of fair skin and red hair. *Am J Hum Gen*,2001;68(4):884–94.
- 17- Valverde P, Healy E, Jackson I, et.al. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet*,1995;11:328-30.
- 18- Box NF1, Duffy DL, Chen W, et. al. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Gen*,2001;69(4):765–73.
- 19- Goldstein AM, Chaudru V, Ghiorzo P, et al. Cutaneous phenotype and MC1R variants as modifying factors for the development of melanoma in CDKN2A G101W mutation carriers from 4 countries. *Int J Cancr*,2007;121(4):825–31.
- 20- Demenais F, Mohamdi H, Chaudru V, et al. Association of MC1R variants and host phenotypes with melanoma risk in CDKN2A mutation carriers: a GenoMEL study. *J Natl Cancer Inst*,2010;102(20):1568–83.
- 21- Cuéllar F, Puig S, Kolm I, et al.Dermoscopic features of melanomas associated with MC1R variants in Spanish CDKN2A mutation carriers. *Br J Dermatol*,2009;160(1):48–53.
- 22- Carrera C, Palou J, Malveyh J, et. al. Early stages of melanoma on the limbs of high-risk patients: clinical, dermoscopic, reflectance confocal microscopy and histopathological characterization for improved recognition. *Acta Derm Venereol*,2011;91(2):137–146.

- 23- Chaudru V, Laud K, Avril MF, et.al. Melanocortin-1 receptor (MC1R) gene variants and dysplastic nevi modify penetrance of CDKN2A mutations in French melanoma-prone pedigrees. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*,2005;14(10):2384-90.
- 24- Del Rio M, Larcher F, Serrano F, et al. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum Gene Ther*,2002;13(8):959-68.
- 25- García M, Llamas S, García E, et al. In vivo assessment of acute UVB responses in normal and Xeroderma Pigmentosum (XP-C) skin-humanized mouse models. *Am J Pathol*,2010;177(2):865-72.
- 26- Meana A, Iglesias J, Del Rio M, et al. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns*,1998;24(7):621-30.
- 27- Escámez et al., 2011. Bioengineered skin. In: *Skin Biopsy-Perspectives*. Chapter 14. 261-269. InTech Ed. ISBN: 978-953-307-290-6.
- 28- Pavey, S. & Gabrielli, B. α -Melanocyte Stimulating Hormone Potentiates p16 / CDKN2A Expression in Human Skin after Ultraviolet Irradiation. *Cancer Res*,2002; 62(3):875-880.
- 29- Robinson S, Dixon S, August S, et al. Protection against UVR involves MC1R-mediated non-pigmentary and pigmentary mechanisms in vivo. *J Invest Dermatol*,2010;130(7):1904-13.
- 30- Puig-Butille JA, Escámez MJ, Garcia-Garcia F, et. al. Capturing the biological impact of CDKN2A and MC1R genes as an early predisposing event in melanoma and non melanoma skin cancer . *Oncotarget*,2013;5(6):1439-51.
- 31- Carrera C, Puig-Butillè JA, Aguilera P, et. al. Impact of sunscreens on preventing UVR-induced effects in nevi: in vivo study comparing protection using a physical barrier vs sunscreen. *JAMA Dermatol*,2013;149(7):803-13.
- 32- Aguilera P, Carrera C, Puig-Butille J A, et al. Benefits of oral Polypodium Leucotomos extract in MM high-risk patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*,2013;27(9):1095-100.
- 33- Diao, D.Y., Lee, T.K. Sun-protective behaviors in populations at high risk for skin cancer. *Psychol Res and Behav Manag*,2013;7:9-18.
- 34- Glanz K, Volpicelli K, Kanetsky PA, et al. Melanoma genetic testing, counseling, and adherence to skin cancer prevention and detection behaviors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*,2013;22(4):607-14.

FIGURES

Figure 1. A. Genotypic and phenotypic patient description: Two patients from melanoma prone families carrying *CDKN2A* mutation p.G101W in combination with the presence of two RHC variants. A sibling of each patient was selected as a control in order to reduce the effect of genetic variability. **B.** Skin-humanized mice generated by orthotopic transplantation. Melanoma lesions from patient #2 and from a patient carrier of a *CDKN2A* mutation and wild type *MC1R* are shown on upper panels.

Figure 2 and Figure 3. Photo-response to UV-B irradiation. **A.** Immunohistochemical analysis of CPD. Patient 1 is highly susceptible to accumulating sun-induced mutations either because of the defective UV-protection mediated by pheomelanin or because of the mutagenic effect of pheomelanin accumulation. **B.** Immunohistochemical analysis of p53. p53 response is not induced in *CDKN2A* p.G101W carriers independently of their RHC status. **C:** Immunohistochemical analysis of p16 and S100. p16 is only induced after UVB radiation in individual 4 (*CDKN2A* and *MC1R* wild type). p16 is not induced after UVB radiation in *CDKN2A* p.G101W carriers, and interestingly is not induced in individual 2 (*CDKN2A* wild type and p.R160W/p.R151C *MC1R* variants carrier), thus indicating the role of *MC1R* in p16 expression after UVB radiation.

Susceptibilidad a Melanoma: nuevos aspectos clínico-patológicos, desarrollo de herramientas y modelos de estudio y evaluación de medidas preventivas

Pedigree A (2 cases of melanoma in the family)						
Individual	Number of melanoma	<i>CDKN2A</i>	<i>MC1R</i>	Skin Phototype	Eyes Colour	Hair colour
1	5	p.G101W	p.R160W, p.R151C	I	Green	Red
2	0	Wild-type	p.R160W, p.R151C	I	Green	Red
Pedigree B (3 cases of melanoma in the family)						
Individual	Number of melanoma	<i>CDKN2A</i>	<i>MC1R</i>	Skin Phototype	Eyes Colour	Hair colour
3	0	p.G101W	Wild-type	II	Blue	Black
4	0	Wild-type	Wild-type	II	Blue	Brown

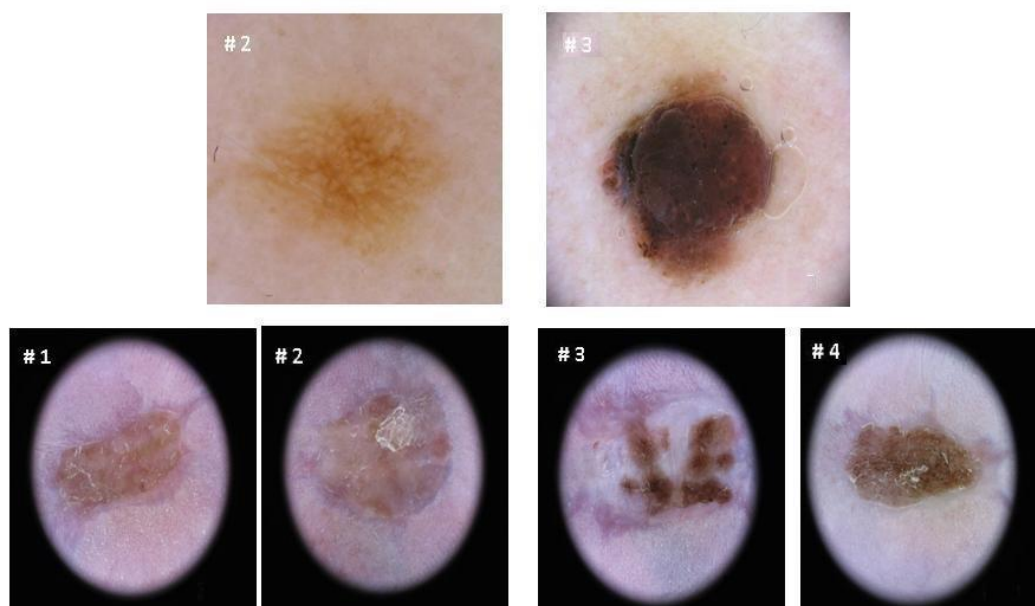
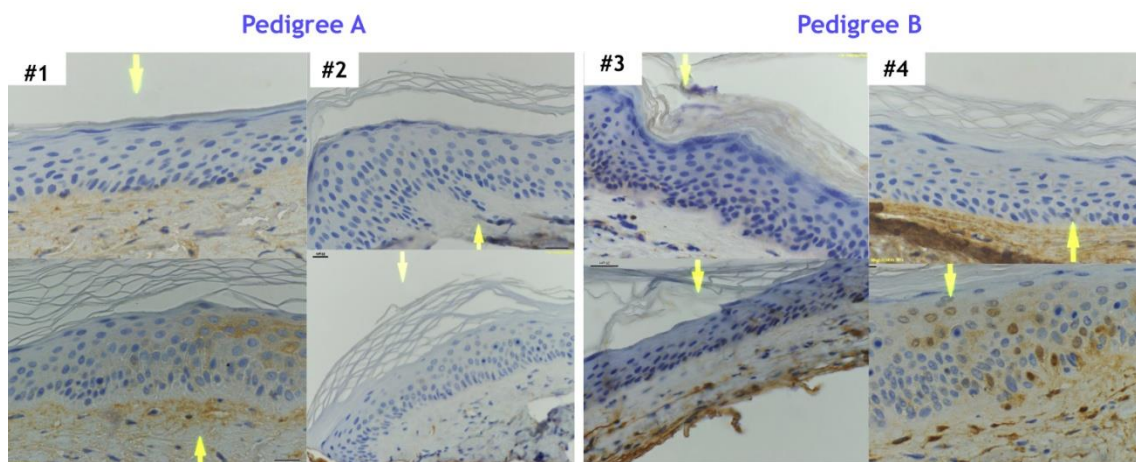
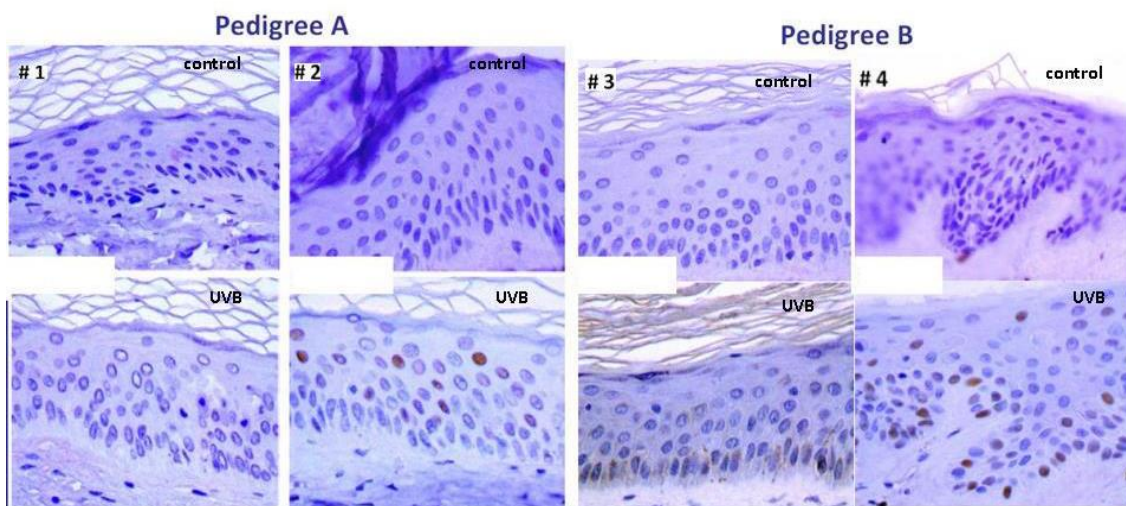
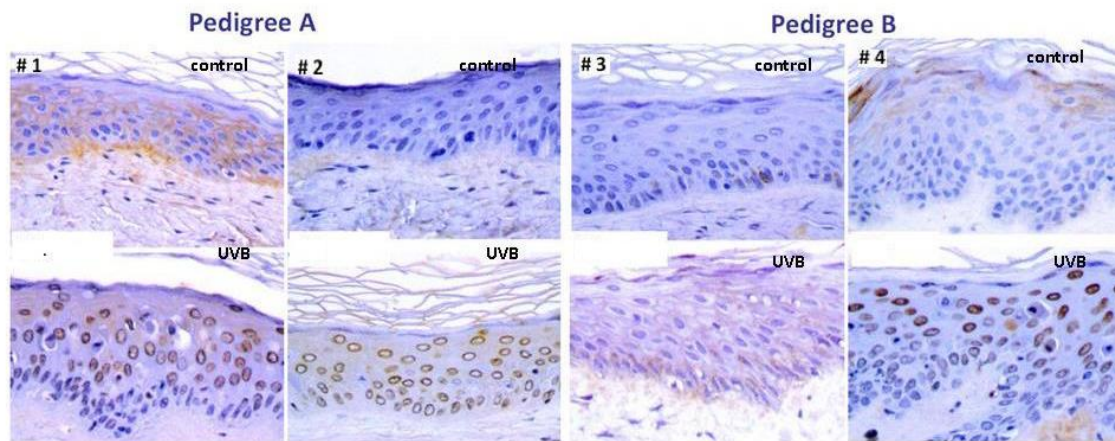


Figure 1. A. Genotypic and phenotypic patient description: Two patients from melanoma prone families carrying *CDKN2A* mutation p.G101W in combination with the presence of two RHC variants. A sibling of each patient was selected as a control in order to reduce the effect of genetic variability. **B.** Skin-humanized mice generated by orthotopic transplantation. Melanoma lesions from patient #2 and from a patient carrier of a *CDKN2A* mutation and wild type *MC1R* are shown on upper panels.



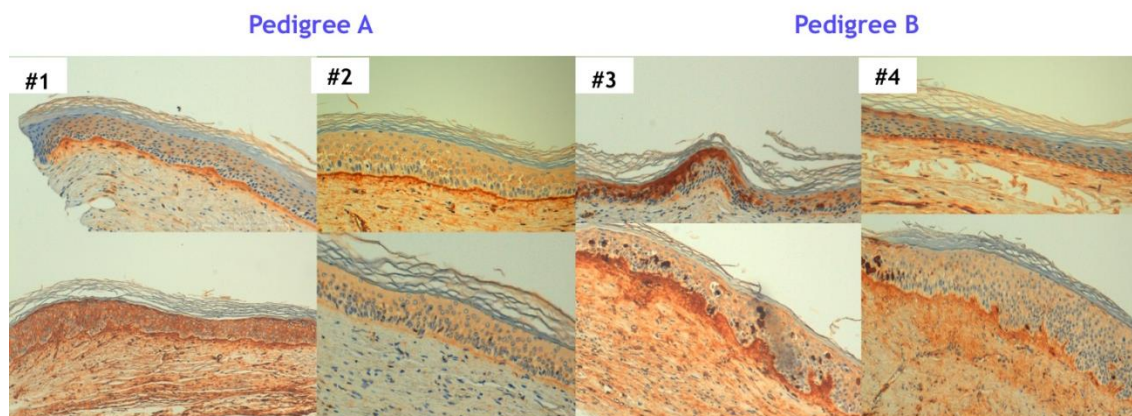


Figure 2 and Figure 3. Photo-response to UV-B irradiation. **A.** Immunohistochemical analysis of CPD. Patient 1 is highly susceptible to accumulating sun-induced mutations either because of the defective UV-protection mediated by pheomelanin or because of the mutagenic effect of pheomelanin accumulation. **B.** Immunohistochemical analysis of p53. p53 response is not induced in *CDKN2A* p.G101W carriers independently of their RHC status. **C:** Immunohistochemical analysis of p16 and S100. p16 is only induced after UVB radiation in individual 4 (*CDKN2A* and *MC1R* wild type). p16 is not induced after UVB radiation in *CDKN2A* p.G101W carriers, and interestingly is not induced in individual 2 (*CDKN2A* wild type and p.R160W/p.R151C *MC1R* variants carrier), thus indicating the role of *MC1R* in p16 expression after UVB radiation.

Pedigree A (2 cases of melanoma in the family)												
Individual	Number of melanoma	CDKN2A	MC1R	p16		S100		CPD		P53		
				Non-irradiated	24h Post-irradiation	Non-irradiated	24h Post-irradiation	Non-irradiated	24h Post-irradiation	Non-irradiated	24h Post-irradiation	
1	5	p.G101W	p.R160W, p.R151C	negative	negative	negative	negative	negative	positive	negative	negative	
2	0	Wild-type	p.R160W, p.R151C	negative	negative	negative	negative	negative	positive	negative	positive	
Pedigree B (3 cases of melanoma in the family)												
Individual	Number of melanoma	CDKN2A	MC1R	p16		S100		CPD		P53		
				Non-irradiated	24h Post-irradiation	Non-irradiated	24h Post-irradiation	Non-irradiated	24h Post-irradiation	Non-irradiated	24h Post-irradiation	
3	0	p.G101W	Wild-type	negative	negative	negative	positive	negative	negative	negative	negative	
4	0	Wild-type	Wild-type	negative	positive (>30%)	>30%	>30%	negative	positive	negative	positive	

DISCUSIÓN

I. MELANOMA EN PACIENTES DE ALTO RIESGO. ESTRATEGIAS DE IDENTIFICACIÓN. NUEVAS APROXIMACIONES PARA SU MEJOR ENTENDIMIENTO Y PREVENCIÓN

- 1.1-Dermatoscopia *Ex vivo* en tumores melanocíticos. Banco de tejidos
- 1.2-Desarrollo de un modelo de Dermatoscopia *Ex vivo* para el correcto muestreo del MM. Validación y utilidad

II. ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN PRIMARIA Y SECUNDARIA EN PACIENTES DE ALTO RIESGO

- 2.1-Characterización clínica, histológica e inmunohistoquímica del MM familiar
- 2.2-Impacto de la RUV en el riesgo genético a MM
- 2.3-Necesidad de estrategias específicas de prevención primaria
- 2.4-Refuerzo de las estrategias de prevención primaria en pacientes de riesgo

III. FOTOCARCINOGENESIS. MÁS ALLÁ DE LA PIGMENTACIÓN

- 3.1-De las vías de pigmentación a estrategias de prevención
- 3.2-Validación y utilidad de un modelo murino de MM familiar

MM EN PACIENTES DE ALTO RIESGO. ESTRATEGIAS DE IDENTIFICACIÓN. NUEVAS APROXIMACIONES PARA SU MEJOR ENTENDIMIENTO Y PREVENCIÓN.

1. Dermatoscopia *Ex vivo* en tumores melanocíticos. Biobanco de tejidos

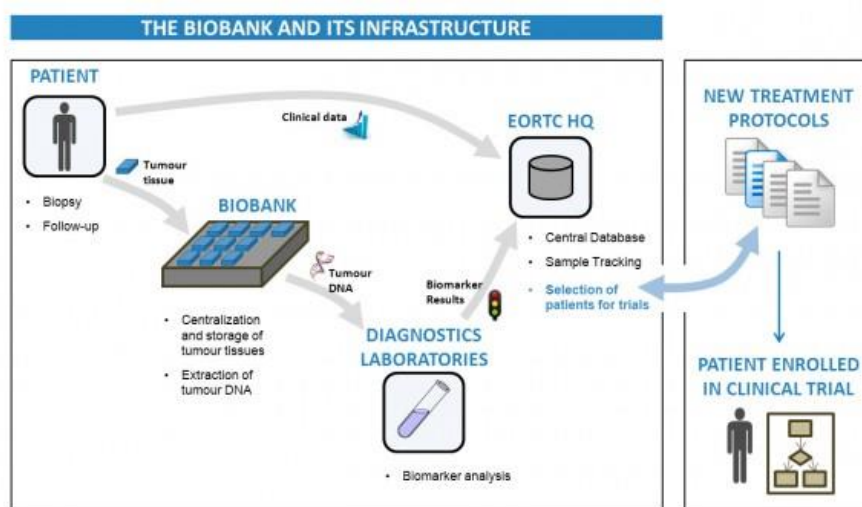
En la era de la biología molecular y de las terapias diana dirigidas contra el cáncer, la investigación traslacional para identificar nuevas dianas terapéuticas en el MM ofrece nuevas oportunidades para potenciales nuevos tratamientos. En los próximos años es posible que nuestros pacientes con MM no nos pregunten sobre su pronóstico y supervivencia estimada, sino sobre si su MM es o no es un MM *BRAF* mutado. Mientras que esta pregunta tiene una respuesta realizando el test de Cobas® 4800 *BRAF* V600 (Roche) en muestras en parafina, hay cada vez una necesidad mayor de tener tejido tumoral congelado para los estudios moleculares y genéticos que podrían estar disponibles en el día en que hipotéticamente este tumor primario metastatice(132).

Después de décadas de estancamiento, las terapias diana y la inmunoterapia han mejorado de forma sustancial los resultados en el tratamiento del MM metastásico. El tratamiento combinado con inhibidores de *BRAF* y *MEK* alcanza tasas de respuesta del 70%, con una supervivencia libre de progresión de aproximadamente 10 meses(133). La disponibilidad de distintos y prometedores enfoques terapéuticos demanda a su vez el hallazgo de biomarcadores predictivos que nos permitan estratificar mejor a los pacientes y decidir un tratamiento más adecuado. Para las terapias diana, la presencia de mutaciones en *BRAF* o *NRAS* apoya el uso como primera intervención, de un inhibidor de *BRAF* y *MEK*, tratamiento combinado o tratamiento en monoterapia con un inhibidor de *MEK*. De todas formas, para optimizar los tratamientos y prevenir resistencias, debería considerarse el estudio de otras mutaciones. En un futuro próximo, la secuenciación de genes diana debería estar disponible para la mayoría de

Susceptibilidad a Melanoma: nuevos aspectos clínico-patológicos, desarrollo de herramientas y modelos de estudio y evaluación de medidas preventivas

pacientes. A medida que el conocimiento de la progresión del MM se vuelva más complejo, las bases de datos genéticas jugarán un papel cada vez más primordial en las estrategias de estratificación de pacientes y en el desarrollo de nuevas terapias. Esta visión a nivel molecular del tumor va a permitir la posesión de valiosa información acerca del tumor que nos proporcionará unas bases racionales para tomar decisiones terapéuticas individuales, facilitando un abordaje multidimensional de precisión. Como muchos pacientes con MM a los que se les extirpa un tumor en el día de hoy metastatizarán en 5-20 años, los tumores primarios preservados a día de hoy tienen ya una enorme relevancia para el propio paciente. Así pues, todos los centros académicos deberían tener un biobanco e intentar recoger muestras de estos tumores primarios para los biobancos centralizados(134).

Estas muestras de biobanco se están utilizando cada vez más como recurso principal por los investigadores, para acceder a material único del paciente para investigación y tratamiento. En cuanto a los métodos de obtención y almacenamiento de las muestras, todavía no hay un consenso en cuánto a cuáles son los protocolos a seguir en este sentido.

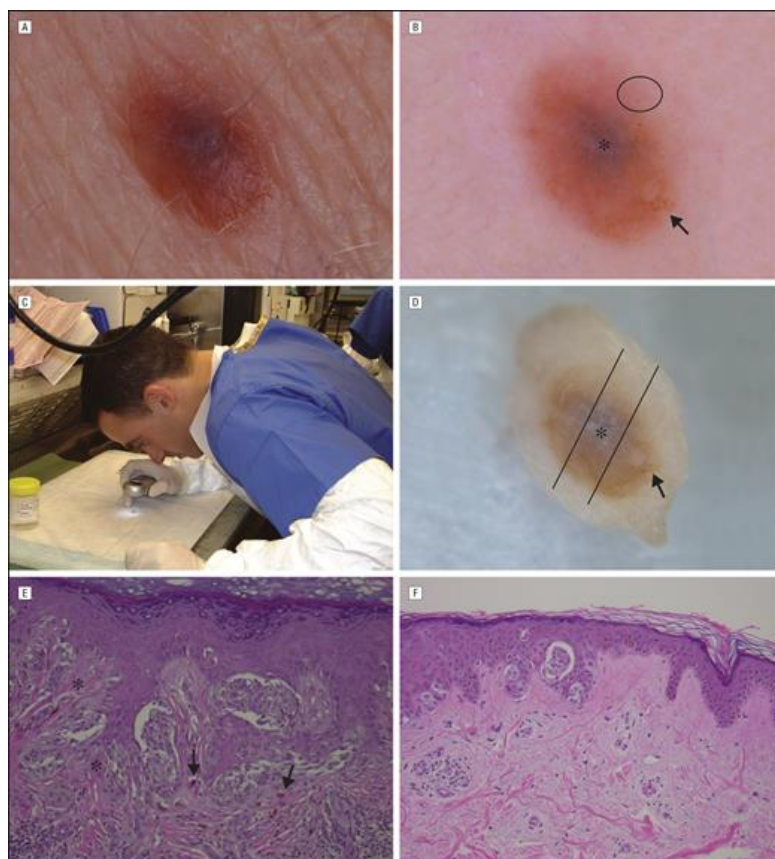


Adaptado de EORTC

Todo este esfuerzo en encontrar un consenso en cuestiones como el procedimiento de muestreo, el manejo y almacenamiento de las muestras, las estructuras de almacenaje y el método de identificación de muestras va dirigido al final a conseguir metas que reviertan en un beneficio para el paciente.

La estandarización del método de obtención de muestras, así como del resto de procesos implicados en el correcto almacenaje y procesamiento de la muestra son puntos clave que forman parte también del proceso global de investigación trasaccional, orientado al final a identificar nuevos biomarcadores diagnósticos o nuevas dianas terapéuticas(135).

La necesidad de establecer un protocolo estandarizado de recogida de muestras en fresco de MM para estos fines antes mencionados, ha propiciado nuestro primer trabajo. Pensamos en la dermatoscopia *ex vivo* como herramienta diagnóstica en nuestro modelo ya que en 2013 Scope y colaboradores (136) señalaron esta técnica diagnóstica como una ayuda en el momento de dirigir a los patólogos y /o a los técnicos de laboratorio en el correcto procesamiento y corte de las muestras para diagnóstico. Estos autores reportaban la necesidad de una herramienta que permitiera una correcta orientación y corte del tumor a modo de evitar discordancias entre los hallazgos clínicos, dermatoscópicos e histopatológicos, que podrían atribuirse a errores en el muestreo en el laboratorio de patología. Los autores proponen la dermatoscopia *ex vivo* como una herramienta en los laboratorios de patología para guiar las secciones en patología macroscópica, basándose en hallazgos previos que demuestran una correlación entre estructuras dermatoscópicas y hallazgos anatomopatológicos(139).



Adaptado de Scope A y colaboradores. Ex Vivo Dermoscopy of Melanocytic Tumors. Arch Dermatol. 2007, 143(12), pp.1548-1552.

Ellos demuestran mediante la evaluación de 2MM y 4 nevus displásicos la concordancia de las estructuras dermatoscópicas *in vivo* y *ex vivo* (retículo pigmentado, globulos y proyecciones), no siendo así con la presencia de vascularización, que no se hacía evidente en las imágenes de dermatoscopia *ex vivo*. La necesidad de establecer un protocolo estandarizado de recogida de muestras para biobanco y la demostración de la utilidad de la dermatoscopia en tejidos ya extirpados nos llevó a la realización del primer trabajo.

2. Desarrollo de un modelo de dermatoscopia *ex vivo* para el correcto muestreo del MM. Validación y utilidad.

Atendiendo a las necesidades expuestas en el punto anterior, hemos desarrollado un modelo de muestreo de tejidos mediante dermatoscopia *ex vivo*.

La técnica ha sido validada por una parte con 10 tumores en los que las muestras obtenidas no han sido criopreservadas sino que han sido procesadas para su estudio histopatológico y en los que se ha podido comprobar que en ningún caso la muestra obtenida correspondía a la parte más profunda del tumor. Por otra parte hemos validado la técnica estableciendo una correlación entre observadores independientes y se ha obtenido una muy buena correlación (>93%) en cuanto a la localización del área más profunda tumoral y una muy buena concordancia ($\kappa > 0.8$) en la categorización del patrón dermatoscópico global, la presencia de colores y estructuras dermatoscópicas, lo que ha permitido preservar en todos los casos utilizados para la validación el área de máximo índice de Breslow intacta para el correcto diagnóstico histopatológico.

Table 3. Correlation of Dermoscopic Colors and Structures Between In Vivo and Ex Vivo Dermoscopic Images

Variable	κ Statistic	Spearman Rank Correlation Coefficient	Pearson Product Moment Correlation <i>R</i>	<i>P</i> Value
No. of colors	Not applicable	0.768	0.845	<.001
Asymmetry	0.837	0.838	0.838	<.001
Light brown	0.838	0.850	0.850	<.001
Dark brown	0.959	0.960	0.960	<.001
Black	0.975	0.975	0.975	<.001
Blue	0.930	0.933	0.933	<.001
Gray	0.909	0.910	0.910	<.001
Red	0.171	0.264	0.264	.01
Pink	0.107	0.237	0.237	.03
White	0.933	0.935	0.935	<.001
Atypical pigment network	0.943	0.943	0.943	<.001
Dots and globules	0.662	0.703	0.703	<.001
Atypical dots and globules	0.883	0.889	0.889	<.001
Regression structures	0.838	0.844	0.844	<.001
Streaks	1 [Reference]	1 [Reference]	1 [Reference]	<.001
Atypical streaks	0.930	0.930	0.930	<.001
Blotches	1 [Reference]	1 [Reference]	1 [Reference]	<.001
Atypical blotches	0.930	0.931	0.931	<.001
Blue-white veil	0.908	0.908	0.908	<.001
Atypical vessels	0.170	0.304	0.304	.004

Igual que en el estudio previo de Scope y colaboradores, nuestro trabajo confirma que se trata de una técnica válida para la observación de estructuras dermatoscópicas *ex vivo* que nos permitan mapear el tumor con fines de realizar un correcto muestreo.

Si el estudio de Scope y colaboradores introducía la dermatoscopia *ex vivo* como herramienta para guiar el procesamiento de las muestras en patología, nuestro estudio introduce el uso de la dermatoscopia *ex vivo* como herramienta para guiar el muestreo tumoral. A continuación detallamos el protocolo establecido para la obtención de muestras para biobanco:

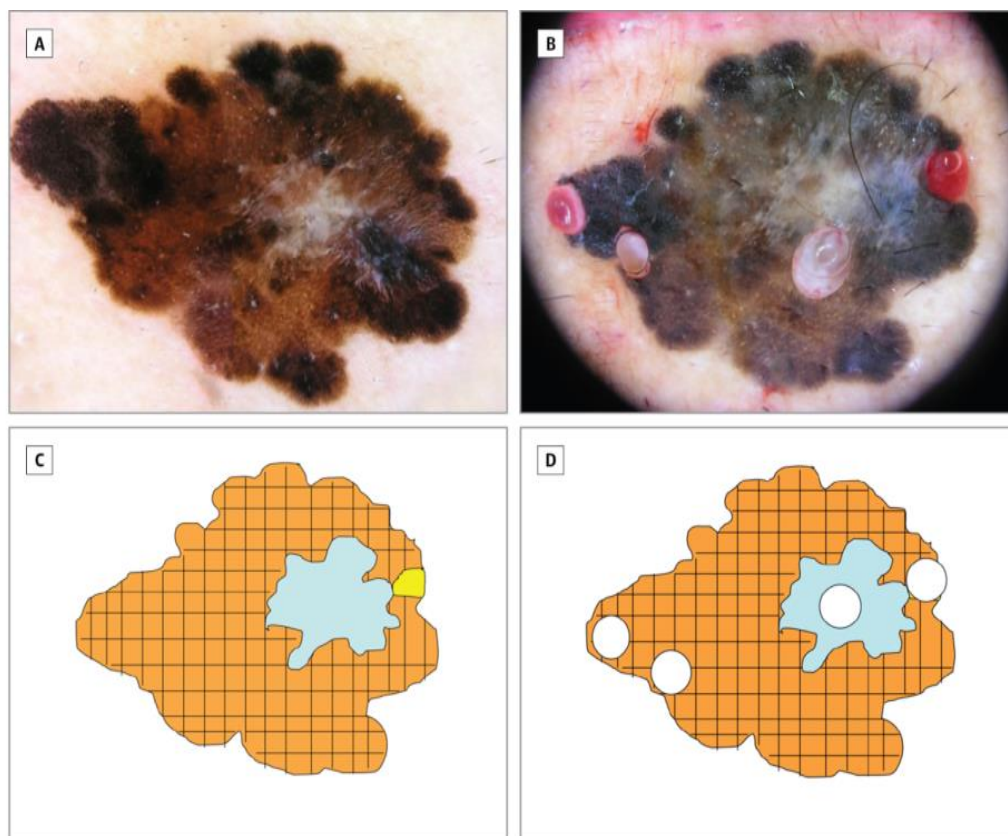
Protocolo de dermatoscopia *ex vivo* para el muestreo tumoral

DOS-M (Dermoscopy-oriented sampling of MM)

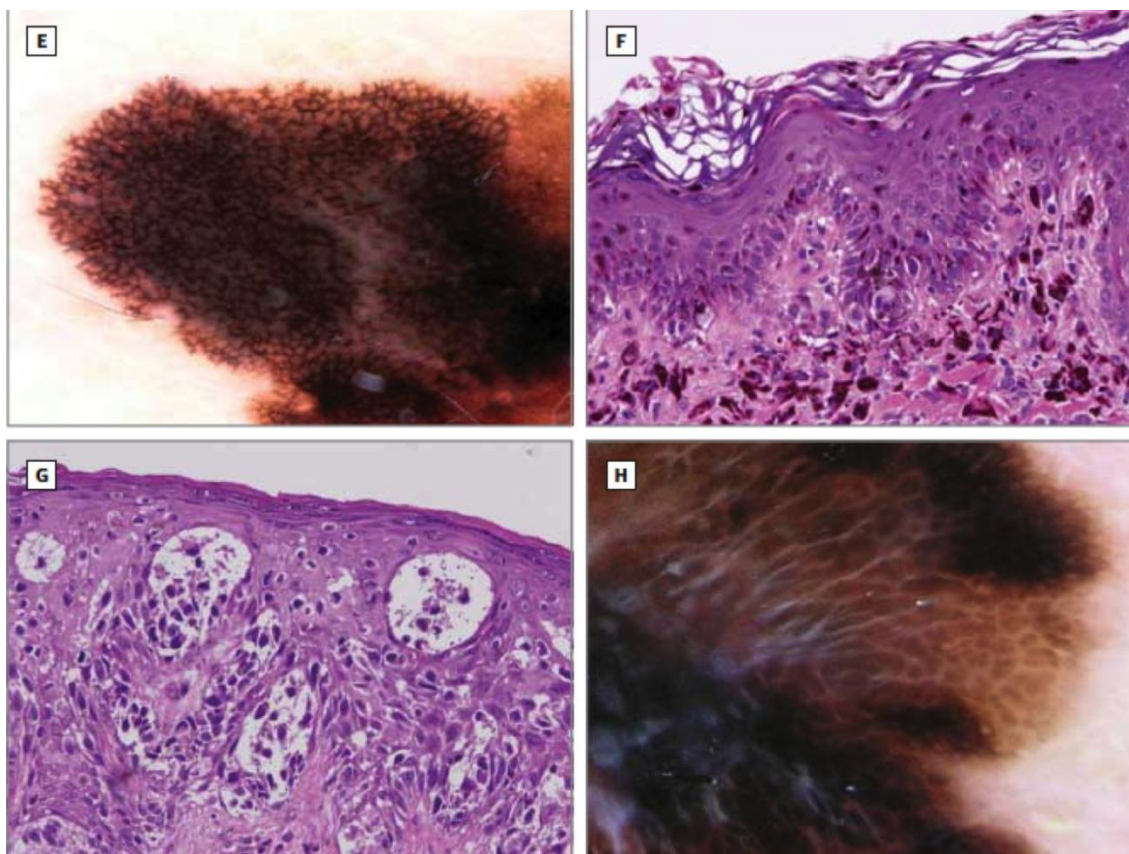
1. Todas las lesiones son evaluadas mediante dermatoscopia previa cirugía (dermatoscopia *in vivo*).
2. Las lesiones son extirpadas con el margen adecuado.
3. Utilización de la dermatoscopia *ex vivo* para la identificación de las áreas de interés identificadas previamente mediante dermatoscopia *in vivo*.

Muestreo del tumor para biobanco.

4. Envío del tumor para diagnóstico histopatológico.
5. Criopreservación de las muestras para biobanco a -80°C.
6. Discusión de los casos con los patólogos.



Nuestro estudio valida una vez más la reproducibilidad de los criterios dermatoscópicos para inferir el índice de invasión tumoral. Así, las áreas con retículo pigmentado traducirán la presencia de células melanocíticas en la epidermis o dermis superficial, la presencia de glóbulos atípicos traducirá la presencia de nidos de células melanocíticas atípicas en dermis o unión dermo-epidérmica, la presencia de velo azul que se corresponda con un área clínicamente palpable se corresponderá a un nódulo de crecimiento vertical, mientras que si se corresponde con un área clínicamente plana se corresponderá con un área de regresión.



Correlación dermatoscopia-histopatología. E-F: el retículo pigmentado atípico corresponde a la proliferación de melanocitos atípicos en la unión dermoepidérmica, con hiperplasia melanocítica lentiginosa. G-H: la presencia de glóbulos atípicos se corresponde con la proliferación de nidos de melanocitos atípicos en la unión dermoepidérmica.

Actualmente y según nuestro punto de vista, este protocolo debería restringirse a centros con experiencia en investigación y en dermatoscopia, con el fin de asegurar un diagnóstico y estadiaje preciso para el paciente.

En la aplicación de este protocolo queremos remarcar los siguientes puntos:

1-Las muestras deberían obtenerse de áreas que no interfieran con el correcto diagnóstico histopatológico.

2-No deberían obtenerse muestras de tumores que se prevea que van a ser difíciles de diagnosticar o en los que la totalidad del tumor sea necesaria para un correcto diagnóstico (lesiones dudosas, MM sobre nevus, lesiones con extensa regresión).

3-No se deberían tomar muestras de MM de pequeño tamaño; recomendamos un mínimo de 10mm de diámetro, pues la toma de muestras de tumores de menor tamaño podría complicar un correcto estudio del tumor.

Como subrayan Soyer y colaboradores (132) nuestro protocolo de muestreo mediante dermatoscopia *ex vivo* excluye los MM de pequeño tamaño, las lesiones dermatoscópicamente dudosas y otras lesiones en las que se prevea que el diagnóstico histopatológico va a ser difícil. Es una limitación importante puesto que las lesiones de diagnóstico incierto van a ser lesiones en las que nos va a interesar disponer de material en fresco tanto por si eventualmente el tumor de pronóstico incierto metastatiza en un futuro, como para comprender mejor la patogénesis de estas lesiones. Estos autores han diseñado unos micropunch submilimétricos que permiten un muestreo mínimamente invasivo y sin necesidad de sutura, que permite extraer unos 1500 queratinocitos y entre 5 y 10 ng de ADN y ARN para estudios moleculares(138). Estos micropunch podrían ser una opción para obtención de muestras para biobanco en estos casos de lesiones dudosas, difíciles o de pequeño tamaño en las que se pretende conservar el máximo de tejido posible, utilizando igualmente la dermatoscopia *ex vivo* como herramienta de guía. Con la amplificación del ADN obtenido y técnicas de secuenciación genómica masiva al alcance de los centros de referencia, podría crearse un biobanco virtual. Ello permitiría tener acceso abierto a datos de microbioma, viroma, genoma, transcriptoma, y zona no codificante del RNA y relacionarlos con los datos clínicos y dermatoscópicos.

Como resultado de todo ello podríamos obtener un perfil molecular asociado a una determinada morfología dermatoscópica, una imagen de perfil molecular, que nos permitiría inferir las características moleculares del tumor con tan solo la imagen dermatoscópica. En esta línea existen ya algunos trabajos que han asociado características dermatoscópicas con ciertos perfiles moleculares, como el trabajo de

Pozzobon y colaboradores (139), en el que los autores asocian algunas características dermatoscópicas como la regresión en forma de pigmentación granular azul-gris y la presencia de ulceración con MM con mutaciones en *BRAF* o *NRAS*. La asociación de perfiles moleculares a perfiles clínicos y/o dermatoscópicos es una importante herramienta en un futuro en el que se están desarrollando nuevas terapias diana frente al MM y para las que puede ser preciso el rápido diagnóstico molecular previo al inicio de un tratamiento. El conocimiento a simple vista o mediante dermatoscopia de estos detalles moleculares del tumor, pueden ser de gran ventaja para el paciente en casos de necesitar un rápido inicio del tratamiento o de no disponer de muestra para realizar estudios moleculares.

En este sentido hemos desarrollado nuestro segundo trabajo, en un intento de caracterizar clínica, histológica e inmunohistoquímicamente los MM familiares, intentando por un lado describir alguna característica histológica o inmunohistoquímica que permita reconocer y diferenciar estos tumores, e intentar identificar características clínicas, histológicas o inmunohistoquímicas que dentro de este subgrupo de MM de buen pronóstico, puedan identificar aquellos que van a tener un peor pronóstico. En nuestro trabajo nos guiamos mediante el microscopio óptico y la observación histológica para seleccionar las áreas tumorales a incluir en el TMA, pero pensamos que la dermatoscopia *ex vivo* es una herramienta válida para seleccionar las áreas tumorales que deseamos incluir en un TMA.

ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN PRIMARIA Y SECUNDARIA EN PACIENTES DE ALTO RIESGO

1. Caracterización clínica, histológica e inmunohistoquímica del MM familiar

En la prevención primaria y secundaria del MM en pacientes de alto riesgo debemos tener en cuenta la identificación de factores individuales de riesgo a MM y un correcto seguimiento de estos pacientes. Los pacientes pertenecientes al grupo de MM familiar tienen un riesgo muy incrementado de desarrollar MM, especialmente si son portadores de mutaciones en genes de alta penetrancia o si presentan otros factores asociados(140). La identificación de estos pacientes es por tanto crucial para realizar un correcto seguimiento con el fin de realizar una correcta prevención secundaria y esto ha motivado el estudio y caracterización de este subgrupo de tumores pertenecientes a pacientes con MM familiar. Varios estudios, igual que el nuestro, han reportado un mejor pronóstico de los MM diagnosticados dentro del contexto de MM familiar(141)(142), mientras que otros no han encontrado ninguna asociación con el índice de Breslow. En el reciente trabajo del grupo del GEM (Grupo Español Multidisciplinar de Melanoma)(145) los hallazgos apuntan a que el MM familiar tiene un mejor pronóstico, con menor índice de Breslow, menor número de mitosis y una tendencia a menor número de tumores con ganglios positivos. De todas formas, dos claves que describen estos autores en su trabajo, sumado al hecho de que estos hallazgos no son significativos en el análisis multivariante, ponen en duda o podrían rechazar la teoría de que este subgrupo de MM tenga un mejor pronóstico. Primero, el 68.1% de los pacientes con MM familiar refirieron el diagnóstico de MM posterior al de un familiar, lo que podría indicar una mayor preocupación y mayor nivel de alerta en estos pacientes. En segundo lugar, los pacientes con MM familiar reportaron mayor número de quemaduras solares en la infancia que los pacientes con MM esporádico (podría ser debido a un sesgo de memoria en pacientes que están más alerta y más concienciados acerca del MM).

Se ha reportado también que el tumor del caso índice en una familia es significativamente más grueso que los sucesivos(141), lo que podría deberse a un mayor control de los pacientes que ya se conoce que pertenecen a familias de riesgo. En nuestra serie, en cambio, no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en el índice de Breslow en el grupo de MM familiar dependiendo de si el paciente era el caso índice o no, indicando que los tumores diagnosticados en estos pacientes incluso antes de saber de su condición de MM familiar siguen siendo delgados. Esto va a favor de la hipótesis de que los tumores pertenecientes a este subgrupo, por sus alteraciones genéticas germinales pueden tener un mejor pronóstico. Por otro lado, aunque no es estadísticamente significativo, sí que encontramos una tendencia a que los tumores diagnosticados en los pacientes sucesivos al caso índice son más delgados y más frecuentemente del tipo *in situ* (este último dato siendo estadísticamente significativo), lo que nos remarca la importancia del seguimiento de estos pacientes y familiares(97). En nuestro trabajo hemos corroborado que los pacientes con MM familiar tienen menor índice de Breslow (1.22 *versus* 2.35 mm, $p < 0.05$) y mayor porcentaje de MM *in situ* (35.5% *versus* 19.7%) que los pacientes con MM esporádico. Aunque parece que este subgrupo de MM tienen un mejor pronóstico y las estrategias de detección precoz deben continuar aún más en este grupo de riesgo, los clínicos debemos tener en cuenta que los MM delgados contribuyen sustancialmente a la mortalidad global por MM, a pesar de su pronóstico favorable (101)(102) y es por este motivo que dirigimos nuestro estudio a la identificación de características clínicas e histológicas de estos tumores delgados que nos permitan por un lado identificar aquellos que tendrán un peor pronóstico y por otro expandir el conocimiento de las características clínicas e histológicas de estos MM familiares, lo que nos aportará no sólo información útil para los clínicos sino que también puede arrojar un poco de luz en la compleja relación entre los factores genéticos y ambientales en el MM.

Nosotros hemos encontrado que los pacientes con MM familiar y los pacientes con MM familiar y mutación en *CDKN2A* tienen una menor edad de debut. Se ha reportado previamente en varios estudios una menor edad de debut en estos pacientes, y se debate en qué medida ello se debe a una mayor alerta en estos pacientes o realmente una menor edad de debut de la enfermedad por predisposición genética. Un estudio reporta la mediana de edad de 33 años en pacientes con mutación en *CDKN2A*, 41 años para pacientes con MM familiar no portadores de mutación y 53 años en la población general. En nuestra serie, la media de edad de debut en pacientes con mutación en *CDKN2A* fue de 37.71 años, 44.26 años en pacientes con MM familiar sin mutación conocida y 56.87 años en la población general.

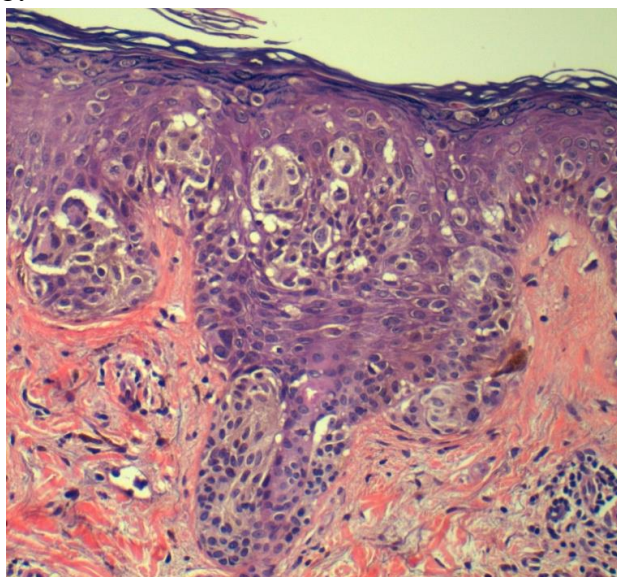
En concordancia con otros trabajos hemos encontrado también en el grupo de MM familiares un riesgo incrementado de MM múltiple y una mayor frecuencia de MM *in situ* y de MM de extensión superficial (MMES). En nuestra serie, el 82.3% de los tumores de MM familiar eran del tipo de extensión superficial versus en 61.4% de los esporádicos, $p < 0.05$, y el 100% de los casos de MM familiar portadores de mutación en *CDKN2A*, $p < 0.05$. Ya se ha reportado anteriormente esta proporción incrementada de MMES en el grupo de MM familiar (20)(141). Se ha sugerido que esto podría deberse a que una gran proporción de MM en pacientes con MM familiar se producirían sobre nevus, ya que el MM familiar se asocia a un mayor número de nevus y los MM sobre nevus son mayoritariamente del tipo de MMES. Los resultados obtenidos en nuestro estudio están de acuerdo con dicha hipótesis, ya que hemos encontrado una mayor proporción de MMES en el grupo de MM familiares y con mutación en p16 así como un mayor número de nevus, pero no se ha analizado qué proporción de estos MM eran sobre nevus.

En los casos de cáncer de mama hereditario, las características histopatológicas son distintas que en los casos esporádicos(144), por este motivo ya en 2002 Mäsback y colaboradores (142) reportaron por primera vez las características histopatológicas

de los MM asociados a mutación en *CDKN2A*. Estos autores encontraron que los MM familiares tenían un menor nivel de invasión de Clark, y menor regresión histológica e infiltrado inflamatorio.

De las características histológicas evaluadas en nuestra serie solamente hemos encontrado diferencias significativas en la mayor proporción de células grandes y redondas en los tumores pertenecientes a portadores de mutación en *CDKN2A* (35.3% versus 4.3%, $p < 0.05$) (Figura 4) y en un mayor índice mitótico en los MM esporádicos respecto a los MM familiares (con mutación en *CDKN2A* y *wild type*), $p < 0.05$. La presencia de invasión pagetoide por melanocitos atípicos grandes y redondos ya fue observado por Carrera y colaboradores (122) en un subgrupo de MM incipientes de extremidades inferiores con un patrón dermatoscópico caracterizado por un retículo pigmentado prominente. El 37% y el 12% de estos tumores eran MM familiar y MM múltiple, respectivamente. Es cierto que no todos los MM con mutación en *CDKN2A* presentan esta característica histopatológica, y probablemente esté asociada a otros factores añadidos, pero creemos que es un hallazgo que cuando se observa al microscopio debería de hacernos pensar que podríamos encontrarnos ante este grupo de lesiones.

Figura 4: Proliferación de melanocitos atípicos, grandes y redondos, en solitario o formando nidos.



La mayor frecuencia de MM en extremidades inferiores en pacientes con MM familiar y en portadores de mutación en *CDKN2A*, estaría de acuerdo con el trabajo de los mismos autores que observan que un elevado porcentaje de los melanomas incipientes de extremidades inferiores pertenecen a casos familiares (122). Estos autores describen un grupo de MM incipientes cuyas características histopatológicas son la presencia de invasión pagetoide de la epidermis por células grandes redondas y atípicas, hallazgo similar al que encontramos en nuestros casos de MM p-16 mutados. En nuestra serie no hemos detectado ningún caso de MM con mutación en *CDKN2A* localizado en cabeza y cuello, y solamente en un 6.5% de los MM familiares (independientemente del estatus mutacional), este dato estaría en desacuerdo con el hallazgo de Mäsback y colaboradores que encuentran que la localización del MM en cabeza y cuello es el factor más fuertemente asociado con MM con mutación en *CDKN2A* en el análisis univariante(142). Otros estudios han encontrado una relación entre la localización del MM en áreas fotoexpuestas como cabeza y cuello y la presencia de variantes no funcionales de *MC1R* (147).

Nuestro resultado, refuerza la teoría de que los MM en los pacientes con una carga hereditaria (mutaciones en genes de alta penetrancia) seguirían vías independientes de la RUV, así es justificable el hecho de no encontrar tumores localizados en áreas de exposición solar crónica; mientras que en el caso de los MM en portadores de polimorfismos en *MC1R*, su mayor localización en áreas expuestas podría justificarse bien por la acción de la RUV sobre un receptor disfuncional o bien por vías independientes pero sumatorias de riesgo.

En un estudio caso-control reciente de GenoMel (148) se compararon las características histopatológicas de MM esporádicos (n=81) con casos de MM familiar con mutación en *CDKN2A* (n=123) y sin mutación en *CDKN2A* (n=120) . Los autores querían corroborar el hallazgo encontrado en estudios previos que reportaban una sobrerrepresentación de MMES en el grupo de MM familiar. En este trabajo se valúan

28 características histológicas y permitieron corroborar que los MM de pacientes portadores de mutación en *CDKN2A* tienden a tener características histológicas de MMES, incluyendo una mayor pigmentación y una mayor invasión pagetoide, así como un mayor TILs (infiltrado inflamatorio). El hallazgo de una mayor invasión pagetoide tuvo una mayor significación estadística cuando comparaban el grupo de portadores de mutación en *CDKN2A* versus el grupo de no portadores + MM esporádicos. La invasión pagetoide es una característica ya conocida del MMES, y este hallazgo estaría en concordancia con nuestro hallazgo de mayor frecuencia de células grandes y redondas en la epidermis de MM en portadores de mutación en *CDKN2A*.

Estos autores encuentran también como buen predictor del estatus mutacional el subtipo celular del área de crecimiento vertical del tumor. Así, encuentran que de los 15 casos con células fusiformes formando la fase invasiva del tumor, ninguno era en portadores de mutación en *CDKN2A*, siendo por tanto un criterio histológico de exclusión de mutación en *CDKN2A*. Encuentran también que los casos de MM familiar en portadores de mutación en *CDKN2A* tienen un mayor TILs, lo que podría indicar que estos tumores son más inmunógenos.

Adaptado de Sargen et.al. J Am Acad Dermatol 2015

CDKN2A-Positive vs. CDKN2A-Negative

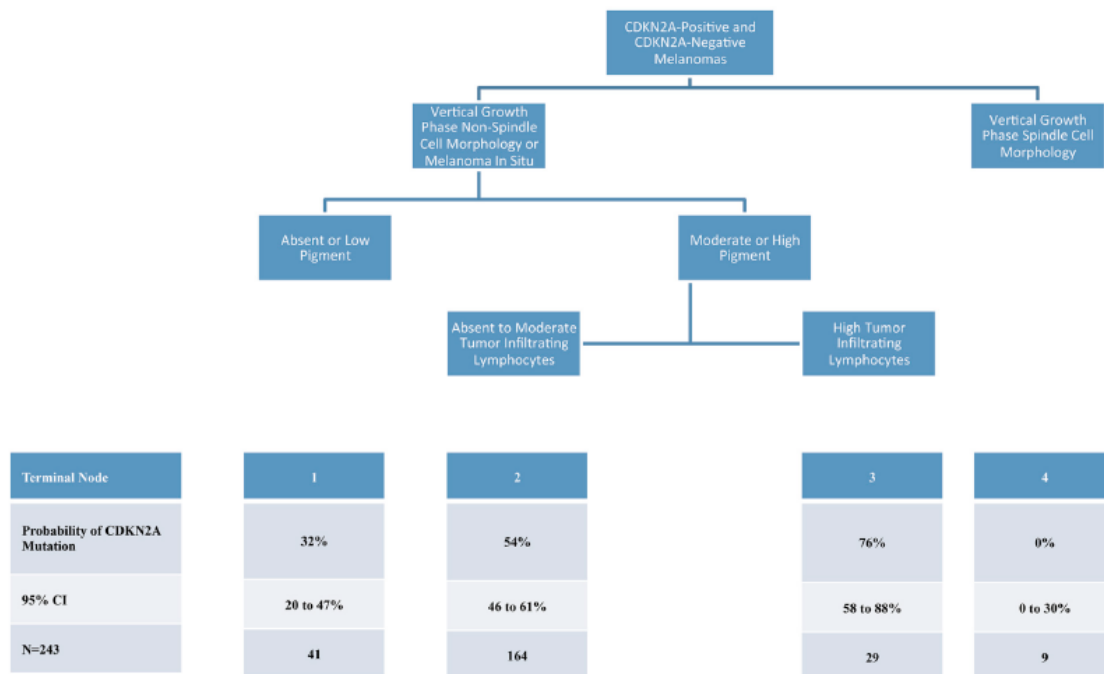


Fig 1. Classification and regression tree for familial melanomas with (N = 123) and without (N = 120) CDKN2A mutations. The probability (%) of a CDKN2A mutation, its 95% confidence limits (CI), and the number of cases for each terminal node are reported in the table beneath the figure.

En el modelo comparativo de MM esporádico con MM en portadores de mutación en CDKN2A los autores observan que los MM con mutación en CDKN2A tienen un menor grado de atipia celular en la fase de crecimiento vertical, así como un menor índice mitótico. En nuestra serie también hemos observado que los MM familiares tienen un menor índice mitótico que los MM esporádicos, lo que podría estar en relación a una mayor vigilancia de estos pacientes, o bien ser una característica intrínseca de este tipo de tumores.

Recientemente el grupo del GEM publica un trabajo multicéntrico de caracterización del MM familiar en nuestro país (145). Encuentran una frecuencia del 6.6% de MM familiar teniendo sólo en cuenta la presencia de 2 ó más casos de MM en familiares de primer grado (69 pacientes de MM familiar de un total de 1047 pacientes analizados). En el análisis univariante encuentran que un índice de Breslow <1mm,

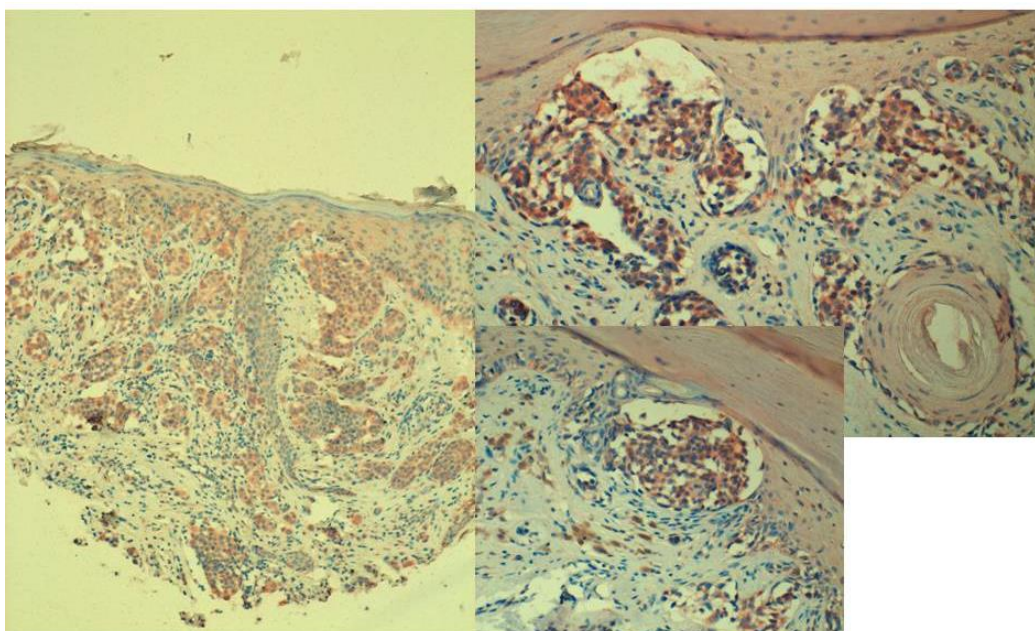
índice mitótico negativo, MM múltiple e historia de quemaduras solares en la infancia son más frecuentes en el grupo de MM familiar, pero en el análisis multivariante no encuentran que los pacientes con MM familiar tengan ninguna diferencia clínica o patológica respecto a los pacientes con MM esporádico.

Otro estudio realizado por el grupo de Nagore y colaboradores (147) evalúa las características histológicas de los MM en función de las variantes en *MC1R* y no encuentran diferencias significativas entre el grupo con funcionalidad del receptor y los grupos con un deterioro funcional.

En cuanto a la caracterización inmunohistoquímica hemos encontrado una mayor expresión de Survivina citoplasmática en los MM familiares (83.9% vs 70.1%) $p=0.05$ y en los portadores de mutación en *CDKN2A* (93.8% vs 72.7%) $p=0.05$, característica que se mantiene en el análisis multivariante en los tumores de portadores de mutación.

Piras y colaboradores estudiaron por primera vez la positividad por Survivina en MM teniendo en cuenta su localización celular y encontraron que la tinción nuclear era un importante marcador de supervivencia, mientras que no encontraron diferencias en cuanto a la reactividad citoplasmática(146). En nuestra serie la positividad nuclear para Survivina no fue un marcador de peor supervivencia, ello podría explicarse por una selección de tumores, ya que Piras y colaboradores seleccionaron para su estudio MM con un componente de crecimiento vertical, probablemente con peor pronóstico. Ding y colaboradores (147) estudiaron el valor diagnóstico de la Survivina diferenciando MM de nevus y encontraron una expresión citoplasmática muy variable en todo el espectro de las lesiones melanocíticas, con expresión nuclear solamente detectable en MM. En nuestro trabajo hemos encontrado un porcentaje similar de positividad nuclear que estos autores (24%) pero no hemos sido capaces de demostrar diferencias en cuanto a subtipo de tumores o en pronóstico. Similar a nuestros resultados, estos autores encuentran expresión de Survivina citoplasmática en todo el espectro de lesiones melanocíticas. Si bien nuestros resultados apuntan a

diferencias estadísticamente significativas en cuanto a una mayor expresión en los MM familiares y portadores de mutación, el porcentaje de positividad en los MM esporádicos es también elevado. Vetter y colaboradores(148) encuentran que la Survivina citoplasmática se expresa principalmente en MM metastásico. La pérdida somática de p16 ocurre en la mayoría de los MM y esto acelera la melanomagénesis. El hecho que Vetter y colaboradores hayan encontrado Survivina citoplasmática principalmente asociada a MM metastásico podría estar relacionado con la pérdida de p16 en estos tumores, y esto estaría en acuerdo con nuestro hallazgo de que los MM con mutación germinal en p16 (que podrían añadir una mutación somática en el otro alelo) expresarían Survivina citoplasmática. El índice de Breslow medio en estos tumores con mutación germinal en p16 y positividad citoplasmática para Survivina fue 0.8mm, no fue posible evaluar la Survivina como marcador pronóstico en este set de pacientes ya que ninguno falleció ni desarrolló metástasis durante el tiempo de seguimiento.



MMES. Tinción positiva para Survivina citoplasmática

La sobreexpresión de Aurora A, una serina / treonina kinasa implicada en la formación del huso mitótico, la separación centrosómica y la transición G2-M en el

ciclo celular, se ha observado en MM (149), y su inhibición se ha visto que disminuye la habilidad migratoria de las células de MM(150). Observamos expresión de Aurora A en el 54.8% de los tumores, sin encontrar diferencias entre grupos. Aunque encontramos una tendencia a que los MM más invasivos expresaban más Aurora, un porcentaje elevado de los MM delgados también la expresan. Teniendo en cuenta que nuestros hallazgos evidencian que, independientemente del índice de Breslow, los tumores que expresan Aurora A tienen una peor supervivencia, la positividad para Aurora A podría ser un marcador inmunohistoquímico de mal pronóstico en MM delgados (datos pendientes de publicar). Este es un resultado interesante que abre un campo de debate hacia la importancia de este marcador como posible indicador de mal pronóstico en MM delgados y como posible diana terapéutica. Los inhibidores de AurkA ya se han demostrado eficaces en potenciar el efecto de los inhibidores de BRAF y MEK en el tratamiento del MM(154).

Nuestros resultados en el grupo de MM familiar y el grupo de portadores de mutación en p16 están en acuerdo con la mayor susceptibilidad hereditaria, que asocia: (1) una menor edad de debut; (2) mayor riesgo de MM múltiple; (3) menor índice de Breslow y mayor proporción de MM *in situ*; (4) mayor porcentaje de tumores con invasión pagetoide por células grandes y redondas y (5) una mayor proporción de tumores que expresan Survivina citoplasmática.

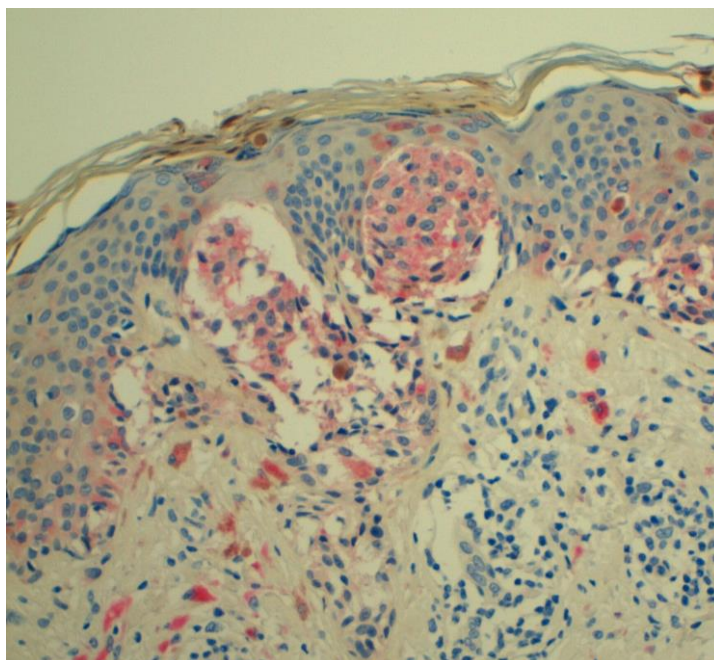
Nagore y colaboradores (20) encuentran además en este grupo de pacientes una ausencia de daño actínico en el área del MM. Este hallazgo puede indicar que las alteraciones genéticas favorecen una menor necesidad de daño producido por la RUV para producir MM, de acuerdo con nuestros resultados en que no hemos encontrado tumores de este grupo localizados en cabeza y cuello. En estos pacientes, el elevado riesgo inherente asociado a mutaciones en *CDKN2A* es capaz por si solo de producir MM independientemente de la RUV. La suma de otros factores de riesgo en estos

pacientes ya de alto riesgo, como la exposición a la RUV o polimorfismos en el gen *MC1R* incrementan más este riesgo.

Nuestros resultados están de acuerdo con la hipótesis de que existen el menos dos vías para la patogénesis del MM propuesta por Whiteman y colaboradores (152): (1) una asociada a un mayor número de nevus, exposición solar intermitente, menor edad de debut y localización en tronco (vía asociada a nevus) y (2) una vía asociada a exposición solar crónica, menor número de nevus, mayor edad de debut, y localización en cabeza y cuello (vía asociada a RUV). En nuestra serie de MM familiares y portadores de mutación en p16, el mayor número de nevus, la mayor proporción de MMES y porcentaje bajo de MM lentiginoso y la menor frecuencia de tumores localizados en cabeza y cuello (ninguno de los casos de pacientes portadores de mutación en p16) sugiere que en estos pacientes los MM se desarrollarían siguiendo la vía de los nevus.

El estudio clínico histopatológico e inmunohistoquímico de una serie de tumores de MM familiar y MM en portadores de mutación en *CDKN2A* nos ha permitido corroborar hallazgos ya reportados previamente en otras poblaciones y hemos aportado nuevos hallazgos histopatológicos como la presencia de invasión pagetoide por células redondas grandes y un menor índice mitótico, e inmunohistoquímicos como la expresión citoplasmática de Survivina en estos tumores.

Aunque no característico del MM familiar hemos encontrado que la expresión de Aurora A en MM delgados podría estar asociado a peor pronóstico en estos tumores (datos pendientes de publicar). Pensamos que en un futuro, la aplicación de la dermatoscopia *ex vivo* para la selección de las áreas tumorales a incluir en el TMA podría permitirnos una mejor selección de muestras y una mejor caracterización histopatológica de estos grupos de tumores que nos permita encontrar mayores diferencias en este sentido. En nuestro estudio no fue posible la aplicación de esta técnica al tratarse de un estudio retrospectivo de lesiones ya extirpadas.



MMES. Tinción positiva para Aurora A

Estos hallazgos en un futuro podrían ayudar a esclarecer la compleja interacción entre genética y ambiente en la patogénesis de MM. El mejor conocimiento de las características clínicas e histopatológicas de este subgrupo de tumores de pacientes de riesgo es una información de vital importancia para el clínico y para el patólogo debido a la importancia y muchas veces a la dificultad en el diagnóstico de lesiones incipientes en estos pacientes. La validación de estas características propias clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas pueden ser de gran ayuda para el clínico para determinar a qué pacientes ofrecer un estudio genético.

La prevención secundaria es el principal objetivo en estos pacientes de alto riesgo pertenecientes al grupo de MM familiar. Todos los criterios que nos faciliten la identificación de lesiones incipientes y la asociación con pronóstico son de gran importancia especialmente en este grupo de pacientes.

Análisis multivariante. Características asociadas al MM familiar

Variables	Univariante			Multivariante		
	P	OR	95% CI	P	OR	95% CI
Edad de debut	0.0000		7.226-18.004	0.000	1.036	1.017-1.055
Breslow	0.021		0.169-2.025	0.049	1.288	1.013-1.683
MM <i>in situ</i>	0.018	1.662	1.111-2.485	0.015	2.645	1.211-5.778

Análisis multivariante. Características asociadas al MM de pacientes con mutación en CDKN2A

Variables	Univariante			Multivariante			
	P	OR	95% CI	P	OR	95% CI	
Edad de debut	0.000		8.567-24.402	0.007	1.060	1.016-1.105	
MM <i>in situ</i>	0.002	4.348	1.756-10.765	0.003	6.961	1.895-25.567	
MM Múltiple	0.000	6.910	2.727-17.513	0.001	8.920	2.399-33.166	
survivina citoplasmática	+	0.052	0.197	0.027-1.447	0.049	9.072	1.025-85.010

2- Impacto de la RUV en el riesgo genético a MM

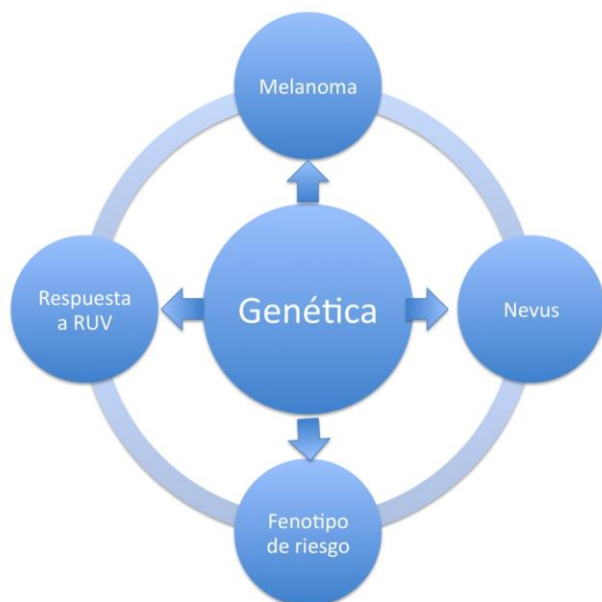
Aproximadamente el 10% de los MM diagnosticados en nuestra área pertenecen al grupo de MM familiar o MM hereditario, causado por un riesgo inherente del individuo debido a mutaciones en genes de susceptibilidad a MM. Los genes de alta penetrancia serían susceptibles de producir MM independientemente de factores exógenos como la RUV, mientras que mutaciones en genes de media o baja penetrancia necesitan de la asociación de otros factores de riesgo, siendo el más frecuente en nuestra población la exposición a la RUV. Existen dos grandes grupos de genes implicados en la susceptibilidad a MM y ambos estarían influenciados o modulados por la RUV recibida. Se distinguirían dos “endofenotipos”; los genes relacionados con las vías de pigmentación y daño solar, y por otro los genes implicados en nevogenidad que predispondrían al desarrollo de lesiones melanocíticas benignas y también a MM.

En nuestro segundo trabajo, a pesar de ser pacientes de alto riesgo, observamos que el 87.5% de pacientes de MM familiar refieren historia de quemaduras solares y un 45% una exposición solar intensa antes de los 18 años. El grupo del GEM reporta que el 77.3% de los pacientes con MM familiar han sufrido quemaduras solares en la

infancia. En el grupo de pacientes incluidos en nuestro tercer trabajo observamos un porcentaje no despreciable de pacientes con al menos un factor de riesgo fenotípico: 56% de los pacientes tenían un fototipo I-II, 36.2% ojos claros, 24.1% pelo rojo o rubio (10.3% pelo rojo) y el 53.5% acumulaban fotodaño en forma de léntigos actínicos. El 69% de los pacientes estudiados eran portadores de variantes funcionales en el gen *MC1R*. Todos estos datos nos indican que esta población de riesgo inherente, portadora de mutaciones en genes de alta (*CDKN2A*), mediana (*MC1R*) y baja penetrancia (otros genes de pigmentación, nevocénesis), está sometida a un factor de riesgo adicional, la RUV. Como ya se ha publicado previamente y cuantificado en el metanálisis del 2010 (120), los polimorfismos de *MC1R* incrementan más aun el riesgo de los pacientes ya portadores de mutaciones en *CDKN2A*, es decir la susceptibilidad genética se puede potenciar por vías diferentes. Atendiendo a la necesidad de comprender mejor esta interacción entre la RUV y genes de susceptibilidad hemos estudiado el efecto de la RUV en estos genotipos de riesgo, mediante un modelo murino de MM familiar que hemos validado en el cuarto trabajo (*submitted data*), y por otra parte establecido posibles estrategias complementarias de prevención primaria en estos grupos de riesgo.

La utilidad de las medidas de prevención primaria se basa en las evidencias de que la interacción de la RUV y los factores genéticos de cada individuo, no sólo influye en el riesgo directo a MM fotoinducido, sino que de forma indirecta, modula el fenotipo, el desarrollo de nevus melanocíticos, la presencia de daño actínico acumulado, y estas interacciones pueden potenciarse entre ellas.

INTERACCIÓN GENÉTICA-RUV-MELANOMA



3- Necesidad de estrategias específicas en prevención primaria

Según la *American Cancer Society* de EEUU se estima que 1 de cada 55 mujeres y 1 de cada 36 hombres serán diagnosticados de MM invasivo a lo largo de su vida(3). De forma muy significativa sigue incrementándose entre mujeres jóvenes, siendo la causa más frecuente de cáncer en mujeres de entre 20 y 29 años, y la segunda en población menor de 40 años de edad. Los recientes datos publicados por Vries (153) apoyan el hecho de que una correcta fotoprotección laboral y vacacional en Europa reduciría el cáncer cutáneo en un 45% en el 2050. Sin embargo, más del 70% de adultos jóvenes reconocen realizar exposición solar intencionada, sobre todo mujeres jóvenes, siendo cada vez más preocupante la cifra de adolescentes que utilizan dispositivos de bronceado artificial. En países como Australia, Francia, Alemania o países nórdicos se estima que entre el 10-35% de la población los utiliza. Más del 85% de todos ellos utilizan fotoprotectores tópicos de forma habitual y refieren conocer las medidas adecuadas de fotoprotección(154).

En población general se sabe que sigue existiendo una falta de conciencia sobre las dosis que se reciben de RUV, el daño solar y riesgo de cáncer cutáneo que conlleva. La información y educación sobre hábitos saludables probablemente será por tanto la primera estrategia a revisar. Un estudio realizado en daneses calcula que un ciudadano de fototipo claro, que pasa 6 días de vacaciones en las Islas Canarias recibe 57 veces su dosis mínima de eritema (DEM), lo que llegaría a suponer un 43% de la RUV anual acumulada en tan solo 6 días(155).

Si tenemos en cuenta que en estos pacientes con susceptibilidad hereditaria a MM existe también, aunque en menor medida, esta falta de concienciación sobre el riesgo añadido que supone la RUV, y la evidencia que aportan diversos estudios sobre al mala aplicación de la fotoprotección tópica(85) parece evidente la necesidad de implementar factores de protección adicionales para reforzar las estrategias de prevención primaria.

4- Refuerzo de las estrategias de prevención primaria en pacientes de riesgo

Atendiendo a la necesidad expresada anteriormente de reforzar las estrategias de prevención primaria, en los últimos años se han investigado diversas sustancias que, administradas de forma oral, pueden tener propiedades de mejorar la capacidad de protección natural frente a la RUV, tanto mediante neutralización del daño oxidativo como favoreciendo los mecanismos de reparación. El *Polypodium Leucotomos* (PL) es un helecho tropical que ha sido utilizado ampliamente para el tratamiento de enfermedades inflamatorias por los nativos Americanos. El extracto de PL, aplicado de forma tópica o administrado vía oral, ha demostrado tener propiedades beneficiosas. La administración en ratones disminuye los parámetros de fotodaño derivados de la RUVB y disminuye la incidencia de MM y cáncer de piel no MM inducido por la RUVB(156). Además, el extracto de PL activa p53, inhibe la expresión de Cox-2 inducida por la RUV, reduce la inflamación y favorece la eliminación de

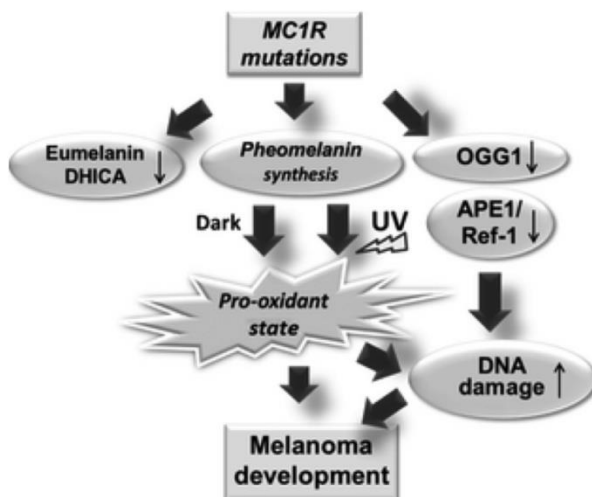
fotoproductos, y reduce el daño oxidativo en el ADN(156). Estos efectos beneficiosos se han atribuido a los componentes fenólicos del PL que incluyen ácido clorogénico, ácido cumarínico, ácido vanílico y especialmente los potentes inhibidores de la oxidación, ácido cafeico y ferúlico. Middelkamp y colaboradores (92) comprobaron en 9 pacientes sanos la eficacia de una dosis única de extracto de PL en el aumento de la DEM, la disminución del número de *sunburn cells* y de dímeros de pirimidina.

Una reciente revisión de la literatura sobre las propiedades fotoprotectoras del PL (161) demuestra que el extracto de PL posee varios efectos potencialmente beneficiosos y actúa mediante la protección del daño tisular y la limitación de la respuesta inflamatoria. El suplemento de PL reduce la respuesta inflamatoria inducida por la RUV, acelera el aclaramiento de fotoproductos (CPDs), disminuye las mutaciones oxidativas en el ADN mediadas por RUV y ha demostrado efectos protectores frente al fotoenvejecimiento y frente a la fototoxicidad inducida por PUVA.

Efecto Protector	Nivel Celular / Molecular
Anti-inflamatorio	Reducción infiltrado macrofágico y neutrofílico inducido RUV Inhibición expresión Cox-2 inducida RUV Bloqueo TNF α , iNOS, AP-1, NF- κ B
Disminución mutagénesis ADN	Activación de p53 Aclaramiento de fotoproductos y prevención de la formación de CPDs Estimula el sistema antioxidante natural
Inmunoregulación	Preserva las células de Langerhans y su función Bloquea la fotoisomerización y fotodescomposición del ácido trans-Urocánico
Ciclo celular e integridad celular	Preserva la viabilidad celular e inhibe el desorden en el citoesqueleto Inhibe las metaloproteinasas de la matriz celular

Debido a las propiedades descritas del extracto de PL en inducir la expresión de p53 y disminuir el daño oxidativo, pensamos que sería una buena opción para nuestro grupo de pacientes (n=61, 25 con MM familiar y/o MM múltiple) muchos de ellos portadores de polimorfismos en *MC1R* (n=38) y de mutaciones germinales en *CDKN2A* (n=9). Uno de los efectos que hemos podido observar en el modelo murino de MM familiar (trabajo 4) es que los individuos portadores de mutación en *CDKN2A* no inducen p53 ni p16 como respuesta a la RUV, y los portadores de variantes RHC en *MC1R* no inducen p16 en respuesta a la radiación ultravioleta. Además de esta vía de daño oxidativo producido en respuesta a RUV, se sabe que las variantes RHC son responsables de la generación de daño oxidativo independiente de la RUV(158). Por este motivo pensamos que el extracto de PL, con propiedades antioxidantes y capaz de incrementar la expresión de p53, podría ser de utilidad en estos pacientes.

Pheomelanin-induced oxidative stress: bright and dark chemistry bridging red hair phenotype and melanoma



Pigment Cell & Melanoma Research
Volume 27, Issue 5, pages 721-733, 6 JUN 2014 DOI: 10.1111/pcmr.12262
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/pcmr.12262/full#pcmr12262-fig-0001>

En un estudio reciente, Peña-Vilabelda y colaboradores estudian las características clínicas de los pacientes con MM en función de las variantes en *MC1R* (147). Estos autores encuentran que las características clínicas del MM en la población española varían de acuerdo con el nivel de deterioro funcional de la síntesis de melanina, determinada por los polimorfismos en *MC1R*. El fenotipo claro y abundantes efélides, la presencia de léntigos solares y nevus melanocíticos atípicos fueron más frecuentes a mayor deterioro funcional del receptor. También observan que un mayor deterioro funcional está asociado a una menor edad de debut del MM, desarrollo en áreas crónicamente expuestas y en pacientes con historia de quemaduras solares graves. Estos datos proporcionan una vez más evidencia de la necesidad de estrategias de prevención dirigidas a los portadores de estas variantes.

La población de nuestro estudio fue una población de riesgo de 61 individuos (n=25 con MM familiar y/o múltiple, n=20 con MM esporádico y n=16 con Síndrome de Nevus Displásico). Además, un porcentaje no despreciable de estos pacientes mostraban algún fenotipo de riesgo: 56.1% tenían fototipo I-II, 36.2% ojos claros, 24.1% pelo rubio o rojo y 53.5% tenían signos de daño solar crónico en forma de léntigos actínicos.

La DEM basal de nuestra serie se mantuvo dentro de los límites de normalidad descritos por fototipo (DEM 0.124 ± 0.04 J/cm²)(159), encontrando una DEM mayor en las mujeres (p<0.05) y en el grupo de pacientes con MM familiar. Este último dato reforzaría la teoría que la patogénesis del MM en los individuos portadores de genes de susceptibilidad, es menos dependiente de los efectos de la RUV. De todas formas, en estos pacientes con un riesgo constitutivo elevado, la adición de cualquier factor de riesgo, especialmente la RUV, puede comportar un incremento importante del riesgo. Observamos también una tendencia a una menor DEM en los pacientes con polimorfismos de pelo rojo en *MC1R*, lo que es de esperar teniendo en cuenta que estos individuos no producen eumelanina en cantidades adecuadas. Este es el primer

trabajo que demuestra el efecto de un posible fotoprotector sistémico en pacientes de alto riesgo. Se escogió la pauta de dosis total de 1080mg (240mg cada 8 horas el día antes y 360mg 3 horas antes) basada en estudios previos(92). La eficacia y seguridad del PL en humanos han sido evaluados en pocos estudios. Middelkamp y colaboradores demostraron sus efectos fotoprotectores en voluntarios sanos después de una dosis aguda de PL durante 2 días(92). En otro estudio se demostró la capacidad protectora frente al daño en el ADN producida por la RUVa tras dosis de 240mg 8horas y 2horas antes de la exposición(160). El nuestro es el primer estudio que evalúa la eficacia del PL en pacientes de riesgo a desarrollar MM. Nestor y colaboradores en un estudio reciente (161) evalúan la eficacia y seguridad del extracto de PL tras un tratamiento de 240mg dos veces al día durante 60 días en términos de incremento de la DEM y encuentran que el tratamiento es eficaz y bien tolerado en pacientes sanos. Aunque no había diferencias significativas intergrupo en el número de horas de exposición solar antes o durante el estudio, los individuos en el grupo placebo mostraron una mayor tendencia de experimentar uno o más episodios de quemadura solar durante el estudio (2 sujetos vs. 8 sujetos; $p=0.04$). A día 28, los pacientes tratados con extracto de PL mostraron una mayor tendencia a una DEM incrementada comparado con los sujetos del grupo placebo (8 sujetos vs. 1 sujeto; $p=0.01$). Los individuos en el grupo de PL también mostraron una tendencia a tener una menor intensidad de eritema inducido por RUV comparado con el grupo placebo (10 sujetos vs 3 sujetos; $p<0.01$). En este trabajo también encuentran que las mujeres tratadas con PL muestran una mayor tendencia a presentar una disminución en la intensidad del eritema en comparación con los varones a los 28 días de tratamiento (9 sujetos vs. 1 sujeto) y un hallazgo similar fue observado en cuanto al incremento del DEM (7 sujetos vs. 1 sujeto), no pudiéndose calcular la significación estadística debido a que solamente había 2 varones en el grupo de PL.

Los resultados de nuestro trabajo muestran que el PL es eficaz en producir un incremento de la DEM en la mayoría de nuestros pacientes (n=40, 65%). Una de las limitaciones de este trabajo es que no disponemos de evaluación histopatológica ni inmunohistoquímica que confirmen una disminución de daño producido por la RUV. Poseemos un dato indirecto que es la disminución del eritema, causado también por la actividad antiinflamatoria del PL.

Un dato interesante de nuestro trabajo es que observamos una tendencia a un mayor beneficio del tratamiento en los pacientes con MM familiar y en los portadores de mutación en *CDKN2A* y/o *MC1R*. Teniendo en cuenta que son los pacientes con un mayor riesgo intrínseco, es un resultado prometedor que sean este grupo de pacientes los que más se beneficien del tratamiento. Del total de los 61 pacientes 21 (35%) no mostraron ningún cambio en la DEM después de la administración de PL. Los factores asociados a una mejor respuesta a PL en nuestro grupo de pacientes fueron los ojos oscuros y tener un valor basal de DEM bajo. Este último punto es interesante, pues los pacientes con una DEM basal baja y con más propensión a sufrir los efectos indeseados de la RUV son los que más se beneficiarán de la toma de PL. Los resultados de este estudio son prometedores ya que sugieren que pacientes con MM familiar podrían beneficiarse del extracto de PL en términos de reducción del daño solar agudo. Debido al alto riesgo intrínseco de estos pacientes, cualquier intervención positiva para reducir el riesgo es muy positiva. Además, nuestro trabajo ha demostrado también que el PL es efectivo en pacientes con MM esporádico o síndrome del nevus displásico, en los que los efectos de la RUV son el principal factor ambiental responsable de la génesis del MM.

Con los resultados de este trabajo y el de Nestor y colaboradores (165), nuestra recomendación en los pacientes portadores de algún factor de riesgo para desarrollar MM es la toma de PL. Serán necesarios más trabajos en un futuro para estudiar el efecto de la toma continuada de PL y la dosis recomendada.

Determinación de la MED basal en un paciente con Síndrome de Nevus Displásico



Determinación de la MED basal en un paciente con MM esporádico



FOTOCARCINOGENESIS MÁS ALLÁ DE LA PIGMENTACIÓN

Diversos estudios ya han demostrado que el papel de *MC1R* en la carcinogénesis no sólo es ejercido a través de las vías de pigmentación. Un estudio con ratones albinos, por tanto incapaces de sintetizar melanina, demostró diferentes grados de daño solar según la funcionalidad de *MC1R*, independientemente de la producción de melanina(128). *MC1R* juega un papel importante en la fotocarcinogénesis también a través de la estimulación de la producción de p53 y de p16 ante un daño fotoinducido (72), o a través de la vía de *MITF* (mitogen transcriptor factor) la cual está implicada en la proliferación celular tumoral, apoptosis y vías de reparación de ADN(73).

Smith y colaboradores demostraron que según el polimorfismo de *MC1R* podría variar la sensibilidad a la fototerapia. Estudiaron 111 pacientes tributarios de PUVAterapia, y determinaron la dosis mínima fototóxica. Encontraron que las variantes V60L y A163G, o la presencia de 2 o más polimorfismos se asociaba a mayor sensibilidad al PUVA, mientras que la variante de pelo rojo R151H sólo se asoció al fenotipo pelirojo(162). También se ha demostrado recientemente que la presencia de ciertos polimorfismos puede conferir riesgo a unos tipos de MM pero no a otros(163)(164), como la reciente asociación entre la variante R163Q y MM tipo lentigo maligno en población mediterránea. Tal vez uno de los resultados más sorprendentes respecto a las variantes del receptor es el hecho de que los individuos que tienen un receptor salvaje (*wild type*), en caso de desarrollar un MM éste va a tener un peor pronóstico, mostrando la complejidad de la relación entre las variantes del receptor y el MM(169). También se ha observado que los pacientes con deterioro funcional del receptor van a presentar MM a una menor edad (147). Es interesante que cada vez cobra mayor interés las funciones de *MC1R* independientes de las vías de pigmentación. Esto explicaría el incremento del riesgo de ciertas variantes, a pesar

de no presentar fenotipo clásico de riesgo o la presencia de nevus melanocíticos(48)(128)(48)(170).

Probablemente, el daño oxidativo favorecido por la síntesis de feomelanina ejerce un papel más importante del que se pensaba, e incluso independientemente de la RUV recibida. Mitra y colaboradores recientemente demostraron en modelos murinos que en ausencia de RUV las variantes de pelo rojo junto con la activación del oncogén *BRAF* son suficientes para inducir MM, pero si se inhibe totalmente la síntesis de feomelanina (ratones albinos), se bloquea la inducción de MM y expresan menor daño oxidativo celular(171).

Por otra parte se ha sugerido que la RUVA podría tener incluso mayor papel en la melanomagénesis por la combinación de daño directo del ADN e indirecto a través del daño oxidativo, que se potenciaría más aún a través de una mayor síntesis de melanina. En un estudio reciente se pudo demostrar que tanto la RUVB como la RUVA inducen dímeros de ciclobutano pirimidina (DCP) de igual manera en melanocitos como en queratinocitos. En cambio, el daño oxidativo inducido por UVA (a través de 8-oxo-7,8-dihydroguanine) fue el doble en melanocitos (2.2 veces superior), lo que apoya también las hipótesis de que a mayor síntesis de melanina en el melanocito, mayor estrés oxidativo sufre la célula(168).

1- De las vías de pigmentación a estrategias de prevención

Recientemente se ha publicado una excelente revisión crítica sobre las posibles relaciones entre variantes RHC, el estrés oxidativo, las mutaciones de *MC1R* y la melanomagénesis(169). Aunque las vías de pigmentación aberrantes no son las únicas implicadas en el desarrollo del melanoma, son un objetivo potencialmente útil para controlar el estrés oxidativo y el desarrollo de tumores. La justificación que inspira posibles estrategias quimiopreventivas se basa en una serie de observaciones: (1) la feomelanina tiene efectos más dañinos que la total ausencia de melanina (167), (2)

las variantes de pelo rojo (RHC) no producen una señalización eficiente a α -MSH, lo que conlleva una capacidad reducida de los melanocitos para inhibir la generación de radicales libres de oxígeno (ROS) y para incrementar la actividad y expresión de enzimas antioxidantes, (3) la melanomagénesis está asociada con una disregulación de la síntesis de melanina en ausencia de exposición a RUV, y (4) esta disregulación se incrementa tras la exposición a UVA, incrementando la generación de ROS(170).

En conjunto, estas observaciones ponen de manifiesto los dos principales factores subyacentes en la melanomagénesis, es decir, una vía de pigmentación aberrante y el estrés oxidativo. Éstos pueden ser dirigidos simultáneamente por un enfoque racional destinado a restablecer la melanogénesis funcional, es decir, eumelanogénesis. Una estrategia viable propuesta para abordar este doble objetivo podría basarse en la administración conjunta de precursores de la eumelanina con potentes capacidades antioxidantes y un precursor de la GSH farmacológicamente efectivo con la finalidad de reparar la disfunción mitocondrial provocada por el estrés oxidativo. DHICA es el principal precursor natural de las eumelaninas y ha demostrado conferir al pigmento potente capacidad antioxidante (171). Recientemente se ha reconocido como el más potente eliminador de radicales libres(172). Todos estos trabajos ponen de manifiesto el interés hacia la investigación de estas vías asociadas a las variantes de *MC1R*, y la necesidad de encontrar estrategias eficaces de prevención del daño inducido en estos pacientes. En este sentido nuestro tercer trabajo aporta datos interesantes ya que demuestra la efectividad de la administración de PL en pacientes con variantes en *MC1R* y antecedentes de MM o síndrome de nevus displásico, a través probablemente de su capacidad en inducir la expresión de p53 y disminuir el daño oxidativo.

Distribución de variantes de MC1R en los pacientes del tercer trabajo

Table 2 Distribution of the *MC1R* variants

Variant	Frequency	%
D294H	6	12.5
R151C	12	25
R160W	3	6.3
R163Q	2	4.2
F45L	1	2.1
Q233Q	1	2.1
V60L	12	25
V92M	5	10.4
Y152X	1	2.1

En pacientes de alto riesgo a desarrollar MM es a veces dificultoso realizar estudios *in vivo* para valorar los efectos de la RUV en esta población. Por este motivo hemos querido desarrollar y validar un modelo murino humanizado de MM familiar con el fin de poder diseñar estudios para testar futuras estrategias de prevención frente a RUV, así como poder comprender mejor el papel de las alteraciones genéticas de susceptibilidad a MM en la respuesta a la RUV.

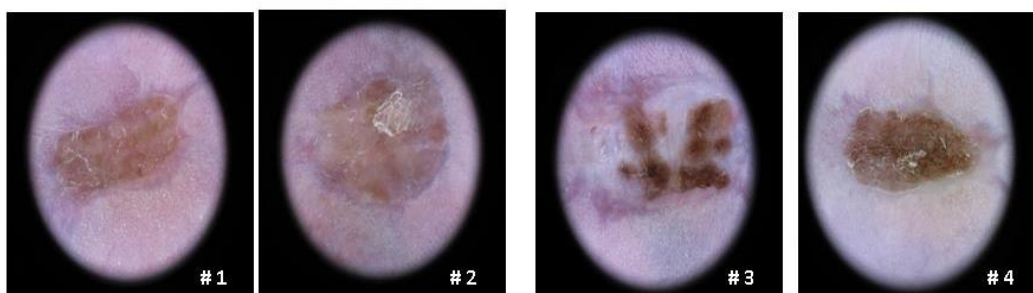
2- Validación y utilidad de un modelo murino humanizado de MM familiar

La complejidad en la patogenia del MM ha dificultado el desarrollo de modelos *in vivo*, y la generación de modelos animales que recreen el MM cutáneo sigue siendo una prioridad. Kiowsky y colaboradores (107) ya diseñaron un modelo humanizado mediante trasplante ortotópico de piel humana en ratones inmunodeprimidos. La principal ventaja de utilizar modelos humanizados es la recreación del microambiente fisiológico celular.

En nuestro estudio el trasplante ortotópico de piel de pacientes pertenecientes a familias de MM familiar recreando 4 genotipos distintos fue satisfactorio. Se pudo observar en la espalda de los ratones un modelo de pigmentación de la piel trasplantada distinto en función del genotipo.

Table 1: Genotype and phenotype features of four individuals from two melanoma pedigrees.

Pedigree A						
Individual	MM*	CDKN2A	MC1R	Skin phototype	Eye color	Hair color
A1	5	p.G101W	p.R160W, p.R151C	II	Green	Red
A2	0	Wild-type	p.R160W, p.R151C	II	Green	Red
Pedigree B						
Individual	MM*	CDKN2A	MC1R	Skin phototype	Eye color	Hair color
B1	0	p.G101W	Wild-type	II	Blue	Black
B2	0	Wild-type	Wild-type	II	Blue	Brown

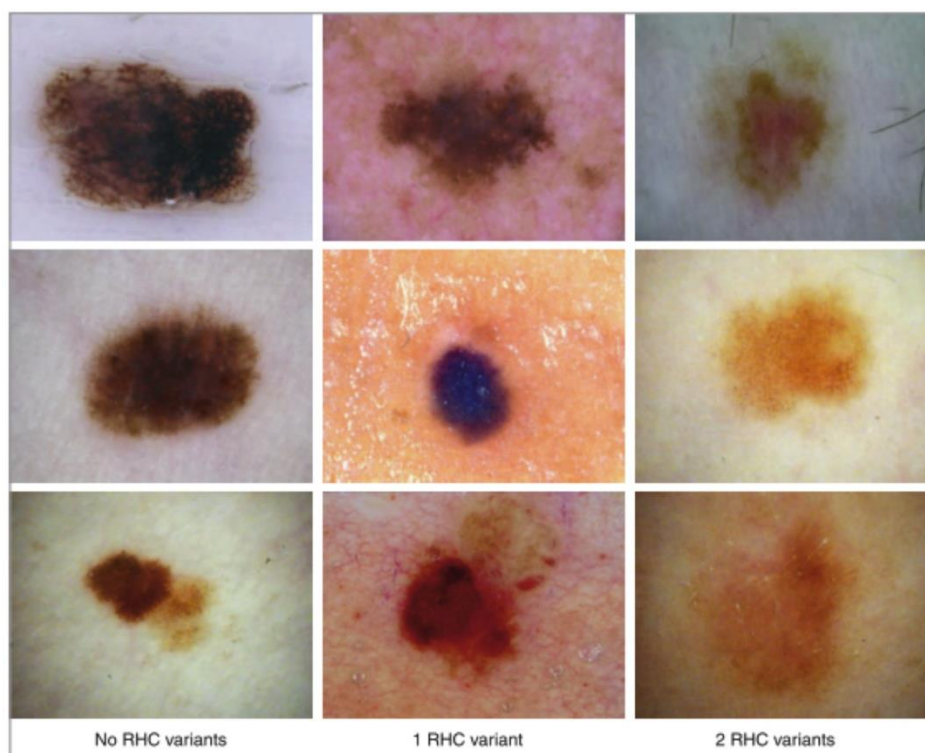


La piel trasplantada de los individuos A1 #1(G101W, R160W/R151C) y A2 #2 (wt, R160W/R151C) retiene la pigmentación anaranjada propia de la feomelanina. La piel trasplantada de los individuos B1 #3(G101W, wt) y B2 #4(wt, wt) mostró la pigmentación marrón propia de la eumelanina, siendo esta pigmentación parcheada en la piel trasplantada del individuo B1.

Este modelo de pigmentación de la piel trasplantada traduce muy bien el modelo de pigmento que presentan estos individuos en las lesiones melanocíticas que presentan. Cuéllar y colaboradores (121), ya describieron que los tumores en pacientes portadores de mutación en *CDKN2A* y polimorfismos de pelo rojo en *MC1R*, presentaban MM hipopigmentados o acrómicos, a menudo sin criterios dermatoscópicos de malignidad. En el trabajo de Carrera y colaboradores (122) de

estudio de MM incipientes en extremidades inferiores, también observan que los tumores incluidos en los grupos 2 (retículo pigmentado delicado, sin características dermatoscópicas específicas de MM) y 3 (lesiones hipopigmentadas con vasos atípicos, sin criterios clásicos de MM) pertenecían a pacientes todos ellos con algún polimorfismo en *MC1R*, y más de dos tercios con variantes de pelo rojo.

Influencia de MC1R en Dermatoscopia. Adaptado de Cuéllar et. Al. Br J Dermatol 2009



El modelo murino desarrollado ha confirmado los resultados esperados en cuanto a respuesta celular frente a la RUV. Después de la irradiación se ha podido observar la aparición de daño en el ADN en forma de una mayor cantidad de dímeros de ciclobutano pirimidina (CPD) en los individuos A1 y A2, portadores de variantes RHC en *MC1R*. Este hecho traduce la falta de protección frente a la RUV conferida por la feomelanina en estos individuos. En el individuo A1 la cantidad de CPDs fue mucho

mayor, y esto podría explicarse por una falta de respuesta dependiendo de p53 y p16 en los individuos con mutación en *CDKN2A*, lo que se pudo observar en la tinción inmunohistoquímica para estas proteínas. Un resultado muy interesante que encontramos fue la falta de expresión de p16 tras RUV en el individuo A2, portador de variantes RHC pero con el alelo salvaje en *CDKN2A*, lo que corrobora el hallazgo ya referido por Pavey y colaboradores (72) de que las variantes RHC de *MC1R* disminuyen la capacidad de expresión de p16 en respuesta a la RUV, por tanto no se produce el *checkpoint* de arresto de las células dañadas, con los efectos potenciales que esto puede tener en la integridad genómica.

Además, la piel trasplantada del individuo A1 ha sido la más susceptible de acumular mutaciones inducidas por la RUV (Figura 5).

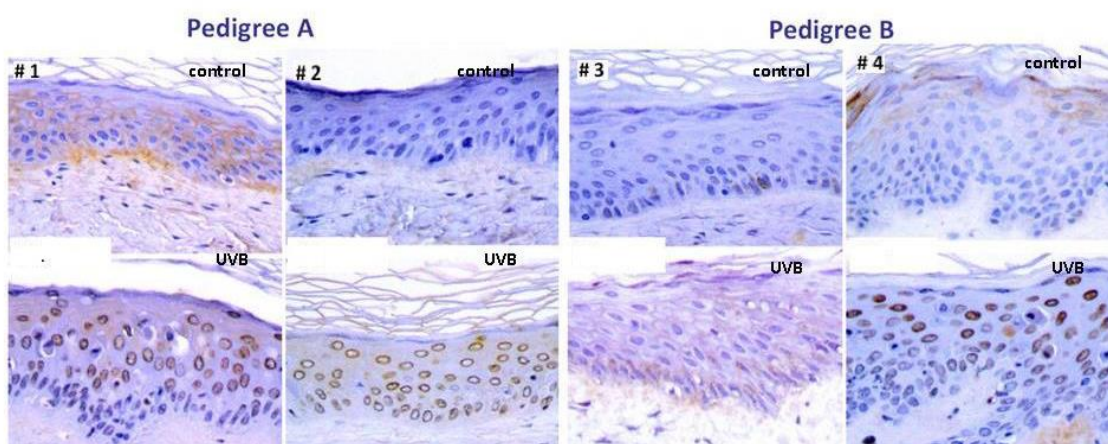


Figura 5: Tinción inmunohistoquímica para CPD después de RUV

Esto podría estar en acuerdo con una disminución de la protección frente a la RUV mediada por la feomelanina (128), la capacidad disminuida de las variantes RHC en *MC1R* de incrementar la expresión de p16 en respuesta a la RUV (173), y la reducción de la capacidad de reparación del ADN dependiente de p53 y p16 debido a mutaciones germinales en *CDKN2A*. Además, el individuo A1 presenta un acúmulo de

feomelanina (**Figura 5**), que ha sido denominada recientemente como un factor de riesgo a MM debido a sus efectos carcinógenos independientes de la RUV.

De acuerdo con lo anteriormente citado, el estudio de Puig-Butillé y colaboradores (46) mediante el análisis de *arrays* de expresión de los co-cultivos de melanocitos y queratinocitos usados en estas pieles de bioingeniería, señala que las variantes no funcionales de *MC1R* promueven el daño en el ADN por una vía independiente de la RUV. Estos autores demuestran que las células con un receptor no funcional presentan un mayor daño del ADN incluso sin ser expuestas a la RUV, sugiriendo que factores endógenos provocarían dicho daño(46). Las células con un receptor no funcional presentan una sobre-representación de la vía de ciclo celular (*hsa04110*) y replicación del ADN (*hsa03030*) así como de las vías de recombinación homóloga y reparación “*Mismatch*”(has 03430), (**Figura 6**).

Adaptado de Puig-Butillé et al. Oncotarget, 2013

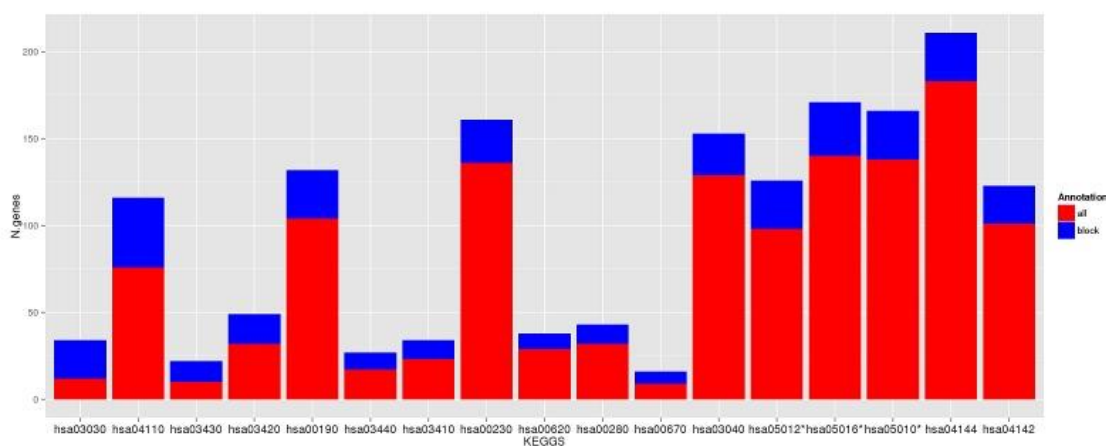
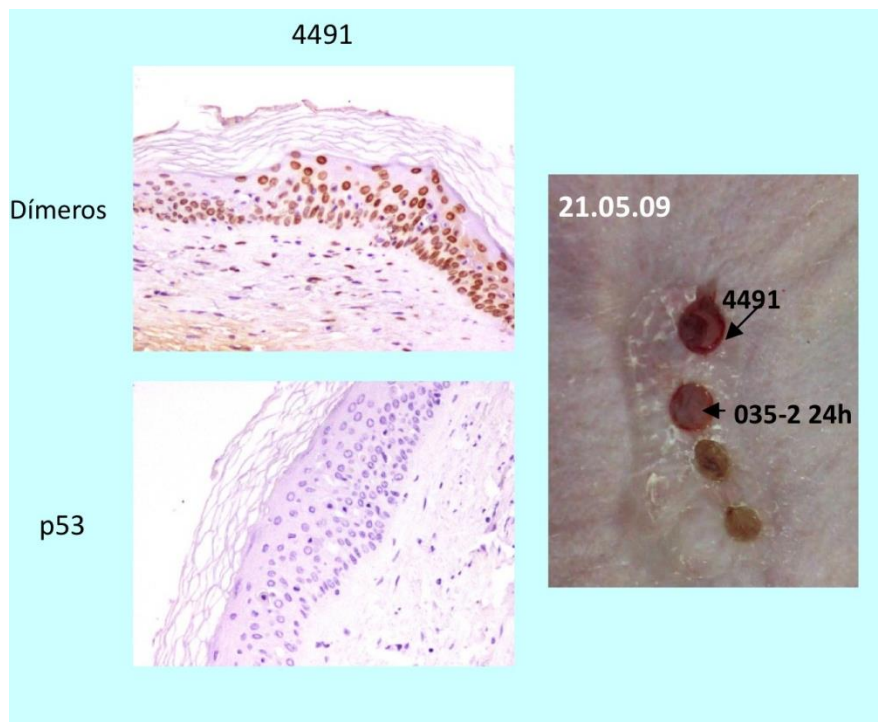


Figura 6: Vías desreguladas en co-cultivos de melanocito y queratinocitos de *MC1R R/HV*

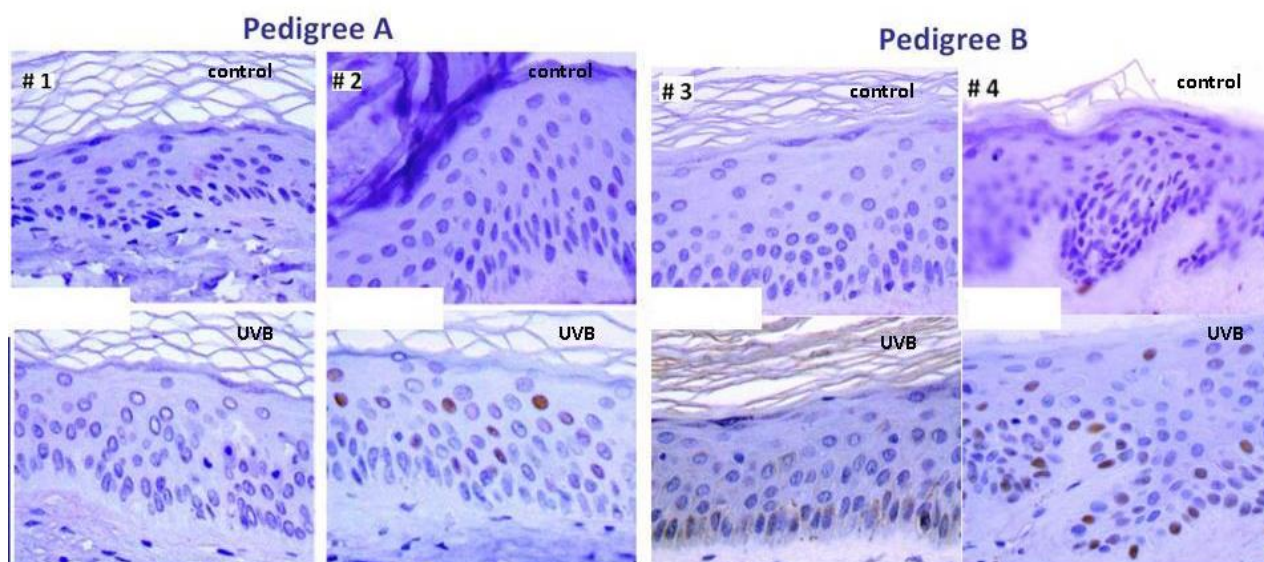
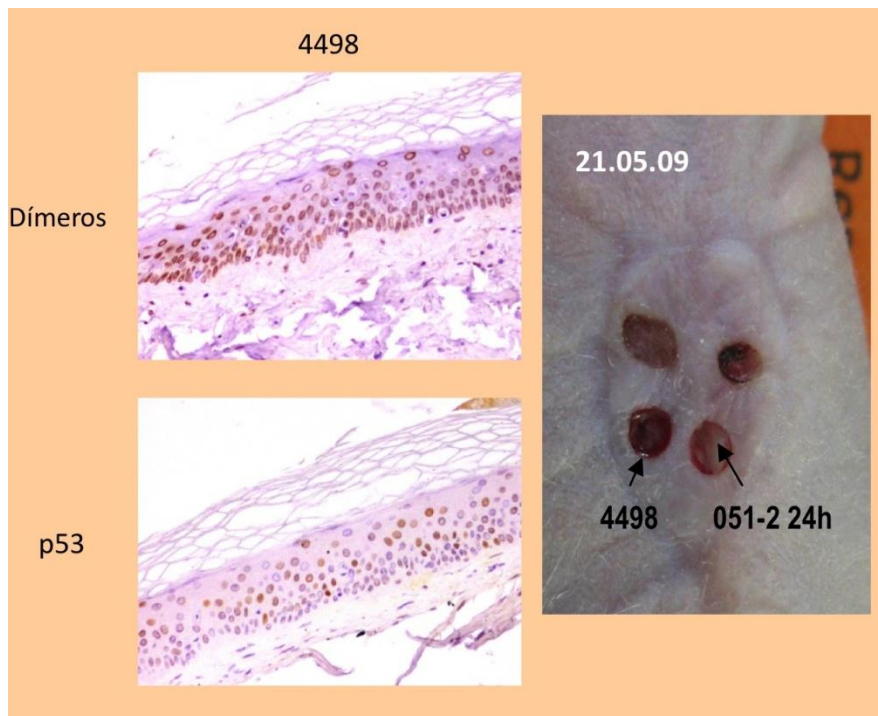
Por tanto, cabe la posibilidad de que estas células presenten una mayor tasa de errores de replicación y combinación del ADN debido a una desregulación del propio ciclo celular facilitando la aparición de mutaciones en genes clave para la carcinogénesis. Por otro lado, estos autores encuentran una sobre-representación de la vía de la fosforilación oxidativa (*hsa0019*), la cual es necesaria para la producción

de adenosín trifosfato (ATP). Este proceso, a pesar de ser vital para el metabolismo celular, produce una proporción de especies reactivas de oxígeno (superóxido y peróxido de hidrógeno), lo que lleva a un aumento del estrés oxidativo en la célula mediante la propagación de radicales libres. El estrés oxidativo provoca daño celular e inestabilidad genómica por lo que es considerado un “*hallmark*” necesario en el proceso carcinogénico(174). Junto con el estrés oxidativo se observa una sobre-regulación de la vía de reparación por escisión de bases (hsa03410) la cual repara los daños causados por dichos radicales de oxígeno. Estos resultados indican que parte del daño oxidativo observado en los melanocitos y queratinocitos es independiente de la RUV.

Individuo A1. Biopsias 24h post RUV. Expresión de CPD, p53



Individuo A2. Biopsias 24h post RUV. Expresión de CPD p53



Tinción inmunohistoquímica para p53 después de RUV

El estrés oxidativo también contribuye al envejecimiento celular y se ha relacionado con múltiples enfermedades. De forma notable, las células cutáneas con el receptor no funcional presentan una sobre-regulación de vías relacionadas con enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Huntington (hsa05016); enfermedad de Alzheimer (hsa05010) y enfermedad de Parkinson (hsa05012)). El gen *MC1R* se expresa en células del sistema nervioso y su activación disminuye el estrés oxidativo además de tener efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores. Cabe destacar que el incremento del estrés oxidativo es un proceso presente en la etiopatogenia de las tres enfermedades neurodegenerativas identificadas en el estudio(175). La relación entre cáncer cutáneo y enfermedades neurodegenerativas se ha observado, a nivel epidemiológico, entre el riesgo a desarrollar MM y Parkinson. Los pacientes de Parkinson tienen el doble de riesgo de desarrollar MM comparado con la población general; y los pacientes de MM el doble de riesgo a desarrollar Parkinson(176). Recientemente se ha descrito también que los pacientes pelirrojos tienen más riesgo de Parkinson, observándose una tendencia a un mayor riesgo en los portadores de los polimorfismos p.R151C y p.R160W(177)(178).

En su conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la implicación del gen *MC1R* en el estrés oxidativo celular, sugiriendo que los individuos portadores de variantes no funcionales presentan unos niveles de estrés oxidativo basal superiores, lo cual incrementa el riesgo a desarrollar cáncer cutáneo y otras enfermedades. Por ello, es de gran interés seguir investigando en estrategias de protección frente a estas enfermedades mediante mecanismos antioxidantes. Nuestro trabajo ha demostrado que la actividad antioxidante del PL es efectiva en pacientes portadores de RHV en *MC1R* en cuanto a la disminución del daño cutáneo. Estos resultados abren una puerta al estudio de la capacidad del PL en la prevención de la iniciación o la progresión de estas enfermedades neurodegenerativas ligadas al estrés oxidativo. Ya

hay estudios que demuestran el posible papel protector del ácido ferúlico (uno de los principales componentes del PL) frente a estas enfermedades(183).

Nuestro modelo murino desarrollado va a permitir realizar más estudios de respuesta a RUV y de daño oxidativo en estos pacientes.

Este modelo murino de MM familiar reproduce las características fisiopatológicas y mecánicas de la piel del donante en términos de fototipo y respuesta a RUV, recreando el ambiente nativo en el que se iniciaría el MM en individuos pertenecientes a familias de riesgo.

COMENTARIO FINAL

Nuestros trabajos han ido encaminados a mejorar el conocimiento del Melanoma Familiar con el fin de mejorar su prevención y tratamiento.

En primer lugar hemos descrito y validado características clínicas, histopatológicas e inmunohistoquímicas del MM familiar, que van a ser de utilidad para el clínico en el momento de plantear a quién ofrecer un estudio genético. Estos hallazgos van a ayudarnos a entender mejor la interrelación entre la genética y el ambiente en estos tumores.

Con el fin de poder llevar a cabo estos estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos, y mucho más importante hoy en día, estudios moleculares, hemos desarrollado y validado un método de muestreo tumoral para la obtención de tejido para biobanco basado en la dermatoscopia *ex vivo*. En la era de la biología molecular y de las terapias diana dirigidas contra el cáncer, la investigación traslacional para identificar nuevas dianas terapéuticas en el MM ofrece nuevas oportunidades para potenciales nuevos tratamientos. El tener muestras de tumor primario es de grandiosa utilidad para el paciente. El protocolo diseñado de muestreo tumoral nos va a permitir la obtención de muestras para el biobanco, preservando la arquitectura del tumor.

Para comprender mejor la patogenia del MM familiar son necesarios modelos de estudio que nos permitan abordar la compleja interrelación de estos pacientes con la RUV. Debido a la complejidad de llevar a cabo estos trabajos con pacientes, hemos desarrollado un modelo murino humanizado de MM familiar que hemos constatado eficaz para el estudio de la interacción entre factores genéticos como mutaciones en *CDKN2A* o polimorfismos en *MC1R* y la RUV.

Finalmente hemos evaluado una estrategia de fotoprotección sistémica que ha sido eficaz en individuos portadores de genotipos de riesgo.

CONCLUSIONES

- 1- La dermatoscopia, practicada *ex vivo*, una vez extirpado el tumor, permite una correcta evaluación de todos los patrones y estructuras dermatoscópicas, exceptuando la vascularización.
- 2- La dermatoscopia *ex vivo* ha permitido el desarrollo y validación de un método para la correcta obtención de muestras para biobanco de MM
- 3- Los MM familiares tienen unas características clínicas e histopatológicas propias: una menor edad de debut, menor índice de Breslow y una mayor frecuencia de MM *in situ*. Los MM de portadores de mutación en *CDKN2A* tienen más frecuentemente MM múltiples y una mayor frecuencia de tumores survivina positivos
- 4- El extracto de PL se ha demostrado eficaz en incrementar la MED en todos los grupos de pacientes de riesgo (MM familiar, MM esporádico, Síndrome de Nevus Displásico).
- 5- El trasplante ortotópico de piel humanizada permite la construcción y validación de un modelo murino de MM familiar
- 6- El modelo murino ha reproducido las características de la piel del donante en cuanto a pigmentación y respuesta a la RUV.
- 7- Las variantes RHC en *MC1R* producen daño en el ADN por varios mecanismos: disminución de la protección frente a la RUV mediada por la feomelanina y disminución de la capacidad de incrementar la expresión de p16 en respuesta a la RUV
- 8- Las mutaciones en *CDKN2A* producen daño en el ADN tras RUV por una incapacidad de expresión de p53 en respuesta a ésta. Este daño es acumulativo al producido por las RHV en *MC1R*

REFERENCIAS

1. Garbe C, Leiter U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol*; 2009;27(1):3-9.
2. Little EG, Eide MJ. Update on the Current State of Melanoma Incidence. *Dermatol Clin*. 2012;30(3):355-61.
3. Jemal A, Saraiya M, Patel P, Cherala SS, Barnholtz-Sloan J, Kim J, et al. Recent trends in cutaneous melanoma incidence and death rates in the United States, 1992-2006. *J Am Acad Dermatol*; 2011;65(5 SUPPL. 1):S17.e1-S17.e11.
4. Hanly P, Soerjomataram I, Sharp L. Measuring the societal burden of cancer: The cost of lost productivity due to premature cancer-related mortality in Europe. *Int J Cancer*; 2015;136(4):E136-45.
5. Severi G, Giles GG, Robertson C, Boyle P, Autier P. Mortality from cutaneous melanoma: evidence for contrasting trends between populations. *Br J Cancer*. 2000;82(11):1887-91.
6. De Snoo F a., Kroon MW, Bergman W, ter Huurne J a C, Houwing-Duistermaat JJ, van Mourik L, et al. From sporadic atypical nevi to familial melanoma: Risk analysis for melanoma in sporadic atypical nevus patients. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56(5):748-52.
7. Katalinic A, Waldmann A, Weinstock M a., Geller AC, Eismann N, Greinert R, et al. Does skin cancer screening save lives?: An observational study comparing trends in melanoma mortality in regions with and without screening. *Cancer*; 2012;118(21):5395-402.
8. Cayuela A, Rodríguez-Domínguez S, Lapetra-Peralta J, Conejo-Mir JS. Has mortality from malignant melanoma stopped rising in Spain? Analysis of trends between 1975 and 2001. *Br J Dermatol*. 2005;152(5):997-1000.
9. Puig S, Marcoval J, Paradelo C, Azon A, Bartralot R, Bel S, et al. Melanoma Incidence Increases in the Elderly of Catalonia But Not in the Younger Population: Effect of Prevention or Consequence of Immigration? 2014;(12):422-6.
10. Weinstock M a. Epidemiology and UV exposure. *J Invest Dermatol*; 2013 ;133(E1):E11-2.
11. Armstrong BK, Kricke a. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* ; 2001;63(1-3):8-18.
12. Rouhani P, Hu S, Kirsner RS. Melanoma in hispanic and black Americans. *Cancer Control*. 2008;15(3):248-53.

13. Agbai ON, Buster K, Sanchez M, Hernandez C, Kundu R V., Chiu M, et al. Skin cancer and photoprotection in people of color: A review and recommendations for physicians and the public. *J Am Acad Dermatol*;2014;70(4):748-62.
14. Hu S, Soza-Vento RM, Parker DF, Kirsner RS. Comparison of stage at diagnosis of melanoma among Hispanic, black, and white patients in Miami-Dade County, Florida. *Arch Dermatol*. 2006;142(6):704-8.
15. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*. 2005;41(1):28-44.
16. Bataille V. Melanoma. Shall we move away from the sun and focus more on embryogenesis, body weight and longevity? *Med Hypotheses*; 2013;81(5):846-50.
17. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Zanetti R, Masini C, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*. 2005;41(14):2040-59.
18. Bliss JM, Ford D, Swerdlow a. J, Armstrong BK, Cristofolini M, Elwood JM, et al. Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: Systematic overview of 10 case-control studies. *International Journal of Cancer*. 1995. p. 367-76.
19. Goldstein AM. Familial melanoma, pancreatic cancer and germline CDKN2A mutations. *Hum Mutat*. 2004;23(6):630.
20. Nagore E, Botella-Estrada R, Garcia-Casado Z, Requena C, Serra-Guillen C, Llobart B, et al. Comparison between familial and sporadic cutaneous melanoma in Valencia, Spain. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22(8):931-6.
21. Goldstein AM, Tucker MA. Genetic Epidemiology of Cutaneous Melanoma. 2014;137(Cmm):12-5.
22. Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM, Jhanwar S, Klein W, Bell D, et al. p16 Alterations and Deletion Mapping of 9p21 – p22 in Malignant Mesothelioma. *Cancer Res*. 1994 1;54(21):5547-51.
23. Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, et al. Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet*. 1994;8:15.
24. Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer*; 2012;130(8):1715-25.
25. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG, Hill C, Carolina N. ARF Promotes MDM2 Degradation and Stabilizes p53 : ARF-INK4a Locus Deletion Impairs Both the Rb and p53 Tumor Suppression Pathways. *Cell*. 1998;92:725-34.
26. Glanz K, Volpicelli K, Kanetsky P a, Ming ME, Schuchter LM, Jepson C, et al. Melanoma genetic testing, counseling, and adherence to skin cancer prevention and detection behaviors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22(4):607-14.

27. Kefford BRF, Bishop JAN, Bergman W. Counseling and DNA Testing for Individuals Perceived to Be Genetically Predisposed to Melanoma : A Consensus Statement of the Melanoma Genetics Consortium. 2014;
28. Puig S, Malveyh J, Badenas C, Ruiz A, Jimenez D, Cuellar F, et al. Role of the CDKN2A locus in patients with multiple primary melanomas. *J Clin Oncol*; 2005;23(13):3043-51.
29. Monzon J, Liu L, Brill H, Goldstein AM, Tucker M a, From L, et al. CDKN2A MUTATIONS IN MULTIPLE PRIMARY MELANOMAS. *N Engl J Med*. 1998;338(13):879-87.
30. Puntervoll HE, Yang XR, Vetti HH, Bachmann IM, Avril MF, Benfodda M, et al. Melanoma prone families with CDK4 germline mutation: phenotypic profile and associations with MC1R variants. *J Med Genet*. 2013;50(4):264-70.
31. Bartkova J, Lukas J, Guldberg P. The p16-cyclin D / Cdk4-pRb Pathway as a Functional Unit Frequently Altered in Melanoma Pathogenesis The p16-cyclin D / Cdk4-pRb Pathway as a Functional Unit Frequently Altered in Melanoma Pathogenesis1. 1996;5475-83.
32. Marzuka-alcalá A, Gabree MJ, Tsao H. Molecular Diagnostics for Melanoma. Thurin M, Marincola FM, editors. Totowa, NJ: Humana Press; 2014;1102:381-93.
33. Carbone M, Ferris LK, Baumann F, Napolitano A, Lum C a, Flores EG, et al. BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MBAITs. *J Transl Med. Journal of Translational Medicine*; 2012;10(1):179.
34. Popova T, Hebert L, Jacquemin V, Gad S, Caux-Moncoutier V, Dubois-d'Enghien C, et al. Germline BAP1 mutations predispose to renal cell carcinomas. *Am J Hum Genet*. 2013;92(6):974-80.
35. Wiesner T, Obenauf AC, Murali R, Fried I, Griewank KG, Ulz P, et al. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet*. 2011;43(10):1018-21.
36. Robles-Espinoza CD, Harland M, Ramsay AJ, Aoude LG, Quesada V, Ding Z, et al. POT1 loss-of-function variants predispose to familial melanoma. *Nat Genet*. 2014;46(5):478-81.
37. Shi J, Yang XR, Ballew B, Rotunno M, Calista D, Fargnoli MC, et al. Rare missense variants in POT1 predispose to familial cutaneous malignant melanoma. *Nat Genet*. 2014;46(5):482-6.
38. Burke LS, Hyland PL, Pfeiffer RM, Prescott J, Wheeler W, Mirabello L, et al. Telomere length and the risk of cutaneous malignant melanoma in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations. *PLoS One*. 2013;8(8):e71121.
39. Law MH, Montgomery GW, Brown KM, Martin NG, Mann GJ, Hayward NK, et al. Meta-Analysis Combining New and Existing Data Sets Confirms that the TERT-

- CLPTM1L Locus Influences Melanoma Risk. *J Invest Dermatol.* 2012;132(2):485-7.
40. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science.* 2013;339(6122):959-61.
 41. Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med.* 2006;12(9):406-14.
 42. Yokoyama S, Woods SL, Boyle GM, Aoude LG, MacGregor S, Zismann V, et al. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature;* 2011;480(7375):99-103.
 43. Bertolotto C, Lesueur F, Giuliano S, Strub T, de Lichy M, Bille K, et al. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature;* 2011;480(7375):94-8.
 44. Córdoba-Lanús E, Hernández-Jiménez JG, Medina-Coello C, Espinoza-Jiménez A, González A, Rodríguez-Pérez M-D-C, et al. MC1R gene variants and sporadic malignant melanoma susceptibility in the Canary Islands population. *Arch Dermatol Res.* 2014;306(1):51-8.
 45. Kennedy C, Huurne J, Berkhout M, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W, et al. Melanocortin 1 Receptor (MC1R) Gene Variants are Associated with an Increased Risk for Cutaneous Melanoma Which is Largely Independent of Skin Type and Hair Color. 2001;294-300.
 46. Puig-butlle JA, Escámez MJ, Garcia-garcia F. Capturing the biological impact of CDKN2A and MC1R genes as an early predisposing event in melanoma and non melanoma skin cancer . ABSTRACT : *Oncotarget.* 2013;5(6):1439.
 47. Box NF, Duffy DL, Chen W, Stark M, Martin NG, Sturm R a, et al. MC1R genotype modifies risk of melanoma in families segregating CDKN2A mutations. *Am J Hum Genet.* 2001;69(4):765-73.
 48. Demenais F, Mohamdi H, Chaudru V, Goldstein a M, Newton Bishop J a, Bishop DT, et al. Association of MC1R variants and host phenotypes with melanoma risk in CDKN2A mutation carriers: a GenoMEL study. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(20):1568-83.
 49. Gudbjartsson DF, Sulem P, Stacey SN, Goldstein AM, Rafnar T, Sigurgeirsson B, et al. ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nat Genet.* 2008;40(7):886-91.
 50. Helsing P, Nymoen D a, Rootwelt H, Vårdal M, Akslen L a, Molven A, et al. MC1R, ASIP, TYR, and TYRP1 gene variants in a population-based series of multiple primary melanomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012;51(7):654-61.
 51. Scherer D, Kumar R. Genetics of pigmentation in skin cancer - A review. *Mutat Res - Rev Mutat Res;* 2010;705(2):141-53.

52. Nan H, Kraft P, Hunter DJ, Han J. Genetic variants in pigmentation genes, pigmentary phenotypes, and risk of skin cancer in Caucasians. *Int J Cancer*. 2009;125(4):909-17.
53. Fernandez LP, Milne RL, Pita G, Floristan U, Sendagorta E, Feito M, et al. Pigmentation-related genes and their implication in malignant melanoma susceptibility. *Exp Dermatol*. 2009;18(7):634-42.
54. Duffy DL, Zhao ZZ, Sturm R a, Hayward NK, Martin NG, Montgomery GW. Multiple pigmentation gene polymorphisms account for a substantial proportion of risk of cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol*; 2010;130(2):520-8.
55. Ogbah Z, Badenas C, Harland M, Puig-Butille J a., Elliot F, Bonifaci N, et al. Evaluation of PAX3 genetic variants and nevus number. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013;26(5):666-76.
56. Mocellin S, Verdi D, Nitti D, S. M, D. V, D. N. DNA repair gene polymorphisms and risk of cutaneous melanoma: A systematic review and meta-analysis. *Carcinogenesis*. 2009. p. 1735-43.
57. Ward K a., Lazovich D, Hordinsky MK. Germline melanoma susceptibility and prognostic genes: A review of the literature. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(5):1055-67.
58. Nan H, Qureshi A a., Prescott J, De Vivo I, Han J. Genetic variants in telomere-maintaining genes and skin cancer risk. *Hum Genet*. 2011;129(3):247-53.
59. Raimondi S, Johansson H, Maisonneuve P, Gandini S. Review and meta-analysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk .*Carcinogenesis*. 2009. p. 1170-80.
60. Ogbah Z, Visa L, Badenas C, Ríos J, Puig-Butille JA, Bonifaci N, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels and vitamin D receptor variants in melanoma patients from the Mediterranean area of Barcelona. *BMC Med Genet*. 2013;14(1):26.
61. Gandini S, Raimondi S, Gnagnarella P, Doré J-F, Maisonneuve P, Testori A. Vitamin D and skin cancer: a meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009;45(4):634-41.
62. Li C, Liu Z, Wang LE, Gershenwald JE, Lee JE, Prieto VG, et al. Haplotype and genotypes of the VDR gene and cutaneous melanoma risk in non-Hispanic whites in Texas: A case-control study. *Int J Cancer*. 2008;122(9):2077-84.
63. Mitchell DL. The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells. 2008;48(1):2785.
64. Perdiz D, Gróf P, Mezzina M, Nikaido O. DISTRIBUTION AND REPAIR OF BIPYRIMIDINE PHOTOPRODUCTS IN SOLAR UV-IRRADIATED MAMMALIAN CELLS. POSSIBLE ROLE OF DEWAR PHOTOPRODUCTS IN SOLAR MUTAGENESIS. *J Biol Chem*. 2000;275(35):1-47.

65. Bohr V a, Smith C a, Okumoto DS, Hanawalt PC. DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*. 1985;40(2):359-69.
66. Mitchell DL. The relative cytotoxicity of (6-4) photoproducts and cyclobutane dimers in mammalian cells . *Photochem Photobiol*. 1988;48(1):3217442.
67. Pfeifer GP, You Y-H, Besaratinia A. Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat Res*. 2005;571(1-2):19-31.
68. Tewari A, Sarkany RP, Young AR. UVA1 induces cyclobutane pyrimidine dimers but not 6-4 photoproducts in human skin in vivo. *J Invest Dermatol*; 2012;132(2):394-400.
69. García M, Llames S, García E, Meana A, Cuadrado N, Recasens M, et al. In vivo assessment of acute UVB responses in normal and Xeroderma Pigmentosum (XP-C) skin-humanized mouse models. *Am J Pathol*. 2010;177(2):865-72.
70. Giles N, Pavey S, Pinder a, Gabrielli B. Multiple melanoma susceptibility factors function in an ultraviolet radiation response pathway in skin. *Br J Dermatol*. 2012;166(2):362-71.
71. Lehmann AR, McGibbon D, Stefanini M. Xeroderma pigmentosum. *Orphanet J Rare Dis*. BioMed Central Ltd; 2011;6(1):70.
72. Fassihi H. Spotlight on “xeroderma pigmentosum”. *Photochem Photobiol Sci*. 2013;12(1):78-84.
73. Jacobelli S, Soufir N, Lacapere JJ, Regnier S, Bourillon a, Grandchamp B, et al. Xeroderma pigmentosum group C in a French Caucasian patient with multiple melanoma and unusual long-term survival. *Br J Dermatol*. 2008;159(4):968-73.
74. Pavey S, Gabrielli B. α -Melanocyte Stimulating Hormone Potentiates p16 / CDKN2A Expression in Human Skin after Ultraviolet Irradiation. *Cancer Res*. 2002;62:875-80.
75. Gruis N a, van Doorn R. Melanocortin 1 receptor function: shifting gears from determining skin and nevus phenotype to fetal growth. *J Invest Dermatol*; 2012;132(8):1953-5.
76. Kipp C, Young AR. The Soluble Eumelanin Precursor 5,6-Dihydroxyindole-2-carboxylic Acid Enhances Oxidative Damage in Human Keratinocyte DNA after UVA Irradiation. *Photochem Photobiol*. 1999;70(2):191-8.
77. Ackerman a B. No one should die of malignant melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1985. p. 115-6.
78. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. *Cancer Statistics* , 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012;62:10-29.
79. Menzies AM, Long G V. Dabrafenib and Trametinib, alone and in combination for BRAF-Mutant metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(8):2035-43.

80. Rissmann R, Hessel MHM, Cohen AF. Vemurafenib/dabrafenib and trametinib. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;n/a - n/a.
81. Long G V., Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. *N Engl J Med*. 2014;371(20):1877-88.
82. Ekwueme DU, Guy GP, Li C, Rim SH, Parelkar P, Chen SC. The health burden and economic costs of cutaneous melanoma mortality by race/ethnicity-United States, 2000 to 2006. *J Am Acad Dermatol*; 2011;65(5 SUPPL. 1):S133.e1-S133.e12.
83. Guy GP, Ekwueme DU. Years of potential life lost and indirect costs of melanoma and non-melanoma skin cancer: A systematic review of the literature. *Pharmacoeconomics*. 2011;29(10):863-74.
84. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC. The pathogenesis of Melanoma induced by Ultraviolet Radiation. *N Engl J Med*. 1999;340(17):1341-8.
85. Green A, Williams G, Neale R, Hart V, Leslie D, Parsons P, et al. Daily sunscreen application and betacarotene supplementation in prevention of basal-cell and squamous-cell carcinomas of the skin: A randomised controlled trial. *Lancet*. 1999;354(9180):723-9.
86. Green a. C, Williams GM, Logan V, Strutton GM. Reduced Melanoma After Regular Sunscreen Use: Randomized Trial Follow-Up. *J Clin Oncol*. 2010;29(3):257-63.
87. Petersen B, Wulf HC. Application of sunscreen--theory and reality. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2013;30(2-3):96-101.
88. Stahl W, Sies H. Carotenoids and Protection against Solar UV Radiation. *Ski pharmacol appl Ski physiol*. 2002;15:291-6.
89. Stahl W, Sies H. β -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *Am J Clin Nutr*. 2012;96(5):1179S - 84S.
90. Greul A, Grundmann J, Heinrich F. Photoprotection of UV-Irradiated Human Skin: An Antioxidative Combination of Vitamins E and C , Carotenoids , Selenium and Proanthocyanidins. *Ski pharmacol appl Ski physiol*. 2002;15:307-15.
91. Michel L, Maurette JM, Adhoute H, Be M, Ce JP. Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids . *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003;19(5):182-9.
92. McArdle F, Rhodes L, Parslew R. UVR-induced oxidative stress in human skin in vivo: effects of oral vitamin C supplementation. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(10):1355-62.
93. Stahl W, Krutmann J. [Systemic photoprotection through carotenoids]. *Hautarzt*. 2006;57(4):281-5.

94. Middelkamp-Hup M a, Pathak M a, Parrado C, Goukassian D, Rius-Díaz F, Mihm MC, et al. Oral Polypodium leucotomos extract decreases ultraviolet-induced damage of human skin. *J Am Acad Dermatol.* 2004;51(6):910-8.
95. Heinrich U, Moore CE, Spirt S De, Tronnier H, Stahl W. Green Tea Polyphenols Provide Photoprotection , Increase Microcirculation , and Modulate Skin Properties of Women 1 , 2. *J Nutr.* 2011;(11):1202-8.
96. Katiyar SK. Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair. *Arch Biochem Biophys;* 2011;508(2):152-8.
97. Watts CG, Dieng M, Morton RL, Mann GJ, Menzies SW, Cust a E. Clinical practice guidelines for identification, screening and follow-up of individuals at high risk of primary cutaneous melanoma: a systematic review. *Br J Dermatol.* 2015;172(1):33-47.
98. Oliveria S a, Dusza SW, Phelan DL, Ostroff JS, Berwick M, Halpern AC. Patient adherence to skin self-examination. *Am J Prev Med.* 2004;26(2):152-5.
99. Salerni G, Carrera C, Lovatto L, Puig-Butille JA, Badenas C, Plana E, et al. Benefits of total body photography and digital dermatoscopy (“two-step method of digital follow-up”) in the early diagnosis of melanoma in patients at high risk for melanoma. *J Am Acad Dermatol;* 2012;67(1):e17-27.
100. Pizzichetta MA, Talamini R, Piccolo D. The ABCD Rule of Dermatoscopy does not apply to small melanocytic skin lesions. *Arch Dermatol.* 2011;137:1377.
101. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Diagnostic accuracy of dermoscopy. *Lancet Oncol.* 2002;3(3):159-65.
102. Vestergaard ME, Macaskill P, Holt PE, Menzies SW. Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: A meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *Br J Dermatol.* 2008;159(3):669-76.
103. Geller AC, Swetter SM, Weinstock M a. Focus on early detection to reduce melanoma deaths. *J Invest Dermatol;* 2015;135(4):947-9.
104. Whiteman DC, Baade PD, Olsen CM. More People Die from Thin Melanomas (≤ 1 mm) than from Thick Melanomas (> 4 mm) in Queensland, Australia. *J Invest Dermatol;* 2015;135(4):1190-3.
105. Thompson JF, Scolyer R a, Kefford RF. Cutaneous melanoma in the era of molecular profiling. *Lancet.* 2009. p. 362-5.
106. Walker GJ, Soyer HP, Terzian T, Box NF. Modelling melanoma in mice. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011;24(6):1158-76.
107. Larue L, Beermann F. Cutaneous melanoma in genetically modified animals. *Pigment Cell Res.* 2007;20(6):485-97.

108. Noonan FP, Dudek J, Merlino G, Fabo ECDE. Review: Innovative Technology Animal Models of Melanoma: An HGF / SF Transgenic Mouse Model May Facilitate Experimental Access to UV Initiating Events. 2003;16-25.
109. Kiowski G, Biedermann T, Widmer DS, Civenni G, Burger C, Dummer R, et al. Engineering melanoma progression in a humanized environment in vivo. *J Invest Dermatol*; 2012;132(1):144-53.
110. Khavari P a. Modelling cancer in human skin tissue. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(4):270-80.
111. Ma L, Reinhardt F, Pan E, Soutschek J, Bhat B, Marcusson EG, et al. Therapeutic silencing of miR-10b inhibits metastasis in a mouse mammary tumor model. *Nat Biotechnol*. 2010;28(4):341-7.
112. Ruiz A, Puig S, Malveyh J, Lázaro C, Lynch M, Gimenez-arnau AM, et al. CDKN2A mutations in Spanish cutaneous malignant melanoma families and patients with multiple melanomas and other neoplasia. *J Med Genet*. 1999;36:490-3.
113. Goldstein AM, Chan M, Harland M, Hayward NK, Demenais F, Bishop DT, et al. Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. *J Med Genet*. 2007;44(2):99-106.
114. Larre Borges A, Cuéllar F, Puig-Butillé JA, Scarone M, Delgado L, Badenas C, et al. CDKN2A mutations in melanoma families from Uruguay. *Br J Dermatol*. 2009;161(3):536-41.
115. Grazziotin TC, Rey MCW, Bica CG, Pinto LA, Bonamigo RR, Puig-Butille JA, et al. Genetic variations of patients with familial or multiple melanoma in Southern Brazil. *J Eur Acad Dermatology Venereol JEADV*. 2012;
116. Potrony M, Puig-Butillé JA, Aguilera P, Badenas C, Carrera C, Malveyh J, et al. Increased prevalence of lung, breast, and pancreatic cancers in addition to melanoma risk in families bearing the cyclin-dependent kinase inhibitor 2A mutation: Implications for genetic counseling. *J Am Acad Dermatol*. 2014;018702:1-8.
117. Ciotti P, Struewing JP, Mantelli M, Chompret a, Avril MF, Santi PL, et al. A single genetic origin for the G101W CDKN2A mutation in 20 melanoma-prone families. *Am J Hum Genet*. 2000 Aug;67(2):311-9.
118. Li J, Poi MJ, Tsai M. Regulatory Mechanisms of Tumor Suppressor P16 INK4A and Their. 2011;5566-82.
119. Bastiaens MT, ter Huurne J a, Kielich C, Gruis N a, Westendorp RG, Vermeer BJ, et al. Melanocortin-1 receptor gene variants determine the risk of nonmelanoma skin cancer independently of fair skin and red hair. *Am J Hum Genet*. 2001;68(4):884-94.

120. Valverde Pa, Healy E, Jackson I, Rees JL, Thody AJ. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet.* 1995;11:328.
121. Goldstein AM, Chaudru V, Ghiorzo P, Badenas C, Malveyh J, Pastorino L, et al. Cutaneous phenotype and MC1R variants as modifying factors for the development of melanoma in CDKN2A G101W mutation carriers from 4 countries. *Int J Cancer.* 2007;121(4):825-31.
122. Demenais F, Mohamdi H, Chaudru V, Goldstein a M, Newton Bishop J a, Bishop DT, et al. Association of MC1R variants and host phenotypes with melanoma risk in CDKN2A mutation carriers: a GenoMEL study. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(20):1568-83.
123. Cuéllar F, Puig S, Kolm I, Puig-Butille J, Zaballos P, Martí-Laborda R, et al. Dermoscopic features of melanomas associated with MC1R variants in Spanish CDKN2A mutation carriers. *Br J Dermatol.* 2009;160(1):48-53.
124. Carrera C, Palou J, Malveyh J, Segura S, Aguilera P, Salerni G, et al. Early stages of melanoma on the limbs of high-risk patients: clinical, dermoscopic, reflectance confocal microscopy and histopathological characterization for improved recognition. *Acta Derm Venereol.* 2011;91(2):137-46.
125. Chaudru V, Laud K, Avril M-F, Minière A, Chompret A, Bressac-de Paillerets B, et al. Melanocortin-1 receptor (MC1R) gene variants and dysplastic nevi modify penetrance of CDKN2A mutations in French melanoma-prone pedigrees. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(10):2384-90.
126. Del Rio M, Larcher F, Serrano F, Meana A, Muñoz M, Garcia M, et al. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum Gene Ther.* 2002;13(8):959-68.
127. Meana a, Iglesias J, Del Rio M, Larcher F, Madrigal B, Fresno MF, et al. Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gels. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries.* 1998. p. 621-30.
128. Escámez et al., 2011. Bioengineered skin. In: *Skin Biopsy-Perspectives.* Chapter 14. 261-269. InTech Ed. ISBN: 978-953-307-290-6.
129. Warrick E, Garcia M, Chagnoleau C, Chevallier O, Bergoglio V, Sartori D, et al. Preclinical Corrective Gene Transfer in Xeroderma Pigmentosum Human Skin Stem Cells. *Mol Ther;* 2012;20(4):798-807.
130. Robinson S, Dixon S, August S, Diffey B, Wakamatsu K, Ito S, et al. Protection against UVR involves MC1R-mediated non-pigmentary and pigmentary mechanisms in vivo. *J Invest Dermatol;* 2010;130(7):1904-13.
131. Carrera C, Puig-Butillè J a, Aguilera P, Ogbah Z, Palou J, Lecha M, et al. Impact of sunscreens on preventing UVR-induced effects in nevi: in vivo study comparing protection using a physical barrier vs sunscreen. *JAMA dermatology.* 2013 Jul;149(7):803-13.

132. Aguilera P, Carrera C, Puig-Butille J a, Badenas C, Lecha M, González S, et al. Benefits of oral Polypodium Leucotomos extract in MM high-risk patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013 Sep;27(9):1095-100.
133. Diao DY, Lee TK. Sun-protective behaviors in populations at high risk for skin cancer. *Psychol Res Behav Manag*. 2013;7:9-18.
134. Soyer HP, Lin LL, Prow TW. A Plea for Biobanking of All Equivocal Melanocytic Proliferations. *JAMA dermatology*. 2015;149(9):1023.
135. Larkin J, Ascierto P a., Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF -Mutated Melanoma. *N Engl J Med*. 2014;371(20):1867-76.
136. Dummer R, Goldinger SM, Paulitschke V, Levesque MP. Curing advanced melanoma by 2025. *Curr Opin Oncol*. 2015;27(2):125-7.
137. Marko-Varga G. BioBanking as the central tool for translational medicine CTM issue 2013. *Clin Transl Med*. 2013;2(1):4.
138. Scope A, Busam KJ, Malvey J, Puig S, McClain SA, Braun RP, et al. Ex Vivo Dermoscopy of Melanocytic Tumors. *Arch Dermatol*. 2007;143(12):1548-52.
139. Soyer P, Kenet R, Wolf I. Clinicopathological correlation of pigmented skin lesions using dermoscopy. *Eur J Dermatology*. 2000;10(1):385.
140. Banan P, Lin LL, Lambie D, Prow T, Soyer HP. Effects of Ex Vivo Skin Microbiopsy on Histopathologic Diagnosis in Melanocytic Skin Lesions. *JAMA dermatology*. 2013;149(9):1107-9.
141. Pozzobon FC, Puig-Butillé J a, González-Alvarez T, Carrera C, Aguilera P, Alos L, et al. Dermoscopic criteria associated with BRAF and NRAS mutation status in primary cutaneous melanoma. *Br J Dermatol*. 2014;754-9.
142. Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, Bergman W, Bishop N, Paillerets BB, et al. Geographical Variation in the Penetrance of CDKN2A Mutations for Melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(12):894.
143. Van Der Rhee JI, Krijnen P, Gruis N a., De Snoo F a., Vasen HF a, Putter H, et al. Clinical and histologic characteristics of malignant melanoma in families with a germline mutation in CDKN2A. *J Am Acad Dermatol*; 2011;65(2):281-8.
144. Måsbäck a, Olsson H, Westerdahl J, Sandberg T, Borg a, Jonsson N, et al. Clinical and histopathological features of malignant melanoma in germline CDKN2A mutation families. *Melanoma Res*. 2002;12(6):549-57.
145. Márquez-Rodas I, Martín González M, Nagore E, Gómez-Fernández C, Avilés-Izquierdo JA, Maldonado-Seral C, et al. Frequency and Characteristics of Familial Melanoma in Spain: The FAM-GEM-1 Study. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124239.

146. Jóhannsson O. Tumour Biological Features of BRCA1-induced Breast and Ovarian Cancer. *European Journal of Cancer*. 1997. p. 362-71.
147. Peña-Vilabelda Z, García-casado Z, Requena C, Traves V, Guillén C, Kumar R, et al. Clinical Characteristics of Patients With Cutaneous Melanoma According to Variants in the Melanocortin 1 Receptor Gene. 2014;105(2):159-71.
148. Sargen MR, Kanetsky P a, Newton-Bishop J, Hayward NK, Mann GJ, Gruis N a, et al. Histologic features of melanoma associated with CDKN2A genotype. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(3):496-507.e7.
149. Piras F, Murtas D, Minerba L, Ugalde J, Floris C, Maxia C, et al. Nuclear survivin is associated with disease recurrence and poor survival in patients with cutaneous malignant melanoma. *Histopathology*. 2007. p. 835-42.
150. Ding Y, Prieto VG, Zhang PS, Rosenthal S, Smith KJ, Skelton HG, et al. Nuclear expression of the antiapoptotic protein survivin in malignant melanoma. *Cancer*. 2006. p. 1123-9.
151. Vetter CS, Müller-Blech K, Schrama D, Bröcker EB, Becker JC. Cytoplasmic and nuclear expression of survivin in melanocytic skin lesions. *Archives of dermatological research*. 2005. p. 26-30.
152. Wang X, Moschos SJ, Becker D. Functional analysis and molecular targeting of aurora kinases a and B in advanced melanoma. *Genes Cancer*. 2010;1(9):952-63.
153. Xie L1 MFJ. The pan-Aurora kinase inhibitor, PHA-739358, induces apoptosis and inhibits migration in melanoma cell lines. *Melanoma Res*. 2014;23(2):102-13.
154. Caputo E, Miceli R, Motti ML, Taté R, Fratangelo F, Botti G, et al. Aurka inhibitors enhance the effects of B-RAF and MEK inhibitors in melanoma treatment. *J Transl Med*. 2014 J;12:216.
155. Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, Hughes MC, Hayward NK, Green AC. Re: Melanocytic Nevi, Solar Keratoses, and Divergent Pathways to Cutaneous Melanoma. *CancerSpectrum Knowledge Environment*. 2003. p. 1801-1801.
156. De Vries E, Arnold M, Altsitsiadis E, Trakatelli M, Hinrichs B, Stockfleth E, et al. Potential impact of interventions resulting in reduced exposure to ultraviolet (UV) radiation (UVA and UVB) on skin cancer incidence in four European countries, 2010-2050. *Br J Dermatol*. 2012;167 Suppl (i):53-62.
157. Suppa M, Argenziano G, Moscarella E, Hofmann-Wellenhof R, Thomas L, Catricalà C, et al. Selective sunscreen application on nevi: frequency and determinants of a wrong sun-protective behaviour. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28(3):348-54.
158. Petersen B, Thieden E, Philipsen P a, Heydenreich J, Wulf HC, Young a R. Determinants of personal ultraviolet-radiation exposure doses on a sun holiday. *Br J Dermatol*. 2013;168(5):1073-9.

159. Alcaraz M, Pathak M, Rius F, Kollias N, Gonzalez S. An extract of *Polypodium leucotomos* appears to minimize certain photoaging changes in a hairless albino mouse animal model . A pilot study . *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1999;15(3-4):120-6.
160. Zattra E, Coleman C, Arad S, Helms E, Levine D, Bord E, et al. *Polypodium leucotomos* extract decreases UV-induced Cox-2 expression and inflammation, enhances DNA repair, and decreases mutagenesis in hairless mice. *Am J Pathol*. 2009;175(5):1952-61.
161. El-Haj N, Goldstein N. Sun protection in a pill: the photoprotective properties of *Polypodium leucotomos* extract. *Int J Dermatol*. 2015 Mar;54(3):362-6.
162. Napolitano A, Panzella L, Monfrecola G, d'Ischia M. Pheomelanin-induced oxidative stress: bright and dark chemistry bridging red hair phenotype and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014
163. Pérez Ferriols a, Aguilera J, Aguilera P, de Argila D, Barnadas M a, de Cabo X, et al. Determination of minimal erythema dose and anomalous reactions to UVA radiation by skin phototype. *Actas Dermosifiliogr*. 2014;105(8):780-8.
164. Koch H, Wittern KP BJ. In human keratinocytes the Common Deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be induced by ultraviolet A irradiation . *J Invest Dermatol*. 2001;117(4):892-7.
165. Nestor MS, Berman B, Swenson N. Safety and Efficacy of Oral *Polypodium leucotomos* Extract. *Clin Aesthetic Dermatology*. 2015;8(2):19-23.
166. Smith G, Wilkie MJ V, Deeni YY, Farr PM, Ferguson J, Wolf CR, et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) genotype influences erythematous sensitivity to psoralen-ultraviolet A photochemotherapy. *Br J Dermatol*. 2007 ;157(6):1230-4.
167. Puig-Butillé J a, Carrera C, Kumar R, Garcia-Casado Z, Badenas C, Aguilera P, et al. Distribution of MC1R variants among melanoma subtypes: p.R163Q is associated with lentigo maligna melanoma in a Mediterranean population. *Br J Dermatol*. 2013;169(4):804-11.
168. Cust AE, Goumas C, Holland E a, Agha-Hamilton C, Aitken JF, Armstrong BK, et al. MC1R genotypes and risk of melanoma before age 40 years: a population-based case-control-family study. *Int J Cancer*. 2012;131(3):E269-81.
169. Davies JR, Randerson-moor J, Kukulizch K, Harland M, Kumar R, Madhusudan S, et al. Inherited variants in the MC1R gene and survival from cutaneous melanoma: a BioGenoMEL study. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2011;25:384-94.
170. Barrett JH, Iles MM, Harland M, Taylor JC, Aitken JF, Andresen A, et al. Genome-wide association study identifies three new melanoma susceptibility loci. *Nat Genet*. 2012;43(11):1108-13.
171. Mitra D, Luo X, Morgan A, Wang J, Hoang MP, Lo J, et al. A UV-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the redhair-fairskin background. *Nature*. 2012;491(7424):449-53.

172. Mouret S, Forestier A, Douki T. The specificity of UVA-induced DNA damage in human melanocytes. *Photochem Photobiol Sci.* 2012;11(1):155-62.
173. Abdel-Malek Z a, Swope VB, Starner RJ, Koikov L, Cassidy P, Leachman S. Melanocortins and the melanocortin 1 receptor, moving translationally towards melanoma prevention. *Arch Biochem Biophys*; 2014;1-9.
174. Noonan FP, Zaidi MR, Wolnicka-Glubisz A, Anver MR, Bahn J, Wielgus A, et al. Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment. *Nat Commun*; 2012;3(May):884.
175. Jiang S, Liu X-M, Dai X, Zhou Q, Lei T-C, Beermann F, et al. Regulation of DHICA-mediated antioxidation by dopachrome tautomerase: implication for skin photoprotection against UVA radiation. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(9):1144-51.
176. Kovacs D, Flori E, Maresca V, Ottaviani M, Aspite N, Dell'Anna ML, et al. The eumelanin intermediate 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid is a messenger in the cross-talk among epidermal cells. *J Invest Dermatol.* 2012;132(4):1196-205.
177. Pavey S, Conroy S, Russell T, Gabrielli B. Ultraviolet Radiation Induces p16 CDKN2A Expression in Human Skin. *Cancer Res.* 1999;59:4185-9.
178. Gutschner T, Diederichs S, Rna K. The hallmarks of cancer. A long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.* 2012;9(6):703-19.
179. Ryan BJ, Hoek S, Fon E a, Wade-Martins R. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci.* 2015;2015.
180. Liu R, Gao X, Lu Y, Chen H. Meta-analysis of the relationship between Parkinson disease and melanoma. *Neurology.* 2011;76(23):2002-9.
181. Gao X, Simon KC, Han J, Schwarzschild M a, Ascherio A. Genetic determinants of hair color and Parkinson's disease risk. *Ann Neurol.* 2009;65(1):76-82.
182. Tell-Marti G, Puig-Butille JA, Potrony M, Badenas C, Milà M, Malveyh J, et al. The MC1R melanoma risk variant p.R160W is associated with Parkinson disease. *Ann Neurol.* 2015;77(5):889-94.
183. Res CA, Des CP, Top C, Chem M. Ferulic Acid and Alzheimer ' s Disease : Promises and Pitfalls. *Mini-Reviews Med Chem.* 2015;15(9):776-88.

