



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

# **ESTUDIO DEL PERFIL GENÓMICO Y DE EXPRESIÓN EN CARCINOMAS ESCAMOSOS CUTÁNEOS INTRAEPITELIALES E INVASIVOS**

**Tesis doctoral**

Irene García Díez

Programa de Doctorado en Medicina, Departamento de  
Medicina

Universidad Autònoma de Barcelona (UAB)

2020





Universitat Autònoma de Barcelona

# ESTUDIO DEL PERFIL GENÓMICO Y DE EXPRESIÓN EN CARCINOMAS ESCAMOSOS CUTÁNEOS INTRAEPITELIALES E INVASIVOS

Tesis doctoral presentada por

**Irene García Díez**

Para obtener el título de Doctora

Dirigida por

**Agustí Toll Abelló**

**Inmaculada Hernández Muñoz**

**Ramón M Pujol Vallverdú**

Tutorizada por

**Ramón M Pujol Vallverdú**

Programa de Doctorado en Medicina

Departamento de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

2020



El Dr. AGUSTÍ TOLL ABELLÓ, profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Autònoma de Barcelona, el Dr. RAMÓN PUJOL VALLVERDÚ profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad Autònoma de Barcelona y la Dra. INMACULADA HERNÁNDEZ MUÑOZ, investigadora del Grupo de Investigación en Enfermedades Inflamatorias y Neoplasias Dermatológicas del Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM),

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “ESTUDIO DEL PERFIL GENÓMICO Y DE EXPRESIÓN EN CARCINOMAS ESCAMOSOS CUTÁNEOS INTRAEPITELIALES E INVASIVOS”, presentada por IRENE GARCÍA DÍEZ, para acceder al título de Doctor en Medicina, se ha realizado bajo su dirección, considerando que reúne los requisitos formales y científicos adecuados para su preceptiva lectura y defensas públicas.

Y para que conste a los efectos oportunos, firman la siguiente certificación en Barcelona, el día xx de xxx de 2020.

Irene García Díez (doctoranda)

Agustí Toll Abelló

(director)

Inmaculada Hernández Muñoz

(directora)

Ramón M. Pujol Vallverdú

(director y tutor)



*A mi marido Marco, familia y amigos,  
sin cuyo soporte incondicional no hubiera sido posible la realización de esta tesis.*

*Gracias.*



## Agradecimientos

---

Esta tesis doctoral es fruto del trabajo y de la colaboración de muchas personas a las cuales me gustaría hacer un reconocimiento.

En primer lugar, me gustaría empezar dando las gracias a mis tres directores y tutor, ya que sin ellos no habría sido posible realizar este proyecto.

A Agustí por haberme introducido en el mundo de la investigación del carcinoma escamoso y permitido participar en este estudio. Gracias por tu generosidad, apoyo, ánimos y consejos, estando disponible siempre que lo he necesitado.

A Inma por su generosidad, valiosos consejos y paciencia guiándome a través de los complicados entresijos de la investigación básica.

Ambos habéis conseguido que el arduo trabajo de elaborar una tesis se convirtiera en algo que realmente he podido disfrutar debido a vuestra soporte y calidad como personas.

A Ramón por sus generosos consejos y aportaciones los cuales han mejorado y enriquecido esta tesis doctoral y el presente manuscrito. Muchas gracias por tu trabajo desinteresado y por tu apoyo.

A Evelyn, cuyo trabajo en el laboratorio ha sido crucial para la elaboración de esta tesis. Mil gracias por tu enorme paciencia y explicaciones y por dejarme ayudar (o "desayudar" muchas veces) en el laboratorio. He disfrutado mucho de tu compañía y me has enseñado muchas cosas.

A Eugenia, mi compañera de doctorado en carcinoma escamoso, con la que he podido descargar mis frustraciones y compartir dudas, además de haber

colaborado de manera importante para llevar a cabo el segundo trabajo que compone esta tesis doctoral, por lo cual le estoy muy agradecida.

Al Servicio de Análisis de Microarrays del IMIM por su aportación fundamental al primer trabajo de esta tesis y su amable disponibilidad siempre que he tenido dudas y consultas. También al resto de colaboradores de ambos trabajos por su generosidad a la hora de participar y cedernos muestras de sus pacientes.

Al todo el Servicio de Dermatología del hospital del Mar: personal administrativo, auxiliares, enfermeras, residentes y adjuntos, que forman un gran equipo y que hacen que ir cada día a trabajar sea más fácil y placentero. Especialmente me gustaría agradecer su apoyo, gran paciencia y los buenos momentos vividos juntos a Dani, Laia, Lidia, Nacho, Pablo y Roger.

A todo el equipo (personal administrativo, auxiliares, enfermería) de la planta de especialistas del Poblenou que me acogieron con los brazos abiertos desde el primer día y con las cuales me siento muy afortunada de poder trabajar. Gracias Ana por ser como eres.

A las Laurentys, la Chilanga Banda y a Estrella por acompañarme a lo largo de todo este proceso y ser mi familia de Barcelona durante todos estos años, así como al resto de mis amigos, especialmente a Gemma, Irene y Nuria.

A mi familia de Bilbao y de México, especialmente a mis padres y a mi hermano. También a mi marido, Marco, por estar siempre conmigo y apoyarme y a mi hija Itziar.

Gracias a tod@s.

## Listado de abreviaturas

---

|       |   |
|-------|---|
| ADN   | Ácido desoxirribonucleico   |
| AJCC  | American Joint Committee on Cancer  |
| ARN   | Ácido ribonucleico  |
| ARNip | ARNs pequeños de interferencia  |
| ARNm  | Ácido ribonucleico mensajero  |
| BNC1  | Basonuclina-1   |
| BWH   | Brigham and Women's Hospital  |
| CE    | Carcinoma escamoso  |
| CEC   | Carcinoma escamoso cutáneo  |
| CECM  | Carcinoma escamoso metastásico  |
| CECNM | Carcinoma escamoso no metastásico   |
| EGFR  | Receptor del factor de crecimiento epidérmico                                       |
| EMA   | European Medicines Agency   |
| FDA   | Food and Drug Administration  |
| FDR   | Tasa de falsos rechazos o de descubrimientos falsos ( <i>false discovery rate</i> ) |
| FOSL1 | <i>Fos-related antigen-1</i>  |
| GWAS  | Estudio de asociación del genoma completo ( <i>genome-wide association study</i> )  |

|         |   |
|---------|---|
| H&E     | Hematoxilina y eosina   |
| HSF2BP  | Proteína de unión al factor de transcripción de choque térmico 2  |
| KIN     | Neoplasia intraepidérmica queratinocítica ( <i>Keratinocytic intraepidermal neoplasia</i> )                               |
| LIMMA   | Linear Models for Microarray Data   |
| LOH     | Pérdidas de heterocigosidad ( <i>loss of heterozygosity</i> )   |
| miARNs  | Micro ARNs  |
| NCCN    | National Comprehensive Cancer Network   |
| QA      | Queratosis actínicas  |
| PCR     | Reacción en cadena de la polimerasa   |
| PD-1    | Proteína de muerte celular programada 1   |
| PD-L1   | Ligando de la proteína de muerte programada 1   |
| PF      | Piel fotoexpuesta aparentemente sana  |
| RMA     | Robust multi-chip average   |
| RT-qPCR | PCR cuantitativa por retrotranscripción (Quantitative reverse transcription PCR)  |
| RUV     | Radiación ultravioleta  |
| SNP     | Polimorfismo de un solo nucleótido ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )  |
| SORIs   | Regiones más pequeñas superpuestas de desequilibrio genómico ( <i>smallest overlapping regions of genomic imbalance</i> ) |

|                |   |
|----------------|---|
| TEM            | Transición epitelio mesénquima                  |
| TGF- $\beta$ 1 | Factor de crecimiento Transformante Beta 1      |
| TMA            | Microarray tisular ( <i>tissue microarray</i> ) |
| TNF- $\alpha$  | Factor de necrosis tumoral $\alpha$             |
| VIH            | Virus de la inmunodeficiencia humana            |
| VPH            | Virus del papiloma humano                       |



# Índice

---

|  |    |
|--|----|
| Resumen .....                              | 1  |
| Abstract .....                             | 4  |
| 1. Introducción .....                      | 9  |
| 1.1. Epidemiología                         | 11 |
| 1.2. Patogénesis                           | 12 |
| 1.3. Factores de riesgo                    | 16 |
| 1.4. Diagnóstico clínico e histopatológico | 19 |
| 1.5. Factores pronósticos                  | 21 |
| 1.5.1. Factores clínicos                   | 22 |
| 1.5.2. Factores histopatológicos           | 22 |
| 1.5.3. Biomarcadores                       | 25 |
| 1.6. Estadificación                        | 27 |
| 1.7. Tratamiento                           | 29 |
| 2. Hipótesis.....                          | 33 |
| 3.    Objetivos .....                      | 37 |
| 3.1. Objetivo principal                    | 39 |
| 3.2. Objetivos secundarios                 | 39 |
| 4.    Material y métodos.....              | 41 |
| 4.1. Pacientes y muestras de tejidos       | 43 |
| 4.2. Análisis de la expresión génica       | 45 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.3. Análisis del número de copias de ADN  | 46  |
| 4.4. Análisis de integración   | 47  |
| 4.5. PCR cuantitativa por retrotranscripción (RT-qPCR)                               | 47  |
| 4.6. Inmunohistoquímica  | 48  |
| 4.7. Cultivos celulares, extracción de proteínas, Western blot y citometría de flujo | 49  |
| 4.8. Pacientes y muestras de tejidos   | 50  |
| 4.9. Evaluación histopatológica  | 51  |
| 4.10. Evaluación inmunohistoquímica  | 52  |
| 4.11. Análisis estadístico   | 53  |
| 5. Resultados.....   | 55  |
| 5.1. Análisis del transcriptoma  | 57  |
| 5.2. Análisis del número de copias de ADN  | 63  |
| 5.3. Integración de los análisis del transcriptoma y del número de copias            | 65  |
| 5.4. NEK10 regula la progresión del ciclo celular en respuesta al daño al ADN        | 67  |
| 5.5. Hallazgos clínicos e histopatológicos   | 70  |
| 5.6. Expresión de PD-L1 y CD8 en los tumores primarios                               | 71  |
| 5.7. Expresión de PD-L1 y CD8 en los CECM y sus metástasis                           | 75  |
| 6. Discusión.....  | 79  |
| 7. Conclusiones.....   | 105 |

|  |     |
|--|-----|
| 8. Líneas de futuro.....   | 109 |
| 9. Bibliografía.....   | 113 |
| 10. Anexos.....  | 155 |
| 10.1. ANEXO 1: Publicaciones relacionadas  | 157 |
| 10.1.1. Artículo 1   |     |
| Transcriptome and cytogenetic profiling analysis of matched in<br>situ/invasive cutaneous squamous cell carcinomas from<br>immunocompetent patients. | 157 |
| 10.1.2. Artículo 2   |     |
| PD-L1 Expression is Increased in Metastasizing Squamous Cell<br>Carcinomas and Their Metastases.   | 169 |
| 10.1.3. Material suplementario artículo 1  | 170 |



El carcinoma escamoso cutáneo (CEC) es el segundo tumor maligno cutáneo más frecuente. La mayoría de los CECs se desarrollan a partir de lesiones precursoras (queratosis actínicas ([QA]). Sin embargo, sólo una minoría de QAs evolucionan a CECs, sin que se conozcan de forma precisa los mecanismos que participan en dicha transformación.

A pesar de que en la mayoría de los casos el pronóstico del CEC es excelente, existe un pequeño grupo de tumores considerados de alto riesgo (metastásicos o localmente avanzados) que presentan una evolución agresiva y mal pronóstico. En la actualidad no existen biomarcadores fiables en la práctica clínica que permitan detectar los CECs con mayor riesgo metastásico. Se ha propuesto que la expresión de PD-L1 por las células tumorales podría ser un marcador pronóstico en distintos tumores, si bien su utilidad en el CEC no ha sido previamente estudiada, distintos ensayos clínicos con nuevos fármacos dirigidos frente al eje PD1/PD-L1 en CECs han mostrado resultados esperanzadores.

El objetivo de esta tesis es valorar los mecanismos moleculares implicados en las distintas etapas de la carcinogénesis del CEC (desde la piel sana fotoexpuesta [PF] hasta el CEC metastásico) con la finalidad de identificar los genes y las vías moleculares implicadas en su progresión y determinar posibles factores pronósticos.

En la primera parte de este trabajo estudiamos las diferencias transcripcionales y genómicas en PFs, QAs y CECs a partir de 30 muestras apareadas por paciente,

analizadas utilizando plataformas de *arrays*. Los resultados obtenidos se confirmaron por técnicas de RT-qPCR, inmunohistoquímica y *Western blot*. Identificamos dos factores de transcripción, BNC1 y FOSL1, cuya expresión se hallaba aumentada en el CEC y que podrían actuar como genes esenciales en la transformación tumoral. La integración de los datos obtenidos en los estudios de transcriptómica y de genómica reveló que las alteraciones en el número de copias del gen NEK10 se correlacionaban con los niveles de expresión de NEK10. Este gen codifica una quinasa relacionada con el gen NIMA (“Never in Mitosis gene A”), localizada dentro una región de pequeño tamaño en la banda 3p24.1, delecionada en 7 de los 10 CECs estudiados. Mediante técnicas inmunohistoquímicas y *Western blot* confirmamos la pérdida progresiva de la expresión de NEK10 desde la PF hasta el CEC y la práctica de estudios funcionales permitió demostrar su participación en la regulación del ciclo celular en células epiteliales HaCaT. Todo ello apoyaría el papel de NEK10 como gen supresor tumoral en el CEC.

En la segunda parte de este trabajo evaluamos el valor pronóstico de los niveles de PD-L1 en el CEC, analizando su expresión mediante inmunohistoquímica en 99 CECs primarios con metástasis linfáticas (n=48) y sin metástasis (n=51) y en 24 metástasis linfáticas. Detectamos una asociación entre la expresión de PD-L1 por  $\geq 1\%$  de las células tumorales y la presencia de metástasis linfáticas, así como con la recurrencia, una mala diferenciación histopatológica y la presencia de invasión perineural. En la mayoría de los casos (90%) existía una buena concordancia en la expresión de PD-L1 entre los CEC primarios y sus metástasis, con una tendencia hacia una mayor expresión en las últimas. No encontramos diferencias entre los tres tipos de muestras analizadas con respecto a la expresión de PD-L1 o de CD8

por las células del infiltrado peritumoral. Nuestros resultados sugieren que PD-L1 podría ser un biomarcador útil con posible valor pronóstico en el CEC.

Cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) is the second most common skin cancer. Most cSCCs develop from precursor lesions (actinic keratosis [AK]). However, only a minority of AKs will eventually progress into cSCCs and the key mechanisms for this transformation remain unclear.

Although in most cases the prognosis of cSCC is excellent, there is a small percentage of tumors with high metastatic risk. Metastatic or locally advanced cSCCs have high mortality, with no effective treatments available. Unfortunately, there is a lack of reliable biomarkers in clinical practice for detecting those cSCCs with the highest metastatic risk. Expression of PD-L1 by tumor cells has been proposed as a prognostic marker in different tumors. While the usefulness of PD-L1 expression in cSCC has not been addressed yet, new drugs aimed to block the PD1/PD-L1 axis are showing encouraging results in clinical trials in cSCC.

The objective of this thesis is to evaluate the molecular mechanisms involved in the different stages of cSCC carcinogenesis (from healthy sun-exposed skin to metastatic cSCC) in order to identify the genes and molecular pathways involved, and their putative role as prognostic biomarkers.

In the first part of this work we studied the differences in the transcriptome and the genome of sun-exposed skin, AKs and cSCCs of 30 samples matched by patient, using different array platforms. The results obtained were confirmed by quantitative RT-PCR, immunohistochemistry, and Western blot. We detected two transcription factors, BNC1 and FOSL1, whose expression was increased in cSCC and that could contribute to cSCC development. Additionally, a strong correlation between copy

numbers and gene expression of NEK10 was identified by integrating the transcriptomic and genomic array data. NEK10 gene encodes a NIMA (“Never in Mitosis gene A”) related kinase, located within a small region in the 3p24.1 band, which was found to be deleted in 7 out of 10 cSCCs studied. By immunohistochemistry and Western blot, we confirmed the progressive loss of NEK10 from sun-exposed skin to cSCC and functional studies demonstrated the role of NEK10 in the regulation of the cell cycle in the epithelial HaCaT cells. These data support the role of NEK10 as a tumor suppressor gene in cSCC.

In the second part of this work we evaluated the usefulness of PD-L1 expression, determined by immunohistochemistry, as a prognostic marker in cSCC. PD-L1 expression was analyzed in ninety-nine primary cSCCs with lymphatic metastases (n = 48) and without metastases (n = 51), and 24 metastases. An association between PD-L1 expression by  $\geq 1\%$  of tumor cells and the presence of lymphatic metastases, as well as with recurrence, poor histopathological differentiation and perineural invasion was detected. In most cases (90%), PD-L1 expression remained constant between primary cSCCs and their metastases, with a trend towards a higher expression in the latter. No differences among the three types of samples analyzed with respect to the expression of PD-L1 or CD8 by the cells of the peritumoral infiltrate were found. Our results suggest that PD-L1 could be useful as a prognostic biomarker in cSCC.



*“Toda nuestra ciencia, comparada con la realidad,  
es primitiva e infantil...y sin  
embargo es lo máspreciado que tenemos.”*

ALBERT EINSTEIN (1879-1955)



## 1. Introducción

---



### 1.1. Epidemiología

El carcinoma escamoso cutáneo (CEC) es el segundo tumor maligno cutáneo más prevalente, siendo la neoplasia cutánea con potencial metastásico más frecuente, y con una incidencia global en aumento.<sup>1,2</sup> La incidencia estandarizada por edad del CEC en Europa oscila entre 9 y 96 por 100.000 habitantes en hombres y entre 5 y 68 por 100.000 habitantes en mujeres según distintos estudios.<sup>3-5</sup> En un metaanálisis reciente se estimó una tasa de incidencia global en España de 38,16/100.000 personas-año.<sup>6</sup> Afecta principalmente a hombres (relación ♂/♀ 3:1) de raza caucásica y edad avanzada (edad media de 65 años).<sup>1,2</sup>

El CEC sigue habitualmente una evolución benigna, con una supervivencia a los 5 años de aproximadamente un 90% tras la exéresis quirúrgica.<sup>7</sup> Aunque sus tasas de mortalidad no están bien definidas, se considera que la tasa global del CEC junto con el carcinoma basocelular es de aproximadamente 0,52/100.000 en los países desarrollados, pudiéndose atribuir probablemente la mayoría de estas muertes al CEC.<sup>8</sup> El CEC produce metástasis ganglionares únicamente en un 4% de los casos, habitualmente en los ganglios linfáticos regionales o metástasis cutáneas en tránsito (satelitosis).<sup>9</sup> A pesar de su baja frecuencia, el pronóstico es malo, con una tasa de supervivencia menor del 20% a los 10 años.<sup>10</sup> Su elevada prevalencia condiciona que, a pesar de ser una neoplasia con un pronóstico excelente, un número no despreciable de pacientes desarrollen metástasis ganglionares o mueran por la enfermedad. En un estudio realizado en Estados Unidos en 2012 por Karia y cols., el total de muertes por CEC en el sur y centro del país se aproximaba a las causadas por melanoma y por otras neoplasias malignas orofaríngeas o renales,<sup>11</sup> y los autores destacaban el considerable coste económico que ocasionan estos tumores.<sup>12</sup>

### 1.2. Patogénesis

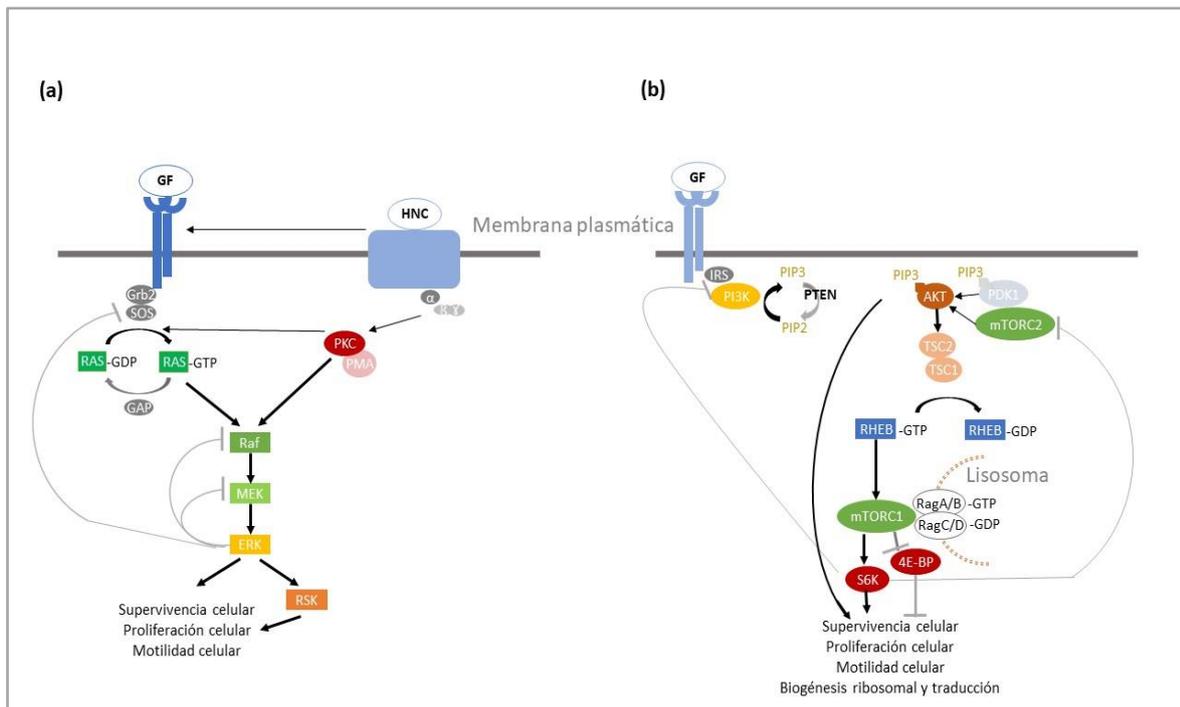
El CEC es una proliferación maligna de los queratinocitos de la epidermis o de sus anejos. En la gran mayoría de los casos se desarrolla a partir de lesiones premalignas (queratosis actínicas [QA]), aunque también puede aparecer de *novo* sobre piel aparentemente sana o sobre piel crónicamente dañada.<sup>10,13</sup> La progresión a CEC desde la QA parece seguir el modelo clásico de carcinogénesis en múltiples etapas.<sup>13</sup>

El CEC es un tumor muy heterogéneo, con mutaciones en múltiples genes, siendo la neoplasia maligna con mayor carga de mutaciones somáticas.<sup>14</sup> El gen supresor tumoral *TP53* es el gen más frecuentemente mutado y la mayoría de las mutaciones son transiciones CC→TT o C→T de dos o un nucleótido en las bases de pirimidina inducidas por la radiación ultravioleta (RUV) tipo B (UVB), también conocidas como *UVB signature*.<sup>15,16</sup> La inactivación de *TP53* da lugar a una inestabilidad genómica que permite la acumulación de mutaciones simples inducidas por la RUV en oncogenes con relevancia biológica.<sup>14</sup> Las mutaciones en *TP53* son compartidas por las QAs y también se detectan, aunque en menor número, en piel fotoexpuesta aparentemente sana (PF).<sup>13,17</sup>

Otras mutaciones frecuentes presentes en los CEC previamente descritas en la literatura y en el catálogo de mutaciones somáticas en cáncer (COSMIC, Instituto Sanger) afectan a los siguientes genes: *CDKN2A*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *KMT2C*, *KMT2D* y *RAS*.<sup>18-20</sup> Las mutaciones en *NOTCH1*, *NOTCH2* y *RAS* se han detectado en la PF y en las QAs, lo que sugiere que la función de estos genes es importante

en fases precoces del desarrollo del CEC, pero que serían necesarias mutaciones adicionales para la transformación tumoral del queratinocito.<sup>2,21–24</sup>

Respecto a las alteraciones de distintas vías moleculares, las vías de señalización del receptor de EGF, el EGFR, y que incluyen las cascadas RAS/RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR, son esenciales en la carcinogénesis del CEC (**figura 1**).<sup>19,20,24–26</sup>



**Figura 1. Componentes principales de las vías RAS-MAPK y PI3K-mTOR.** Ambas vías responden a estímulos extra e intracelulares para controlar la supervivencia, proliferación, motilidad y metabolismos celulares.<sup>27</sup> (Fuente de la imagen: modificado de Mendoza MC.y cols. The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. Trends Biochem Sci 2011; 36: 320-8.)

Además de mutaciones en numerosos genes, tanto las QAs como los CECs presentan múltiples alteraciones cromosómicas (ganancias o deleciones), aunque éstas son significativamente más frecuentes en el CEC.<sup>28,29</sup> Al igual que con las mutaciones somáticas, Ashton y cols. observaron, mediante la técnica de

hibridación genómica comparada, patrones de aberraciones cromosómicas similares entre QAs y CECs, tales como ganancias en los brazos de los cromosomas 3q, 4p, 17q, 5p, 9q y pérdidas regionales en 3p, 4q, 9p, 11p, 13q y 17p.<sup>29</sup> Estas alteraciones cromosómicas, al igual que las mutaciones somáticas, podrían estar inducidas por la RUV.<sup>30</sup> Asimismo, mediante el uso de paneles de marcadores de polimorfismos de microsatélites se han observado pérdidas de heterocigosidad (*loss of heterozygosity* o LOH) en ambas patologías, siendo algunas de estas LOHs comunes a ambas. En las QAs se han detectado pérdidas de heterocigosidad en los loci 3p, 9p, 9q, 13q, 17p y 17q,<sup>31,32</sup> mientras que los loci afectados en el CEC suelen ser 13q, 9p, 17p, 17q y 3p.<sup>33,34</sup> Las LOH se han relacionado con la pérdida de genes supresores tumorales tales como CDKN2A.<sup>35</sup> En los últimos años han surgido nuevas técnicas más sensibles para el estudio de las alteraciones en el número de copias del ADN, como los *microarrays* basados en polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), que facilitan la identificación precisa y rápida de cambios alélicos, incluyendo la LOH.<sup>33</sup>

A pesar de las alteraciones genéticas comunes observadas entre QAs y CECs, sólo una minoría de QAs progresarán a CEC (entre 0.025% y 16% por lesión individual por año), siendo aún desconocidos los mecanismos claves implicados en dicha transformación/evolución.<sup>13</sup>

Por otro lado, distintos estudios del transcriptoma mediante *microarrays* de ARN han demostrado que, si bien tanto las QAs como los CECs presentan diferencias en su perfil de expresión genética, también comparten la activación de una serie de vías comunes.<sup>28,36,37</sup> Algunos de los genes involucrados muestran un espectro continuo en su regulación (infra o sobreexpresados) desde PF a QA y CEC,

apoyando la teoría de un origen común para ambas lesiones.<sup>36</sup> A pesar de que estas plataformas de *microarrays* han permitido el estudio simultáneo de la expresión de miles de genes, existe, en general, un bajo consenso entre los distintos estudios para los genes expresados diferencialmente, lo cual pone en duda su validez y relevancia biológica.<sup>38</sup>

En cuanto al CEC metastásico, nuestro conocimiento sobre las bases moleculares y genéticas es todavía muy limitado, no habiéndose descrito firmas moleculares clínicamente relevantes y reproducibles que puedan predecir el potencial metastásico de un CEC primario.<sup>39</sup> Estudios realizados en CECs primarios que habían dado lugar a metástasis han observado algunas alteraciones epigenéticas como la hipermetilación del gen *FRZB*<sup>40</sup> y una elevada carga de mutaciones en distintos genes clásicamente asociados con cáncer: *TP53*, *CDKN2A*, *NOTCH1*, *AJUBA*, *HRAS*, *CASP8*, *FAT1*, *KMT2C (MLL3)*, *NOTCH2*, *PARD3*, *RASA1*, *KMT2C* y *KMT2D*.<sup>20,41</sup> De forma similar al CEC invasivo, predominan las mutaciones inactivantes en genes supresores tumorales. Respecto a mutaciones activadoras, en un estudio realizado en 29 muestras correspondientes a metástasis ganglionares de CECs, se observó que el 49% de las muestras presentaba mutaciones en genes asociados a la vía RAS/RTK/PI3K, tales como *PIK3CA*, *FGFR3*, *BRAF* y *EGFR*.<sup>19</sup>

En CECs metastásicos, Lambert y cols. detectaron un elevado número de microdeleciones y mutaciones somáticas en el gen receptor tipo D de la proteína tirosina fosfatasa o *protein tyrosine phosphatase receptor Type D (PTPRD)*, que podría actuar como gen supresor tumoral.<sup>42</sup>

Finalmente, distintos mecanismos de regulación epigenética como la metilación, los micro ARNs (miARNs) y los ARN largos no codificantes, también participan en la carcinogénesis del CEC.<sup>13</sup> Se han detectado asimismo alteraciones del microambiente tumoral, de la composición de la membrana basal y de la matriz extracelular dérmica o de las células inflamatorias, que también participarían en el crecimiento y la progresión del CEC en sus distintas etapas.<sup>43</sup>

### 1.3. Factores de riesgo

Se han descrito distintos factores de riesgo para el desarrollo de un CEC. Sin embargo, una exposición solar prolongada, la edad avanzada, la piel clara (fototipos bajos) y una situación de inmunosupresión continuada constituyen los factores más relevantes implicados en la progresión del CEC.<sup>2</sup>

- **Exposición solar:** La exposición acumulada a la RUV es el factor de riesgo ambiental más importante para el desarrollo del CEC.<sup>10,44</sup> La mayoría de los CECs aparecen sobre áreas fotoexpuestas tales como la frente, la cara, el cuello y el dorso de las manos. Una exposición continua a la RUV explica el aumento progresivo de la incidencia del CEC con la edad y su mayor prevalencia en individuos con fototipos más bajos (I y II).<sup>44,45</sup> De la misma manera, la incidencia de CEC es mayor en países de latitudes bajas y en individuos que realizan su actividad al aire libre.<sup>44,45</sup>
- **Inmunosupresión:** Los pacientes en situaciones de inmunosupresión crónica (incluyendo individuos con una infección por VIH, con neoplasias hematológicas, trasplantados de órganos sólidos u otras enfermedades que

requieran terapia inmunosupresora prolongada) presentan un mayor riesgo para desarrollar CEC, habitualmente de evolución agresiva.<sup>46-49</sup> Los pacientes trasplantados de órgano sólido presentan un riesgo de entre 65 y 250 veces superior para desarrollar un CEC en relación a la población general. Presentan asimismo una mayor frecuencia de recurrencias locales, metástasis y muerte relacionada con la enfermedad.<sup>49</sup> En los pacientes con CEC metastásico la inmunosupresión se asocia con una menor supervivencia.<sup>50,51</sup>

- **Virus del papiloma humano (VPH):** El VPH se ha relacionado con el CEC principalmente en las localizaciones periungueal y genital.<sup>2</sup> Los subtipos de VPH más comúnmente detectados, tanto en el CEC como en sus lesiones precursoras, son del grupo de VPH- $\beta$ .<sup>52,53</sup> Se ha demostrado la participación del VPH en el desarrollo de CECs en pacientes inmunodeprimidos y con epidermodisplasia verruciforme, aunque no se ha establecido de forma definitiva su papel etiológico en los CECs de pacientes inmunocompetentes.<sup>54</sup> Probablemente el VPH actuaría como un cofactor junto a la RUV en la etapa de inducción del CEC, a través de una acción directa sobre distintas proteínas, incluyendo pRb, p53 y Notch.<sup>55,56</sup>
- **Enfermedades genéticas:** Existen muchas enfermedades genéticas asociadas a un mayor riesgo para desarrollar un CEC. En estos procesos, los tumores aparecen en edades más tempranas y presentan una evolución más agresiva. Incluyen distintos síndromes con defectos en los mecanismos de protección (el albinismo óculo-cutáneo, vitíligo), de reparación del ADN (xeroderma pigmentoso, disqueratosis congénita) frente a la RUV o de protección frente al VPH (epidermodisplasia verruciforme), etc.<sup>45</sup> Otros síndromes, como la epidermólisis ampollosa (principalmente su variante distrófica), a partir de

mecanismos probablemente distintos (inflamación crónica) también se asocian a un mayor riesgo para desarrollar un CEC.<sup>57</sup>

- **Otros factores ambientales distintos a la RUV:** La exposición a la radiación ionizante se ha relacionado con la aparición de CEC. También la exposición a ciertos compuestos químicos como el arsénico, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las nitrosaminas y los agentes alquilantes, a menudo a partir de una exposición ocupacional.<sup>2,10,45</sup>
- **Procesos inflamatorios crónicos de la piel:** El CEC puede desarrollarse sobre zonas de piel con procesos inflamatorios crónicos de larga duración, tales como úlceras, cicatrices, quemaduras, trayectos fistulosos, radiodermatitis o ciertas dermatosis inflamatorias crónicas (liquen escleroso y atrófico, lupus eritematoso discoide crónico, lupus vulgar, etc.).<sup>10</sup> Los CEC que surgen sobre estas lesiones estarían asociados a una mayor agresividad, con frecuentes recurrencias y un riesgo metastásico elevado.<sup>2,7</sup>
- **Fármacos:** Los inhibidores de BRAF, que se utilizan para el tratamiento del melanoma metastásico, se han relacionado con el desarrollo de CECs con un número inusualmente alto de mutaciones en el oncogén *RAS* (41-60% frente 3-30% en el CEC no relacionado con la inhibición de BRAF), principalmente en *HRAS*.<sup>58</sup> Asimismo los inhibidores de JAK como el ruxolitinib también se han asociado con un mayor riesgo para desarrollar CECs.<sup>59,60</sup> Finalmente, se ha descrito un rápido desarrollo de CECs en pacientes con psoriasis y artritis reumatoide en tratamiento con el antagonista del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) etanercept.<sup>61,62</sup>

### 1.4. Diagnóstico clínico e histopatológico

La QA representa la lesión precursora por excelencia del CEC. Algunos autores identifican la queratosis actínica como una lesión precursora pero distinta del CEC, mientras que otros la consideran un sinónimo del CEC in situ.<sup>63-65</sup> En la mayoría de los CEC invasivos pueden identificarse lesiones equivalentes a CEC in situ (o QAs) en los bordes de la lesión.<sup>65</sup> Las QAs pueden involucionar, persistir o evolucionar a un CEC invasivo, con una frecuencia variable de entre el 0.025% al 20% por año.<sup>10</sup>

Clínicamente las QAs son pápulas o placas descamativas, de color carne o eritematosas, en ocasiones pigmentadas, con una textura rasposa, habitualmente más palpables que visibles. En algunos casos, desarrollan una intensa hiperqueratosis lo que les confiere una apariencia de cuerno cutáneo. Suelen ser asintomáticas, aunque ocasionalmente pueden ser discretamente pruriginosas.<sup>63</sup>

Histológicamente las QAs se caracterizan por una proliferación intraepidérmica de queratinocitos atípicos que puede afectar a las distintas capas de la epidermis. La epidermis puede ser acantótica o atrófica y con frecuencia se asocia con una alteración de la maduración epidérmica con hiperqueratosis y paraqueratosis. Las células neoplásicas muestran una pérdida de la polaridad, pleomorfismo nuclear y frecuentes figuras de mitosis. En muchos casos la dermis subyacente muestra una intensa elastosis solar y un discreto infiltrado inflamatorio acompañante.<sup>63</sup>

Se han descrito distintos sistemas de clasificación de las QAs en base a criterios tanto clínicos como histopatológicos. Siguiendo los sistemas de clasificación utilizados en la neoplasia intraepitelial de cérvix y de vagina a partir del concepto de neoplasia intraepitelial, Cockerell y cols. propusieron la clasificación de las QAs, también denominadas neoplasias queratinocíticas intraepidérmicas (*keratinocytic*

*intraepidermal neoplasia* [KIN]), en 3 subgrupos (KIN 1, KIN 2 y KIN 3) en función de la ocupación por los queratinocitos atípicos del 1/3 basal, 2/3 o de todo el espesor de la epidermis.<sup>66</sup>

La enfermedad de Bowen representa otro subtipo de CEC *in situ*.<sup>10</sup> Suele observarse en individuos ancianos y clínicamente suele presentarse como una placa eritemato-descamativa de bordes bien definidos, persistente y de tamaño y localización variables (habitualmente en zonas no fotoexpuestas). Presenta unas características histopatológicas bien definidas que permiten diferenciarla de las QAs.<sup>67</sup>

Un CEC puede desarrollarse a partir de una QA (lo más frecuente) o como una lesión *de novo* sobre una piel fotoexpuesta en forma de una placa o nódulo asintomático de crecimiento progresivo.<sup>45</sup> El diagnóstico diferencial incluye lesiones tales como el queratoacantoma, el fibroxantoma atípico, las verrugas víricas y el melanoma amelanótico.<sup>45</sup>

El diagnóstico de CEC invasivo se establece a partir de las características clínicas y el estudio histopatológico, observándose una proliferación de células epiteliales atípicas formada por cordones y nidos celulares de origen habitualmente epidérmico, y ocasionalmente folicular, que invaden la dermis subyacente.<sup>68</sup> Las células neoplásicas presentan un citoplasma eosinófilo abundante y un núcleo grande, a menudo vesicular. Pueden mostrar un fenómeno de queratinización celular individual. Suele observarse asimismo una queratinización intratumoral de grado variable, disqueratosis y la formación de perlas córneas. Habitualmente se clasifican histológicamente según el grado de diferenciación, variando desde lesiones bien diferenciadas con queratinización prominente hasta formas

pobremente diferenciadas, con abundante atipia y mitosis y con ausencia o escasos signos de queratinización.<sup>45</sup>

Se han descrito distintos subtipos histológicos de CEC invasivo: verrucoso, de células fusiformes, desmoplásico, acantolítico, adeno-escamoso y el CEC semejante a linfopitelioma.<sup>68</sup> Algunas de estas variantes se han asociado con un peor pronóstico.

### 1.5. Factores pronósticos

A pesar de que la mayoría de los CEC presentan un pronóstico excelente, existe un subtipo conocido como CEC de alto riesgo que se asocia a un comportamiento más agresivo, con elevada frecuencia de recurrencias, metástasis (hasta en un 37%) y una mayor tasa de mortalidad.<sup>69,70</sup>

Se han descrito distintos factores clínicos, histológicos y moleculares asociados a este subtipo de alto riesgo (**tabla 1**). Existe una cierta variabilidad con respecto a los factores asociados a mal pronóstico en las distintas guías y estudios. Sin embargo, los principales factores considerados de mal pronóstico incluyen la inmunosupresión, el diámetro tumoral > 2 cm, la localización en el pabellón auricular o el labio, los tumores recurrentes, el grosor tumoral > 6 mm, un pobre grado de diferenciación y la presencia de infiltración perineural.<sup>2,7,45,51,70-72</sup>

### 1.5.1. Factores clínicos

- **Diámetro tumoral:** Es el factor de riesgo más fuertemente asociado al riesgo de muerte específica por enfermedad.<sup>73</sup> El diámetro superior a 20 mm se ha asociado a un riesgo aumentado de recurrencias y de metástasis.<sup>74–77</sup>
- **Localización tumoral:** El riesgo de recurrencia y de metástasis del CEC varía en función de la localización, siendo los sitios considerados de mayor riesgo el labio y la oreja.<sup>74,75,77</sup> La National Comprehensive Cancer Network (NCCN) clasifica el riesgo de los tumores en función de la localización, separándolos en 3 zonas: H de *High* o alto riesgo (áreas de máscara de la cara, los genitales, las manos y los pies), M de *Medium* o riesgo medio (mejillas, frente, cuero cabelludo, cuello y localización pretibial) y L de *Low* o bajo riesgo (tronco y resto de las extremidades).<sup>72</sup>
- **Tumores recurrentes:** Aproximadamente el 75% de las recurrencias aparecerán dentro de los 2 años siguientes al diagnóstico.<sup>45</sup> Los CEC recurrentes son biológicamente más agresivos, con un riesgo aumentado de metástasis.<sup>70,78</sup> Además, tienen tendencia a presentar mayor tamaño e invasión en profundidad (más allá del tejido celular subcutáneo), perineural y linfovascular.<sup>79</sup>

### 1.5.2. Factores histopatológicos

- **Grosor tumoral:** El grosor tumoral es el factor de riesgo más relevante asociado con recurrencias y metástasis.<sup>70,73,75,79,80</sup> En algunos estudios se ha evidenciado un riesgo de metástasis prácticamente nulo en tumores con un grosor  $\leq 2$  mm y de casi un 16% en CECs con un grosor  $\geq 6$  mm.<sup>75</sup> En una revisión sistemática

reciente de 23 estudios se evidenció que tanto el grosor > 6 mm como el diámetro tumoral > 2 cm se asociaban con una mayor tendencia a presentar un ganglio centinela positivo.<sup>76</sup> Los tumores con un grosor  $\geq$  6 mm presentan un riesgo aumentado de muerte específica por enfermedad.<sup>51,79</sup>

- **Invasión perineural y linfovascular:** La incidencia de invasión perineural en el CEC varía del 2 al 16%.<sup>2</sup> La afectación perineural es un marcador pronóstico tanto de recurrencia local como de riesgo metastásico y muerte específica de enfermedad.<sup>51,73,77,81,82</sup> Los dos sistemas de estadiaje tumoral que se utilizan habitualmente en el CEC, el AJCC-8 y el BWH (American Joint Committee on Cancer y Brigham and Women's Hospital, respectivamente) incluyen como factor de riesgo la afectación de nervios de un calibre igual o mayor de 0,1 mm.<sup>83,84</sup>

La **invasión linfovascular** también se ha relacionado en algunos estudios con un peor pronóstico,<sup>77,85</sup> aunque su impacto en la supervivencia es controvertido,<sup>77,79</sup> no habiéndose incluido dentro de las clasificaciones AJCC-8 y BWH.

- **Grado de diferenciación:** A la hora de realizar el estudio histopatológico del CEC se aconseja que el patólogo informe el grado de diferenciación histológica del mismo (bien diferenciado, moderadamente diferenciado, mal diferenciado e indiferenciado).<sup>9,45</sup> Los tumores mal diferenciados se han asociado con mayor riesgo metastásico, mortalidad y recurrencias.<sup>73,75,77,86,87</sup>
- **Subtipo histológico:** Algunos subtipos histológicos de CEC conllevan mal pronóstico. La variante desmoplásica del CEC se ha asociado con un mayor riesgo de recurrencias (diez veces mayor) y de metástasis (seis veces mayor)<sup>75,88</sup> respecto a otras variantes de CEC.<sup>89</sup> Este subtipo histológico se

caracteriza por un crecimiento altamente infiltrativo con frecuente distribución perivascular y perineural, junto con abundante cantidad de estroma y delgados cordones celulares.<sup>45</sup> En un estudio reciente realizado en 2.149 CEC invasivos la desmoplasia se asoció con mayor riesgo de muerte específica de enfermedad.<sup>51</sup>

- **Otras variantes histológicas** del CEC consideradas de mal pronóstico son la acantolítica, la adeno-escamosa y el CEC de células fusiformes que aparece sobre una zona previamente irradiada.<sup>45</sup>

**Tabla 1.** Resumen de los factores clínicos e histológicos que definen la variante de alto riesgo del CEC.

| Factores clínicos   |
|---|
| ✓ Inmunosupresión<br>Trasplantados de órgano sólido, enfermedades hematológicas             |
| ✓ Enfermedades genéticas  |
| ✓ Tumores sobre piel crónicamente dañada<br>Úlceras, cicatrices, quemaduras...              |
| ✓ Diámetro tumoral >20 mm   |
| ✓ Localización tumoral<br>Labio, oreja, zona H  |
| ✓ Tumores recurrentes   |
| Factores histológicos   |
| ✓ Grosor tumoral $\geq 6$ mm  |
| ✓ Invasión perineural nervios $\geq 0,1$ mm   |
| ✓ Invasión linfovascular  |
| ✓ Tumores mal diferenciados   |
| ✓ Subtipo histológico<br>Desmoplásico, acantolítico, adeno-escamoso, pseudoangiosarcomatoso |

### 1.5.3. Biomarcadores

Existe un déficit importante de biomarcadores útiles en la práctica clínica para determinar el potencial metastático del CEC primario. La elevada carga mutacional de la PF ha dificultado la identificación de genes con relevancia biológica en la enfermedad invasiva y potencial metastático.

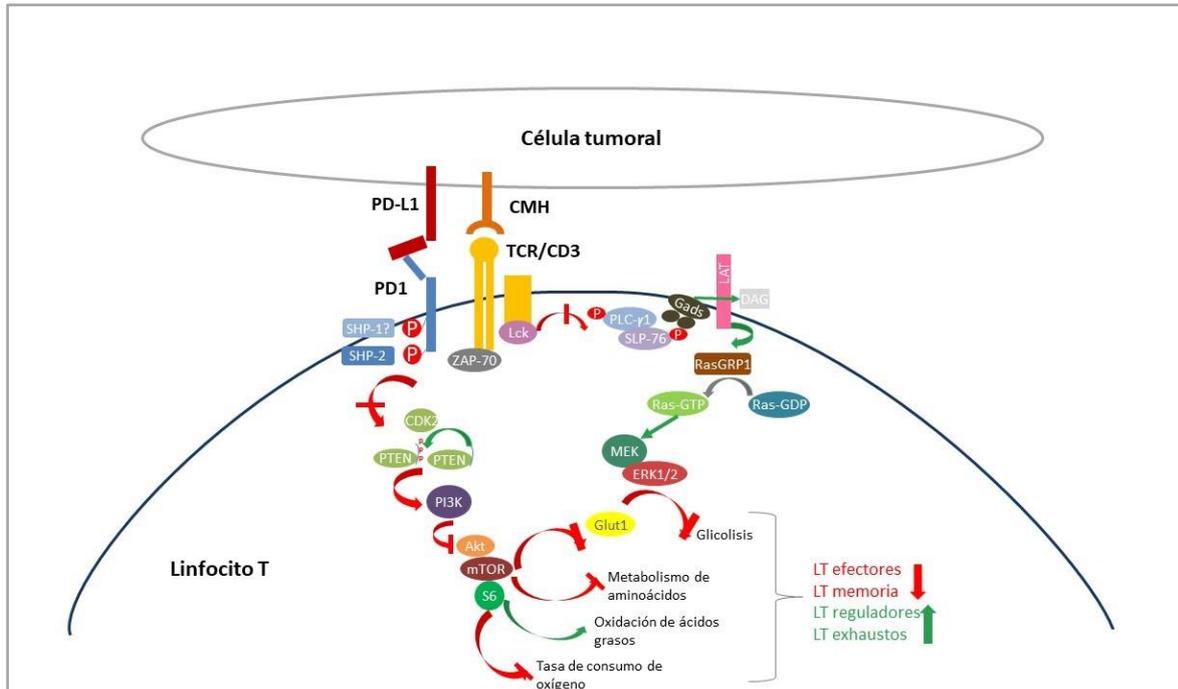
- **Transición epitelio-mesénquima (TEM):** La interacción tumor-estroma es clave para que se produzca el fenómeno metastático. La diseminación vascular de las células tumorales puede realizarse de manera individual o colectiva mediante una TEM. La TEM se caracteriza por la pérdida de la expresión de cadherina E por las células epiteliales, adquiriendo rasgos fenotípicos de células mesenquimales, y por un aumento de su capacidad migratoria.<sup>39,90</sup>

La TEM puede detectarse en el CEC metastático mediante técnicas de inmunohistoquímica, y se caracteriza por la pérdida de la expresión o por la traslocación desde la membrana celular al núcleo de la cadherina E y por la expresión de vimentina, siendo esta última un mejor indicador de la TEM y del riesgo metastático.<sup>90</sup>

- **Receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR):** Su sobreexpresión en CECs se ha relacionado con mayor riesgo de progresión y metástasis.<sup>91,92</sup> Sin embargo, su utilidad como marcador pronóstico es controvertida, dado que también puede sobreexpresarse en CECs no metastáticos.<sup>93,94</sup>
- **PD-L1:** La vía de la proteína de muerte celular programada 1/ligando de la proteína de muerte programada 1 (PD-1/PDL-1) actúa como un punto de control inmunológico, manteniendo la tolerancia periférica e impidiendo la

autoinmunidad.<sup>95</sup> PD-1 es un receptor transmembrana que se localiza principalmente en la membrana de linfocitos T activados. Tiene como ligandos las proteínas transmembranas PD-L1 y PD-L2, que a su vez se localizan en la superficie de las células tumorales en diversas neoplasias malignas. La unión de estos ligandos con el PD-1 de la membrana de los linfocitos citotóxicos CD8+ que infiltran los tumores da lugar a una señal inhibitoria que impide la respuesta inmunitaria antitumoral, permitiendo a las células tumorales escapar de la vigilancia inmunológica.<sup>95</sup> Otras poblaciones celulares que infiltran el tumor, como las células dendríticas mieloides y los macrófagos, también pueden expresar los ligandos de PD-1.<sup>95</sup>

La expresión de PD-L1 por las células tumorales se ha asociado con mal pronóstico en una amplia variedad de cánceres.<sup>96</sup> Sin embargo, los estudios de expresión de esta proteína en el CEC son escasos y la mayoría no incluyen un número significativo de muestras de casos metastásicos o de biopsias de metástasis. Además, los resultados de estos estudios son heterogéneos,<sup>97-104</sup> por lo que no se pueden establecer conclusiones definitivas sobre el posible papel de PD-L1 como biomarcador en el CEC.



**Figura 2.** Principales efectos de la vía PD-1 / PD-L1 (punto de control inmunológico). La molécula PD-L1 da lugar a importantes señales inhibitorias tras unirse al su ligando PD-1, produciendo un detrimento importante de la inmunidad antitumoral. Entre los efectos desencadenados por esta unión se encuentran la disminución del metabolismo de aminoácidos, la glicolisis y la tasa de consumo de oxígeno (OCR). Este cambio del metabolismo de las células T daría lugar a una alteración en su diferenciación fenotípica, favoreciendo su diferenciación hacia linfocitos T reguladores y exhaustos.<sup>95</sup> (Fuente de la imagen: modificado de Bardhan K. y cols. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. Front Immunol 2016; 7; 550)

## 1.6. Estadificación

No existe un único sistema de estadificación para la estratificación del riesgo del CEC. En 2010 la AJCC introdujo en su 7ª edición un sistema de estadificación TNM (tumor, ganglios linfáticos, metástasis) específico para el CEC, que incluía distintos factores de riesgo para la clasificación del estadio tumoral (T). Sin embargo, esta clasificación de la AJCC-7 no clasificaba correctamente por riesgo a los tumores,

produciéndose la mayoría de resultados desfavorables en estadios bajos (T2).<sup>71,105</sup> Por ello, las guías de la AJCC-8<sup>106</sup> (Enero 2018) incluyeron una actualización del estadiaje de CEC que mejoraba el potencial predictivo de los casos con mal pronóstico.<sup>107,108</sup> Sin embargo, esta edición sólo se refería a los CECs localizados en cabeza y cuello, y no especificaba su aplicación en CECs de otras localizaciones.

Un sistema de estadiaje alternativo al de la AJCC para la clasificación de la T es el de la BWH, propuesto en 2013.<sup>84</sup> Según un estudio reciente, la clasificación del BWH presenta mayor especificidad (93%) y valor predictivo positivo (30%) que la de la AJCC-8 en la identificación de casos con riesgo de metástasis o muerte, aunque según otro trabajo ambas serían similares en su potencial predictivo de la evolución del CEC.<sup>105,107</sup> Tanto la clasificación de la AJCC-8 como la del BWH son superiores a la AJCC-7 a la hora de identificar aquellos tumores con peor pronóstico.<sup>107</sup> Una de las limitaciones de la AJCC-8 es que no incluye el grado de diferenciación histológica dentro de los factores de riesgo, al contrario que la AJCC-7 y la BWH, a pesar de que se trata de un factor de mal pronóstico demostrado.<sup>73,77,78,87,109</sup> Los tumores con mal pronóstico se asocian principalmente a los estadios T3 de la AJCC-8 y T2b/T3 de la BWH.

**Tabla 2. Sistemas de clasificación AJCC-8 y BWH (adaptado de Ruiz y cols.)<sup>105</sup>**

| Sistema de estadificación | Definición   |
|---------------------------|--|
| <b>AJCC-8</b>             |  |
| <b>T1</b>                 | <2cm de diámetro máximo  |
| <b>T2</b>                 | ≥2cm pero <4cm de diámetro máximo  |
| <b>T3</b>                 | >4cm de diámetro máximo o invasión ósea menor o invasión perineural o invasión profunda* |
| <b>T4a</b>                | Tumor con invasión gruesa de la cortical ósea y/o de la médula ósea                      |
| <b>T4b</b>                | Tumor con invasión del hueso del cráneo y/o afectación del foramen de la base del cráneo |
| <b>BWH</b>                |  |
| <b>T1</b>                 | 0 Factores de riesgo**   |
| <b>T2a</b>                | 1 Factor de riesgo   |
| <b>T2b</b>                | 2-3 Factores de riesgo   |
| <b>T3</b>                 | 4 Factores de riesgo o invasión ósea   |

\* Invasión profunda definida como invasión por debajo del tejido celular subcutáneo o Breslow >6mm; invasión perineural definida como células tumorales en la vaina tumoral de un nervio localizado más profundo que la dermis o de >0,1mm de diámetro o afectación clínica o radiológica de nervios con nombre sin afectación o transgresión de la base del cráneo.

\*\* Los factores de riesgo incluyen: diámetro tumoral > 2cm, tumor histológicamente pobremente diferenciado, invasión perineural de nervios > 0,1mm de diámetro e invasión más allá del tejido celular subcutáneo (excluyendo la invasión ósea, que se clasifica como estadio T3)

## 1.7. Tratamiento

Actualmente no existe un tratamiento estándar para las QAs, disponiéndose de múltiples opciones terapéuticas que dependen de factores clínicos y del propio paciente. Las opciones disponibles incluyen tratamientos tópicos del campo de cancerización (5-fluorouracilo, diclofenaco, imiquimod, ingenol mebutato) o terapias destructivas (crioterapia, curetaje, terapia fotodinámica, láser *resurfacing*, escisión o peelings químicos).<sup>110</sup> A pesar de que algunos de estos tratamientos presentan tasas de eficacia de alrededor del 75%, no van dirigidos a dianas moleculares

específicas y suelen acompañarse de efectos secundarios como inflamación y dolor.<sup>111</sup> Además, del 25 al 75% de los pacientes van a requerir la realización de un nuevo tratamiento a los 12 meses.<sup>111</sup>

Respecto al CEC invasivo, el tratamiento de elección es la escisión quirúrgica con márgenes laterales de mínimo 4-5 mm, incluyendo el tejido celular subcutáneo medio.<sup>9,45,72</sup> En tumores del alto riesgo podría ser de elección la cirugía micrográfica de Mohs o cirugía con control microscópico completo de los márgenes laterales y profundos.<sup>9,72</sup>

La radioterapia se utiliza principalmente de manera adyuvante en aquellos casos en los que los márgenes de escisión hayan quedado afectos o muy cercanos y la cirugía no sea posible.<sup>2,45,72</sup> Otra indicación de la radioterapia adyuvante son aquellos CECs primarios que hayan sido totalmente extirpados, pero que tengan alto riesgo de recurrencia local, especialmente cuando exista invasión perineural de nervios de  $\geq 0,1$  mm o afectación neural extensa ( $> 2$  nervios).<sup>2,9,45,72</sup> Finalmente, también puede estar indicada en el caso de metástasis a ganglios regionales o parotídeas de manera adyuvante a la linfadenectomía o parotidectomía superficial, respectivamente.

La biopsia de ganglio centinela es una técnica controvertida, no estando claro su impacto en el manejo ni el pronóstico del paciente.<sup>9,45,72</sup> Su utilidad debería valorarse en tumores de alto riesgo (T2b y T3 de BWH) sin afectación linfática clínica ni por pruebas de imagen.<sup>2</sup>

El tratamiento del CEC localmente avanzado o metastásico es un tratamiento multidisciplinar.<sup>9</sup> Cuando existan únicamente metástasis linfáticas regionales o en tránsito, el tratamiento de primera línea será la extirpación quirúrgica siempre que

ésta sea posible, pudiendo asociarse a radioterapia adyuvante y en ocasiones a quimioterapia.<sup>9,45,72</sup> En el caso de metástasis a distancia o CEC localmente avanzado irresecable no existe ningún tratamiento estandarizado y los tratamientos disponibles presentan efectos limitados sobre la supervivencia global con una mortalidad y morbilidad asociadas considerables. Se pueden emplear tanto la radioterapia como la quimioterapia.<sup>2,9,72</sup> Respecto a la quimioterapia, no existen esquemas específicos para el CEC, utilizándose habitualmente los mismos que para el carcinoma escamoso (CE) de cabeza y cuello.<sup>112</sup> Las remisiones sostenidas con estos tratamientos son raras y las recidivas son frecuentes y rápidas.<sup>2</sup>

En los últimos años se han utilizado nuevos fármacos para casos puntuales de CECs localmente avanzados o metastásicos: los inhibidores del EGFR y los inhibidores de PD-1. Los inhibidores del EFGR (p. ej: cetuximab y panitumumab) se utilizan fuera de indicación en el CEC y, aunque aproximadamente el 50% de los pacientes responden, las respuestas mantenidas son infrecuentes.<sup>2,9</sup> Más recientemente se han introducido los inhibidores del PD-1 (p. ej: pembrolizumab, nivolumab), que actúan mejorando la vigilancia inmunológica frente a las células tumorales. Han sido utilizados para el tratamiento de una gran variedad de neoplasias malignas, incluyendo el melanoma, cáncer de pulmón, de próstata, renal y colorrectal.<sup>2,113</sup> Se ha publicado la utilización de los inhibidores de PD-1 cemiplimab, nivolumab y pembrolizumab para el CEC metastásico, localmente avanzado o recurrente en dos ensayos clínicos fase 2, un ensayo fase 1, un estudio de cohorte retrospectivo y 19 casos clínicos, observándose unos resultados favorables<sup>97,114–129</sup> Cemiplimab ha sido aprobado tanto por la FDA (Food and Drug Administration) como por la EMA (European Medicines Agency) para el tratamiento del CEC localmente avanzado o metastásico en septiembre de 2018 y julio de 2019,

respectivamente. Se observaron un 0-7% de remisiones completas, 41-50% de remisiones parciales y 5-12% de progresión de la enfermedad tras el tratamiento con cemiplimab, mientras que con pembrolizumab estos porcentajes fueron del 5%, del 37%, y del 42%, respectivamente.<sup>127-129</sup>

## 2. Hipótesis

---



A lo largo de las distintas etapas de evolución del CEC tienen lugar diferentes alteraciones en el transcriptoma y en el genoma, algunas de las cuales, pueden ser claves en la progresión desde las lesiones premalignas a un CEC invasivo.

La expresión aumentada por las células tumorales del CEC invasivo de la molécula PD-L1 del punto de control inmunitario P-D1/PD-L1 se relaciona con un riesgo aumentado de metástasis, pudiendo considerarse como un biomarcador pronóstico.



### 3. Objetivos

---



### 3.1. Objetivo principal

Estudiar los mecanismos de **expresión génica** implicados en la carcinogénesis/progresión desde PF hasta CEC metastásico.

### 3.2. Objetivos secundarios

**3.2.1.** Detectar ganancias y pérdidas de regiones genómicas, pérdida de heterocigosidad y disomías uniparentales en PFs, QAs y CECs invasivos.

**3.2.2.** Detectar alteraciones en la expresión génica, así como las vías implicadas, en PFs, QAs y CECs invasivo.

**3.2.3.** Correlacionar las alteraciones citogenéticas y del transcriptoma halladas en PFs, QAs y CECs invasivos para identificar moléculas con relevancia biológica en la transformación de QA a CEC invasivo.

**3.2.4.** Estudiar la expresión de la molécula PD-L1 en CECs primarios metastásicos y no metastásicos, así como en sus metástasis, para valorar su posible papel como biomarcador de riesgo metastásico en el CEC.



## 4. Material y métodos

---



Inicialmente, se estudiaron los mecanismos de expresión génica implicados en la progresión desde la PF a CEC invasivo (**apartados 4.1-4.7**). Posteriormente, se analizó la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en CECs con progresión metastásica (**apartados 4.8-4.11**).

### 4.1. Pacientes y muestras de tejidos

Se seleccionaron diez pacientes inmunocompetentes del Departamento de Dermatología del Hospital del Mar (Barcelona) que presentaban simultáneamente un CEC y múltiples QAs. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado. La aprobación para realizar este estudio se obtuvo del Comité de Ética del centro, de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983 (CEIC 2010/3913 / I).

De cada paciente se obtuvieron muestras de CEC, QA y PF de manera simultánea que fueron congeladas. Se analizaron un total de 30 muestras: 10 PFs, 10 QAs y 10 CECs. En la **tabla 3** se detallan las características clínicas de los pacientes incluidos en el estudio. Además, se extrajo una muestra de sangre periférica de cada paciente para el análisis del número de copias de ADN.

**Tabla 3.** Características clínicas de los pacientes y muestras del estudio.

| Nº paciente | Sexo/Edad | Muestras | Localización | KIN (QA) | Diferenciación (CEC) |
|-------------|-----------|----------|--------------|----------|----------------------|
| 1           | H/85      | PF100    | C. cabelludo | 2        | MD                   |
|             |           | QA101    | cara         |          |                      |
|             |           | CEC99    | c. cabelludo |          |                      |

## Material y métodos

|    |      |        |              |    |    |
|----|------|--------|--------------|----|----|
| 2  | M/86 | PF106  | preauricular | 2  | MD |
|    |      | QA107  | adyacente    |    |    |
|    |      | CEC105 | preauricular |    |    |
| 3  | H/83 | PF115  | c. cabelludo | 2  | MD |
|    |      | QA116  | cara         |    |    |
|    |      | CEC114 | c. cabelludo |    |    |
| 4  | H/76 | PF146  | c. cabelludo | 1  | BD |
|    |      | QA148  | c. cabelludo |    |    |
|    |      | CEC145 | c. cabelludo |    |    |
| 5  | M/80 | PF125  | cara         | 2  | MD |
|    |      | QA126  | cara         |    |    |
|    |      | CEC124 | cara         |    |    |
| 6  | H/96 | PF150  | cara         | 2  | MD |
|    |      | QA151  | cara         |    |    |
|    |      | CEC149 | cara         |    |    |
| 7  | H/87 | PF162  | c. cabelludo | 1  | MD |
|    |      | QA163  | adyacente    |    |    |
|    |      | CEC161 | c. cabelludo |    |    |
| 8  | H/79 | PF182  | cara         | ND | MD |
|    |      | QA183  | cara         |    |    |
|    |      | CEC181 | cara         |    |    |
| 9  | M/95 | PF191  | cara         | ND | MD |
|    |      | QA190  | cara         |    |    |
|    |      | CEC189 | cara         |    |    |
| 10 | M/81 | PF79   | cara         | 2  | MD |
|    |      | QA81   | cara         |    |    |
|    |      | CEC78  | cara         |    |    |

Abreviaturas: H: hombre; M: mujer; c.cabelludo: cuero cabelludo; NV: no valorable; MD: moderadamente diferenciado; BD: bien diferenciado

Todos los CECs eran primarios, invasivos, estaban bien o moderadamente diferenciados y localizados en áreas fotoexpuestas. Se excluyeron los casos recurrentes o metastásicos. Las muestras de CEC se tomaron de la porción periférica del tumor mediante un *punch* de 4 mm. Las muestras de QA y PF se obtuvieron mediante afeitado. La mayoría de las QAs fueron cercanas (n = 8) o adyacentes (n = 2) al CEC, mientras que la mayoría de las muestras de PF se recolectaron de los márgenes de resección de los CECs. El examen histopatológico de las muestras de PF descartó la presencia de QAs subclínicas.

### 4.2. Análisis de la expresión génica

El ARN para el *array* de expresión se extrajo de las muestras congeladas con el *mirVana™ miRNA Isolation Kit*. Los niveles de expresión génica se perfilaron mediante tecnología de *microarrays*. El procesamiento, amplificación, marcaje e hibridación de muestras se realizó de acuerdo con el protocolo del kit de reactivos *GeneChip WT PLUS* y posteriormente se hibridó con *GeneChip Human Gene 2.0 ST Array* (Affymetrix) en el *GeneChip Hybridization Oven 640*. El lavado y el escaneo se realizaron utilizando el *Expression Wash, Stain and Scan Kit* y el sistema *GeneChip* de Affymetrix (*GeneChip Fluidics Station 450* y *GeneChip Scanner 3000 7G*). Después del control de calidad de los datos brutos, se procedió a su corrección de fondo, se normalizaron por cuantiles y se resumieron a nivel de gen mediante el método *robust multi-chip average* (RMA),<sup>130</sup> resultando en un total de 48.144 *clusters* de transcritos, excluyendo los controles, que aproximadamente correspondían a genes u otros ARN mensajeros (ARNm) como miARNs o ARNncls. Se utilizó el paquete de bioconductor *Linear Models for Microarray Data* (LIMMA)<sup>131</sup>

para detectar, de manera apareada, genes expresados diferencialmente entre dos muestras diferentes de los tres tipos de muestras estudiados: PF, QA y CEC. Se seleccionaron como significativos aquellos genes con un valor de  $p < 0,01$  y un *fold change* (factor de proporcionalidad) absoluto  $> 1,5$ .

Los análisis funcionales se realizaron con el *Ingenuity Pathway Analysis* v 9.0 (Ingenuity® Systems, [www.qiagenbioinformatics.com](http://www.qiagenbioinformatics.com)). Todos los análisis se realizaron en R (v 3.1.1)<sup>132</sup> con los paquetes *aroma.affymetrix*,<sup>133</sup> *Biobase*<sup>134</sup> y *lima*.<sup>135</sup>

### 4.3. Análisis del número de copias de ADN

Se evaluaron el número de copias y las alteraciones de LOH utilizando el *CytoScan HD Cytogenetics Solution* (Affymetrix). El ADN fue extraído con el *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen), procesado según el *CytoScan Assay protocol (P / N 703038)* (28),<sup>136</sup> hibridado con el *CytoScan HD array* y finalmente lavado, teñido y escaneado usando el *GeneChip Hybridization Oven 640*, la *GeneChip Fluidics Station 450* y el *GeneChip Scanner 3000 7G*.

Las alteraciones se recuperaron utilizando el *Chromosome Analysis Suite* (ChAS, Affymetrix), *NetAffx Build na32.3 (hg19)* considerando como filtros: 25 marcadores alterados en 150 kbp para ganancias, 35 marcadores en 75 Kbp para pérdidas y 50 marcadores en 5 Mbp para LOH. Para cada paciente se consideraron como constitucionales las alteraciones encontrados en su muestra de sangre periférica, siendo descartadas para los análisis posteriores.

Se estudiaron las alteraciones intrapaciente para evaluar la progresión de cada lesión de manera individual.

Por último, también se obtuvieron las alteraciones comunes a al menos 3 muestras por grupo de muestras (CEC, QA o FP) conocidas como *Smallest Overlapping Regions of genomic Imbalance* (SORIs).<sup>137</sup> Este análisis se realizó en R.

### 4.4. Análisis de integración

La integración de las alteraciones del número de copias del ADN y los resultados del transcriptoma se realizó a través del *DR-Integrator*.<sup>138</sup> Esta herramienta analítica integra los datos del ADN y ARN combinando en una puntuación o *score* común los resultados de ambas comparaciones simples mediante una *t* de Student moderada. Para ello, se extrajeron los genes de una región y se les asignó su valor correspondiente al análisis del número de copias. Solo se incluyeron en la integración los genes comunes para ambas tecnologías. La integración se realizó comparando dos muestras diferentes de los tres tipos de muestras considerados: PF, QA y CEC.

### 4.5. PCR cuantitativa por retrotranscripción (RT-qPCR)

Los resultados del transcriptoma obtenidos mediante el *array* de expresión se validaron en muestras apareadas de PF, QA y CEC de 12 pacientes (6 de ellos incluidos en el *array*). Se realizó una síntesis de ADN complementario (ADN-c) utilizando el kit de síntesis de ADNc *Transcriptor First Strand* (Roche Diagnostics). Se obtuvieron cebadores verdes SYBR prediseñados (Sigma-Aldrich) para 13 genes de interés y 2 genes de referencia. Los genes de referencia (GAPDH, TBPL2) se seleccionaron en base a la literatura y a su expresión estable en el *array*.

Las RT-qPCRs se realizaron mediante el sistema de PCR en tiempo real *QuantStudio™ 12K Flex* utilizando la *SYBR Green select PCR master mix* (Applied Biosystems, Life Technologies). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Los datos de expresión relativa se calcularon mediante el método  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . Las diferencias en la expresión génica de las diferentes muestras (PF, QA y CEC) se analizaron estadísticamente a través de la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, considerando como significativo un valor de  $p < 0,05$ .

### 4.6. Inmunohistoquímica

Se recuperaron los bloques de parafina de 13 PFs, 49 QAs y 46 CECs de nuestros archivos hospitalarios. Se revisaron las laminillas de hematoxilina-eosina de todos los casos para confirmar el diagnóstico y seleccionar un área representativa para la posterior construcción de los *microarrays* tisulares (TMAs). Aquellas áreas previamente seleccionadas se perforaron con un *punch* de 2 mm y se transfirieron a bloques de parafina, que posteriormente se cortaron en secciones de 2,5  $\mu\text{m}$ . Las láminas obtenidas fueron desparafinadas y rehidratadas previamente a la realización de la inmunohistoquímica con el Anticuerpo FOSL1 (Fra-1, SC-28310, Santa Cruz Biotechnology; dilución 1:100), anticuerpo BNC1 (orb2023, Biorbyt; dilución 1:100) y anticuerpo NEK10 (HPA038941 Sigma-Aldrich; dilución 1:400). La peroxidasa endógena se bloqueó usando una solución salina tamponada con fosfato al 1% que contenía peróxido de hidrógeno al 4% y azida sódica al 0,1%. Como anticuerpo secundario se empleó un polímero marcado con peroxidasa conjugado con inmunoglobulinas anti-conejo de cabra en el caso de BNC1 y NEK10, y de inmunoglobulinas anti-ratón de cabra en el caso de FOSL1 (Sistema

Dako EnVision +, Agilent Technologies). Para visualizar los anticuerpos unidos se utilizó 3'-3-diaminobencidina (Dako) como cromógeno.

Las laminillas de inmunohistoquímica fueron evaluadas por dos observadores (A.T e I. G.) utilizando criterios semicuantitativos. En el caso de FOSL1 y NEK10, se midieron la intensidad de la tinción (gradación de 0 a 3) y el porcentaje de la muestra teñida. El *Histoscore* se calculó multiplicando el nivel de intensidad de la tinción por el porcentaje de células positivas, resultando en un valor entre 0 y 300. En el caso de BNC1, en lugar del porcentaje de células teñidas, se evaluó el patrón de tinción (citoplasmático o nuclear). El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba t de Student para FOSL1 y NEK10 y la prueba exacta de Fisher para BNC1.

### 4.7. Cultivos celulares, extracción de proteínas, *Western blot* y citometría de flujo

Se cultivaron queratinocitos epidérmicos humanos (HEK $\alpha$ ), células HaCaT y SCC13 siguiendo los procedimientos descritos previamente.<sup>139</sup> Las células HaCaT, una línea celular consistente en queratinocitos humanos inmortalizados, se usaron como sustitutas de la queratosis actínica.<sup>140</sup> La extracción de proteínas y el *Western blot* se realizaron siguiendo técnicas estándar utilizando los mismos anticuerpos empleados para la inmunohistoquímica. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos conjugados con HRP (Dako). La intensidad de las bandas individuales se normalizó a las señales de la actina (Sigma-Aldrich) o lamina B (Abcam). Los ensayos funcionales se llevaron a cabo mediante transfección transitoria a las células HaCat de ARN pequeños de interferencia (ARNip) de tres

secuencias diferentes dirigidos frente a NEK10 o el ARNip de control (GCTGACCCTGAAGTTCATC) (Thermo Fisher). Veinticuatro horas después de la transfección las células se dejaron sin tratamiento o bien fueron tratadas con etopósido 1  $\mu$ M o bleomicina 5  $\mu$ g / ml (Sigma Aldrich). Tras 24 horas en cultivo, se recolectaron las células y se analizaron los perfiles del ciclo celular mediante citometría de flujo a través de la tinción estándar con yoduro de propidio. La significancia estadística se analizó mediante la prueba t de Student. Los niveles de proteína se determinaron mediante *Western blot* utilizando anticuerpos para detectar la MAP quinasa activada (ERK1 / 2 desfosforilada) y ERK2 (C-14) (Sigma), así como la Ciclina B1 (Santa Cruz Biotech).

### 4.8. Pacientes y muestras de tejidos

Se recogieron biopsias cutáneas pertenecientes a 99 pacientes diagnosticados de CEC en 3 hospitales de atención terciaria de España entre 2001 y 2011. Se seleccionaron un total de 99 tumores primarios que se agruparon en dos grupos en función de si presentaban o no diseminación metastásica linfática. Se incluyeron 48 CECs metastásicos (CECMs): 40 con metástasis en ganglios linfáticos y 8 con metástasis cutáneas en tránsito. Como grupo control se incluyeron 51 CECs no metastásicos (CECNMs), considerándose como tales aquellos CECs que no habían desarrollado diseminación metastásica tras un mínimo de 5 años de seguimiento. Adicionalmente, también se recogieron 24 metástasis pertenecientes a 24 de los CECMs del estudio: 22 localizadas en ganglios cutáneos y 2 metástasis cutáneas en tránsito.

De cada paciente se recopilaron de manera retrospectiva los siguientes datos: el sexo, la edad, el estado inmunológico, el año de diagnóstico del CEC, la presencia de recurrencias del tumor, el tamaño (dicotomizado en las categorías  $>$  o  $\leq$  de 20mm), la exposición solar y la localización. El estadio tumoral (T) se evaluó a través de 2 sistemas de estadiaje: el AJCC-8 y el BWH.<sup>84,106</sup> Se consideró como inmunosuprimidos a aquellos pacientes que tenían antecedentes de trasplante de órganos, presentaban una neoplasia hematológica (p. ej. leucemia linfocítica crónica) o se encontraban en tratamiento con fármacos inmunosupresores en el momento del diagnóstico CEC.

La aprobación para llevar a cabo este estudio se obtuvo de los comités de ética de todos los centros participantes de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 1983.

### 4.9. Evaluación histopatológica

Cada muestra de CEC fue analizada simultáneamente por 2 evaluadores (A.T. e I.G.) utilizando laminillas teñidas con hematoxilina eosina que contenían secciones de la escisión tumoral completa. Se registraron los siguientes datos: grosor tumoral, nivel anatómico (nivel de Clark dicotomizado en las subcategorías  $\geq 4$  o  $< 4$ ), el grado de diferenciación histopatológica (bueno, moderado, malo), la presencia de invasión vascular o perineural (incluyendo el diámetro del nervio afectado dicotomizado en las subcategorías  $\geq 0,1$  o  $< 0,1$  mm), y la presencia de desmoplasia.

### 4.10. Evaluación inmunohistoquímica

Las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron en secciones de 2,5 mm de grosor que contenían el tumor completo. Se utilizaron anticuerpos frente a PD-L1 (clon SP142, Spring Bioscience; dilución 1: 100) y CD8 (clon SP57, Ventana Medical Systems; prediluido). Las secciones se desparafinaron y fueron sometidas a una recuperación de antígeno inducida por calor usando Tris-EDTA (pH 9), en el caso de PD-L1, y 10-mM citrato (pH 6), en el caso de CD8. Posteriormente se incubaron las laminillas con los anticuerpos primarios durante 12 horas. Después de realizar el lavado se aplicó el reactivo *Envision + System-horseradish peroxidase* (Dako EnVision+ System, HRP). Las reacciones de inmunohistoquímica se llevaron a cabo utilizando diaminobencidina como sustrato cromógeno. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas y montadas.

Las laminillas de inmunohistoquímica fueron revisadas de manera simultánea por dos evaluadores (I.G. y A.T.) “a ciegas”. En el caso de PD-L1 se cuantificaron el porcentaje de células tumorales que presentaban una tinción de membrana parcial o completa y la intensidad de la tinción. Esta última se clasificó como negativa (0), débil (1+), moderada (2+) e intensa (3+). Se consideraron como positivos para PD-L1 aquellos tumores que presentaban una tinción de PD-L1 positiva en  $\geq 1\%$  de las células (intensidad  $\geq 1+$ ). Este punto de corte fue definido como el mejor para la discriminación del pronóstico tras evaluar diferentes puntos de corte en el análisis univariante. Este mismo umbral de PD-L1 había sido reportado previamente en diferentes trabajos que estudiaban la expresión de PD-L1 en el CEC.<sup>98–100,141</sup> Asimismo, también se evaluó la presencia de PD-L1 en las células del infiltrado inflamatorio (porcentaje de células positivas e intensidad de la tinción).

Previamente al análisis de la tinción para linfocitos CD8 se procedió a valorar el infiltrado inflamatorio peritumoral. Esto se realizó a través de un sistema de puntuación semicuantitativo que se denominó *histoscore* de inflamación (rango de 0 a 300), obtenido a partir del producto de 2 parámetros: el porcentaje de la periferia del tumor rodeada por inflamación y el grosor del infiltrado inflamatorio (escala de 0-3). Posteriormente se evaluó la tinción para linfocitos CD8 de la siguiente manera: primero, se cuantificó el porcentaje de células CD8-positivas (0% -100%) respecto a las células inflamatorias peritumorales (% de células CD8+); a continuación, para obtener una puntuación semicuantitativa del infiltrado CD8+ (llamado *histoscore* peritumoral CD8+) se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{Histoscore de CD8+ peritumorales} = (\text{Histoscore de inflamación}) \times (\% \text{ de células CD8+}) / 100$$

### 4.11. Análisis estadístico

Se evaluó la correlación entre las variables categóricas utilizando la prueba  $X^2$  o la prueba exacta de Fisher. Las variables continuas se compararon mediante la prueba de U de Mann-Whitney para distribuciones muestrales no normales. Para realizar las comparaciones entre los tumores primarios y sus metástasis se utilizaron la prueba de McNemar (variables categóricas) y la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon (datos continuos). De cara a determinar las características clínico-patológicas e inmunohistoquímicas predictivas de metástasis linfáticas se llevó a cabo un análisis de regresión logística multivariante. Todos los análisis estadísticos fueron bilaterales con un error alfa de 0,05 y se realizaron en SPSS 18.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).



## 5. Resultados

---

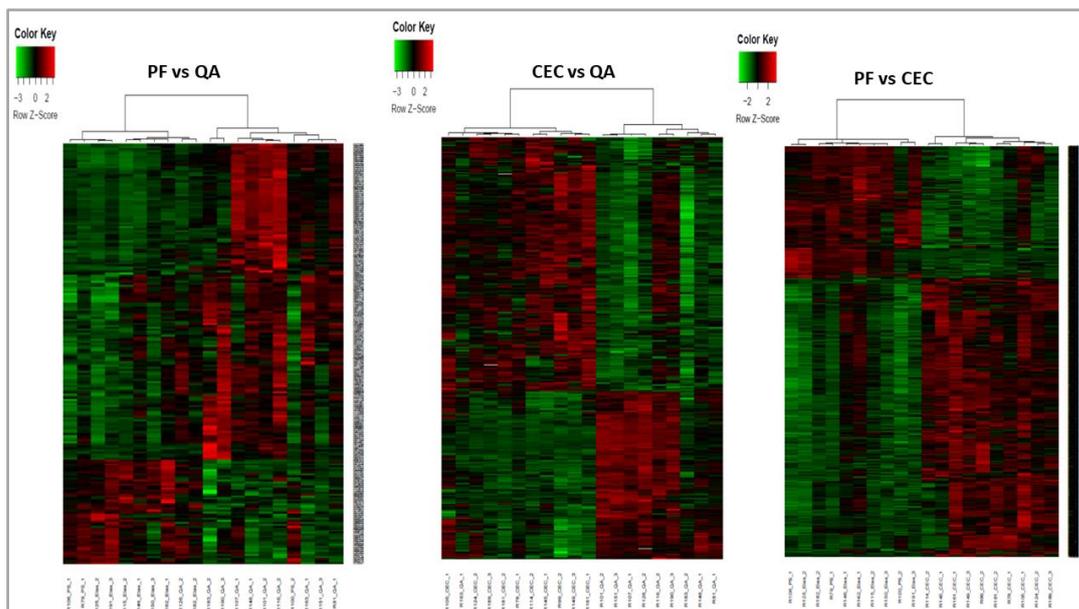


El primer apartado del trabajo se centró en estudiar las diferencias a nivel de transcriptoma y de genoma presentes a lo largo de los distintos estadios evolutivos del CEC, desde la PF y la QA hasta el CEC invasivo no metastásico, cuyos resultados se detallan en los **apartados 5.1-5.4**.

Posteriormente, analizamos el papel de la expresión génica de PD-L1 y CD8 en el CEC y en células del infiltrado inflamatorio peritumoral como biomarcadores de progresión metastásica (**apartados 5.5-5.7**).

### 5.1. Análisis del transcriptoma

Las diferencias en la expresión génica de las distintas muestras apareadas se detectaron mediante las siguientes comparaciones: QA vs PF, CEC vs PF y CEC vs QA. Un total 189 genes, 1135 genes y 400 genes se expresaban de manera diferencial en los 3 grupos de comparación, respectivamente (**tabla 4**). Al agrupar las distintas muestras en función de su patrón de genes expresados diferencialmente (*Heatmap*, **figura 3**), este se correspondía de manera adecuada con el tipo de muestra (PF, QA o CEC).



**Figura 3.** Heatmap de los genes diferencialmente expresados en las tres comparaciones: PFvs QA, CEC vs QA y PF vs CEC. En rojo los genes sobreexpresados y los genes infraexpresados están en verde.

Veintidós de los genes diferencialmente expresados en el array presentaban un espectro de expresión progresivo desde PF a CEC, bien aumentando (12 genes) o disminuyendo su expresión (10 genes) (**tabla 4**).

**Tabla 4.** Genes diferencialmente expresados en el array de expresión.

| Genes diferencialmente expresados |          |           |           |
|-----------------------------------|----------|-----------|-----------|
|                                   | QA vs PF | CEC vs QA | CEC vs PF |
| <b>Infraexpresados</b>            | 52       | 165       | 398       |
| <b>Sobreexpresados</b>            | 137      | 235       | 737       |

| Genes con un espectro de expresión progresivo desde PF a CEC |   |
|--|---|
| <b>Infraexpresados</b>                                       | KRT77, DCT, PODN, DPT, SVEP1, APOD, SLIT3, GATM, MFAP4, TNXB                      |
| <b>Sobreexpresados</b>                                       | ANXA1, RAB31, UPP1, SERPINB1, MYO1B, BNC1, SAMD9, IL1A, GJB2, ANXA3, STK17A, SAT1 |

La mayoría de los genes regulados negativamente en el CEC respecto a la QA estaban relacionados con vías involucradas en las funciones de apoptosis, necrosis y anoikis, lo que probablemente se encuentre relacionado con la adquisición de resistencia a la muerte celular. Los genes regulados de manera positiva se encontraban principalmente asociados con el movimiento celular, principalmente con la migración y la invasión celulares, involucrando metaloproteasas e integrinas.

Muchos de los genes sobreexpresados en la QA respecto a la PF también estaban relacionados con el movimiento celular, pero en este caso se trataba de genes que participaban en la quimiotaxis y la señalización del movimiento de las células inflamatorias, implicando a quimiocinas, anexinas y defensinas. En general, la mayoría de los genes expresados diferencialmente en la QA respecto a la PF estaban implicados en vías relacionadas con la inflamación.

De cara a validar los resultados del *array*, se seleccionaron 13 de los genes diferencialmente expresados para su estudio mediante RT-qPCR. Los genes se eligieron en base a su función como factores de transcripción o genes reguladores en el análisis del *Ingenuity Pathway Analysis* o por su papel en otros tipos de cáncer. Se confirmó la expresión diferencial entre CEC y PF para 5 genes: IL1A, GJB2, BNC1, ANXA3 y FOSL1 (**tabla 5**).

Tabla 5. Genes validados en la RT-qPCR.

| Gen          | PF <sup>a</sup> |      | QA <sup>a</sup> |      | CEC <sup>a</sup> |      | Valor de <i>p</i> <sup>b</sup> |         |              |
|--------------|-----------------|------|-----------------|------|------------------|------|--------------------------------|---------|--------------|
|              | Media           | DS   | Media           | DS   | Media            | DS   | QAvsPF                         | CECvsQA | CECvsPF      |
| <b>IL1A</b>  | 0,78            | 0,38 | 0,95            | 0,58 | 0,85             | 0,45 | 0,515                          | 0,314   | <b>0,011</b> |
| <b>GJB2</b>  | 0,29            | 0,53 | 2,06            | 5,27 | 2,33             | 5,14 | 0,86                           | 0,515   | <b>0,021</b> |
| <b>FOSL1</b> | 0,33            | 0,41 | 0,41            | 0,53 | 0,35             | 0,44 | 0,214                          | 0,173   | <b>0,038</b> |
| <b>ANXA3</b> | 0,66            | 0,28 | 1,12            | 0,90 | 0,98             | 0,39 | 0,173                          | 0,767   | <b>0,021</b> |
| <b>BNC1</b>  | 0,45            | 0,21 | 0,80            | 0,97 | 0,85             | 0,91 | 0,515                          | 0,678   | <b>0,011</b> |

a Expresión relativa normalizada al nivel de expresión de dos genes de referencia (GAPDH, TBPL2).

b Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon.

DS: desviación estándar

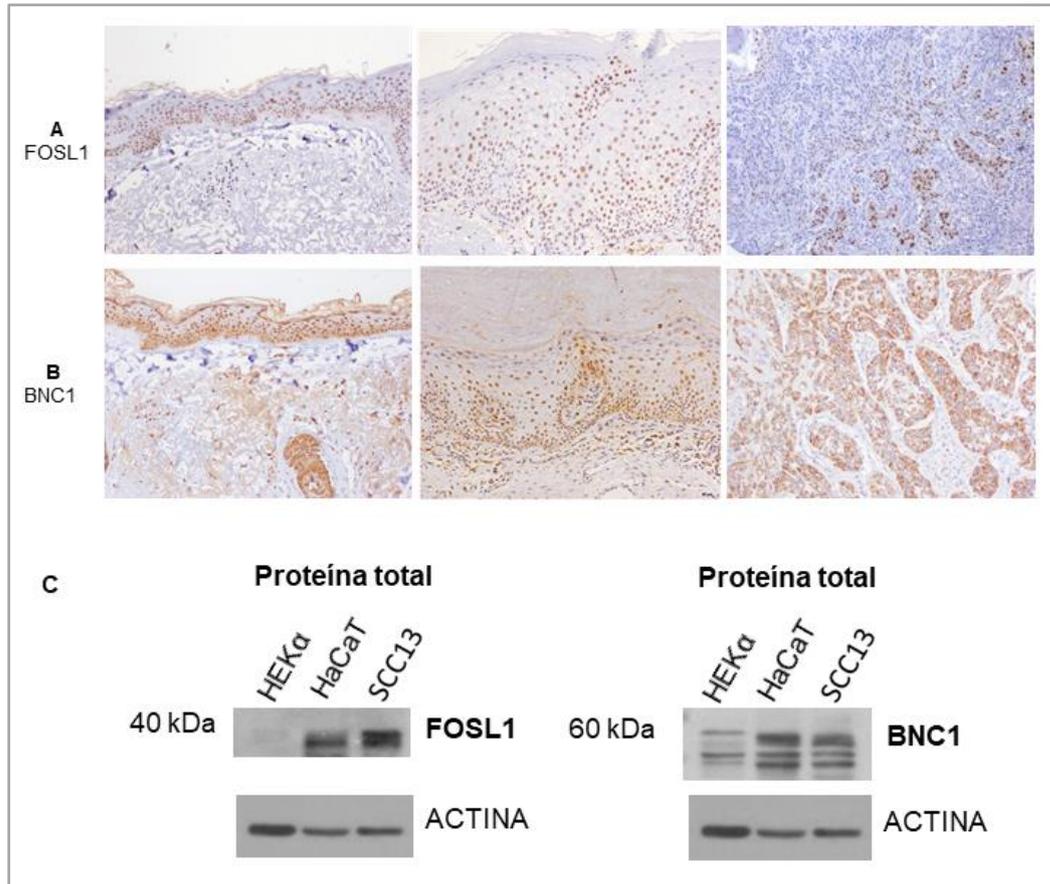
Los genes FOSL1 y BNC1 codifican factores de transcripción, formando el último parte de los 22 genes que presentaban un aumento progresivo de la expresión de PF a CEC en el *array* (tabla 4). Adicionalmente, ambos genes se han asociado con el cáncer.<sup>142,143</sup> Por todo ello, se decidió realizar estudios adicionales a dichos genes mediante inmunohistoquímica en muestras de PF, QA y CEC de TMAs.

En la inmunohistoquímica FOSL1 presentaba una expresión nuclear difusa pero moderadamente intensa en muestras de PF. La tinción de FOSL1 en las QAs y los CECs era heterogénea, presentando algunos CECs una tinción intensamente positiva en el frente invasivo (Figura 4). Las diferencias entre las distintas muestras no fueron estadísticamente significativas. Con el objetivo de caracterizar mejor la expresión inmunohistoquímica de FOSL1 en el CEC, realizamos un estudio inmunohistoquímico adicional en ocho de los CECs, utilizando toda la muestra de

tumor en lugar del TMA, que confirmó el predominio de la tinción de FOSL1 en el frente de invasión tumoral.

La inmunohistoquímica de BNC1 mostró una tinción nuclear, nuclear / citoplasmática y citoplasmática en muestras de PF, QA y CEC, respectivamente ( $p < 0,01$ ) (**figura 4**).

Los análisis de *Western blot* demostraron el aumento de la expresión de FOSL1 y BNC1 en las células HaCat y SCC13 respecto a las HEK $\alpha$  (**figura 4**). En las células SCC13, la señal de BNC1 parecía desplazarse sutilmente a una posición de migración más lenta. Se ha descrito una reducción de la motilidad de BNC1 en relación con su fosforilación en la serina 541, que se ha asociado con su localización en el citoplasma.<sup>144</sup> Los estudios de *Western blot* confirmaron *in vitro* la regulación de estas dos proteínas a lo largo de la progresión del CEC observada previamente *in vivo*.



**Figura 4. (A y B)** Inmunohistoquímica de FOSL1 y BNC1 en TMA de PF, QA y CEC. **(A)** FOSL1 mostraba un patrón de tinción nuclear, presentando una intensidad media (2+) en PFs. La intensidad de la tinción aumentaba (3+) en el borde invasivo de los CECs. **(B)** BNC1 se localizaba principalmente en el núcleo de los queratinocitos en la PF, en el núcleo o en el citoplasma en las QAs y en el citoplasma con refuerzo perinuclear en los CECs ( $p < 0,01$ ). **(C)** *Western blot* de los extractos citoplásmicos y nucleares de células HEK $\alpha$ , HaCaT y SCC13 para estudiar la expresión de FOSL1 y BNC1. Se observó una banda correspondiente a FOSL1 a 40 kDa. La señal de FOSL1 aumentaba de manera progresiva desde las células HEK $\alpha$  hasta las SCC13. Se observó una banda correspondiente a BNC1 a 60 kDa, con un aumento de la señal en células HaCaT y SCC13 respecto a las HEK $\alpha$ . El pequeño retraso de la banda de BNC1 observado en las células HaCaT y SCC13 respecto a las HEK $\alpha$  se debe al cambio de localización subcelular (de nuclear a citoplasmática) de BNC1.

### 5.2. Análisis del número de copias de ADN

Las alteraciones cromosómicas en el número de copias fueron mucho más frecuentes en los CECs (n = 175) que en las QAs (n = 106), siendo prácticamente inexistentes en las PFs (n = 6). En el CEC las aberraciones cromosómicas más comunes fueron las deleciones (n = 81), seguidas de las ganancias (n = 66) y la LOH (n = 28). En la QA, las ganancias fueron más comunes que las deleciones y la LOH (49, 42 y 15, respectivamente). En la mayoría de los casos estas alteraciones cromosómicas ocurrían en mosaicismo, habitualmente involucrando menos del 75% de la muestra. Los cromosomas afectados de manera predominante en el análisis fueron el 8, 9 y 3.

En general, se encontró una baja correlación intrapaciente para las aberraciones encontradas en PF, QA y CEC. Sin embargo, un total de 32 aberraciones cromosómicas (16 ganancias y 16 pérdidas) eran compartidas por las muestras de QA y CEC pertenecientes a los mismos pacientes.

Para caracterizar aún más las alteraciones del número de copias, se detectaron las SORIs, esto es, las regiones más pequeñas superpuestas de desequilibrio genómico que eran compartidas por al menos 3 de las muestras de cada grupo (PF, QA o CEC) (**tabla 5**). Estas regiones fueron 3 veces más frecuentes en el CEC que en la QA (63 vs.19, respectivamente), siendo únicamente 9 de ellas comunes a ambas lesiones. Una vez más, los cromosomas 3, 8 y 9 fueron el lugar de localización de los SORIs más habitual, tanto en CECs como en QAs.

De manera destacable, se detectó una SORI, una deleción en la banda p24.1 del cromosoma 3, que era compartida por 7 de los 10 CECs estudiados, no estando presente en ninguna de las muestras de QA analizadas. Además, a pesar de que

la mayoría de las SORIs consistían en amplias regiones de ADN que incluían muchos genes, esta SORI contenía únicamente 6 genes (RNU1-96P, RPS20P15, SLC4A7, NEK10, EOMES y CMC1).

**Tabla 5.** SORIs encontradas en QAs y CECs compartidas por al menos 5 de las muestras de cada tipo.

| Alteración     | Cr       | Banda   | Nº de muestras | Muestras                              | Nº de genes |
|----------------|----------|---|----------------|---------------------------------------|-------------|
| <b>QA</b>      |          |   |                |                                       |             |
| Ganancia       | 3        | q26.32  | 5              | 101,116,148,1<br>63,81                | 2           |
| Ganancia       | 8        | q24.22  | 5              | 101,126,148,1<br>51,163               | 0           |
| Pérdida        | 9        | p13.1 p13.2 p13.3 p21.1<br>p21.2 p21.3 p22.1 p22.2<br>p22.3 p23 p24.1 p24.2<br>p24.3  | 5              | 101,116,148,1<br>63,81                | 409         |
| <b>CEC</b>     |          |   |                |                                       |             |
| <b>Pérdida</b> | <b>3</b> | <b>p24.1</b>  | <b>7</b>       | <b>105,114,145,1<br/>49,161,78,99</b> | <b>6</b>    |
| Pérdida        | 3        | p12.1 p12.2 p12.3 p13<br>p14.1 p14.2 p14.3 p21.1<br>p21.2 p21.31 p21.32<br>p21.33 p22.1 p22.2<br>p22.3 p23 p24.1 p24.2<br>p24.3 p25.1 p25.2 | 6              | 105,114,149,1<br>61,78,99             | 465         |
| Pérdida        | 3        | p12.1 p12.2 p12.3 p13<br>p14.1 p14.2 p14.3 p21.1<br>p21.2 p21.31 p21.32<br>p21.33 p22.1 p22.2<br>p22.3 p23 p24.1 p24.2                      | 5              | 105,114,161,7<br>8,99                 | 455         |

|          |    |   |   |                        |     |  |
|----------|----|---|---|------------------------|-----|--|
|          |    | p24.3 p25.1 p25.2 p25.3<br>p26.1 p26.2 p26.3                                      |   |                        |     |  |
| Pérdida  | 3  | p11.1 p11.2   | 5 | 105,114,161,7<br>8,99  | 14  |  |
| Ganancia | 5  | p15.31 p15.32 p15.33  | 5 | 105,145,161,7<br>8,99  | 55  |  |
| Ganancia | 9  | q21.13 q21.2 q21.31<br>q21.32 q21.33 q22.1<br>q22.2 q22.31 q22.32<br>q22.33 q31.1 | 5 | 114,149,161,7<br>8,99  | 316 |  |
| Ganancia | 8  | q24.23 q24.3  | 5 | 145,149,161,1<br>81,99 | 12  |  |
| Ganancia | 8  | q24.3   | 5 | 145,149,161,1<br>81,99 | 116 |  |
| Pérdida  | 13 | q14.3   | 5 | 145,149,161,7<br>8,99  | 2   |  |

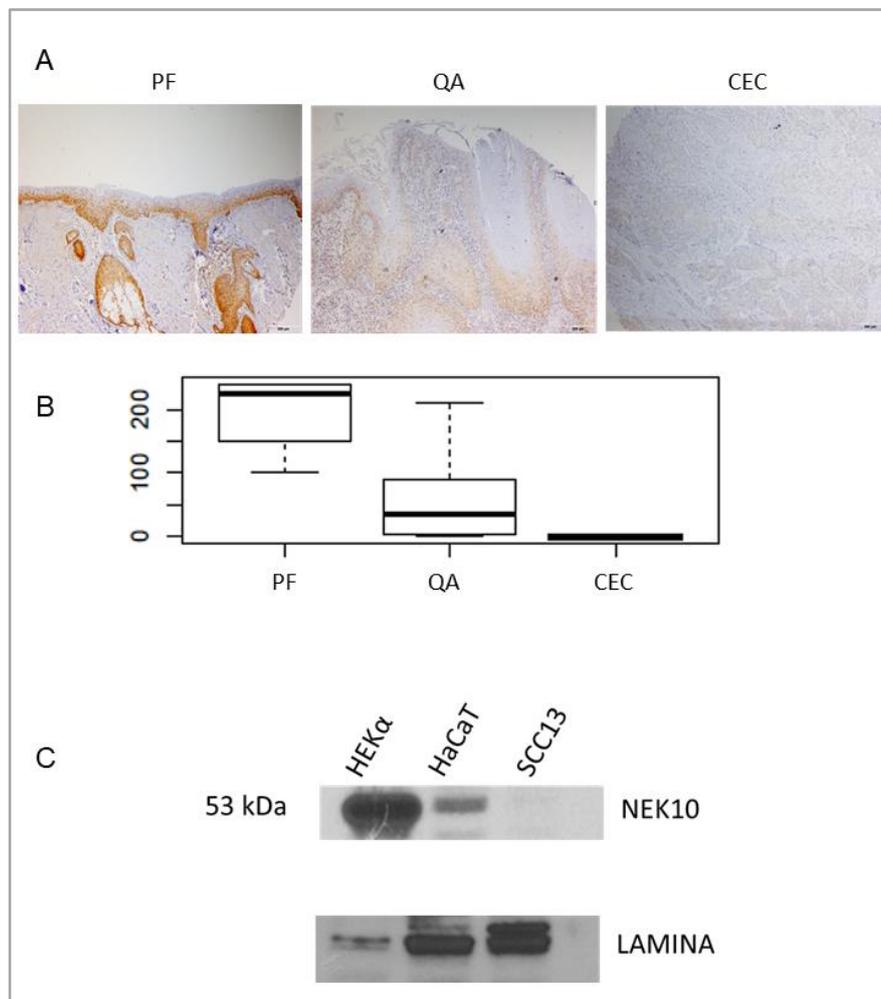
Cr: cromosoma

### 5.3. Integración de los análisis del transcriptoma y del número de copias

Los datos del análisis del número de copias se compararon con los obtenidos a partir del array de expresión para determinar si las alteraciones a nivel del ADN producían los cambios esperados en los niveles de ARNm de los genes contenidos en ellas. Sin embargo, se encontraron muy pocos casos en los que ambos datos fueron concordantes, comprendiendo únicamente 35 genes expresados diferencialmente entre CEC y QA, 20 genes entre CEC y PF y 3 genes entre QA y PF .

## Resultados

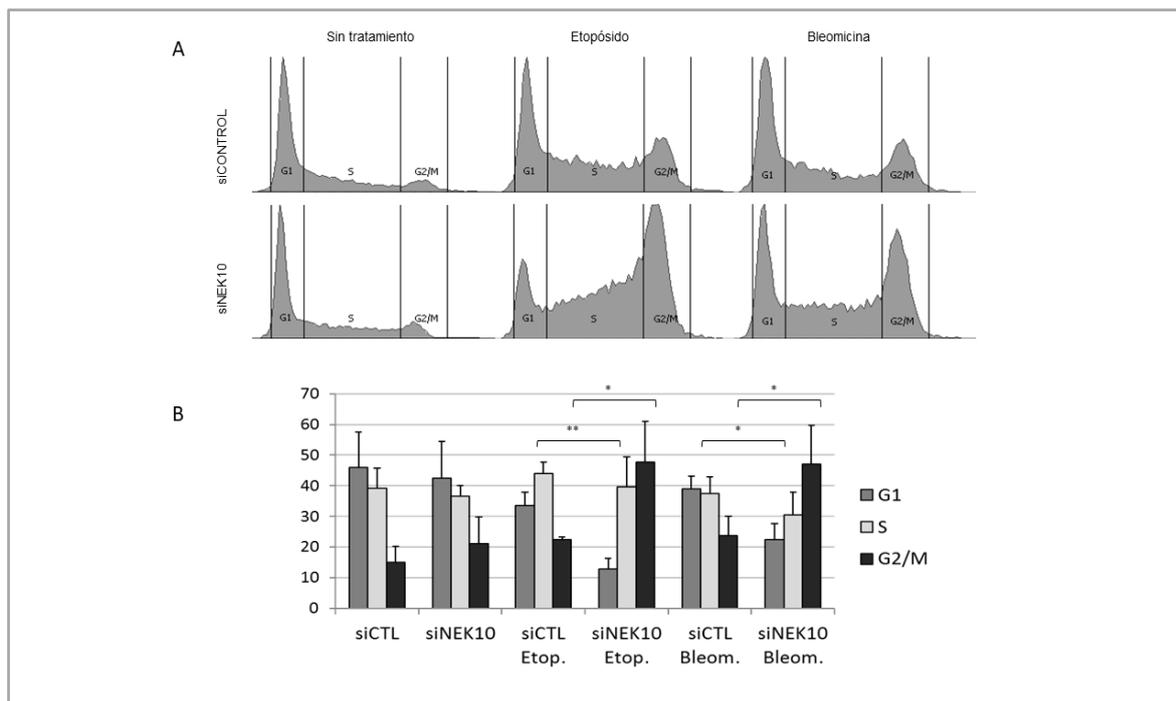
El gen con la correlación más fuerte en la integración para la comparación CEC vs QA era NEK10. Este gen codifica una quinasa de la familia NIMA y era uno de los genes localizados en la banda 3p24.1 cuya delección se había detectado en 7 de los CECs de nuestra serie. Para profundizar en el estudio del posible papel de NEK10 en la carcinogénesis del CEC se investigó su expresión por inmunohistoquímica en muestras de tejido de PF, QA y CEC. Se observó una señal nuclear de NEK10 positiva intensa en todas las muestras de PF. La tinción de NEK10 disminuía en las QAs y se negativizaba en todas las muestras de CEC analizadas ( $p < 0,01$ ) (**figura 5**). Además, los estudios de *Western blot* demostraron que la expresión de NEK10 estaba regulada negativamente en las células HaCat y SCC13 en comparación con las HEK $\alpha$  (**figura 5**).



**Figura 5. Resultados de inmunohistoquímica y Western blot de NEK10.** (A) tinción de inmunohistoquímica de NEK10 en muestras de TMA de PF, QA y CEC (escala 50  $\mu$ m). NEK10 expresado en el núcleo de los queratinocitos con disminución progresiva desde PF hasta CEC. (B) Resultados de la expresión inmunohistoquímica de NEK10 mediante histoscore. Las diferencias entre los distintos tipos de muestras fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,001$ ) (C) Western blot con extractos nucleares y citoplasmáticos de las células HEK $\alpha$  en el que se observa una disminución progresiva de la proteína NEK10 desde las células HEK $\alpha$  hasta las células SCC13, en las que prácticamente desaparece. Se utilizó la lamina b como control de carga.

### 5.4. NEK10 regula la progresión del ciclo celular en respuesta al daño al ADN

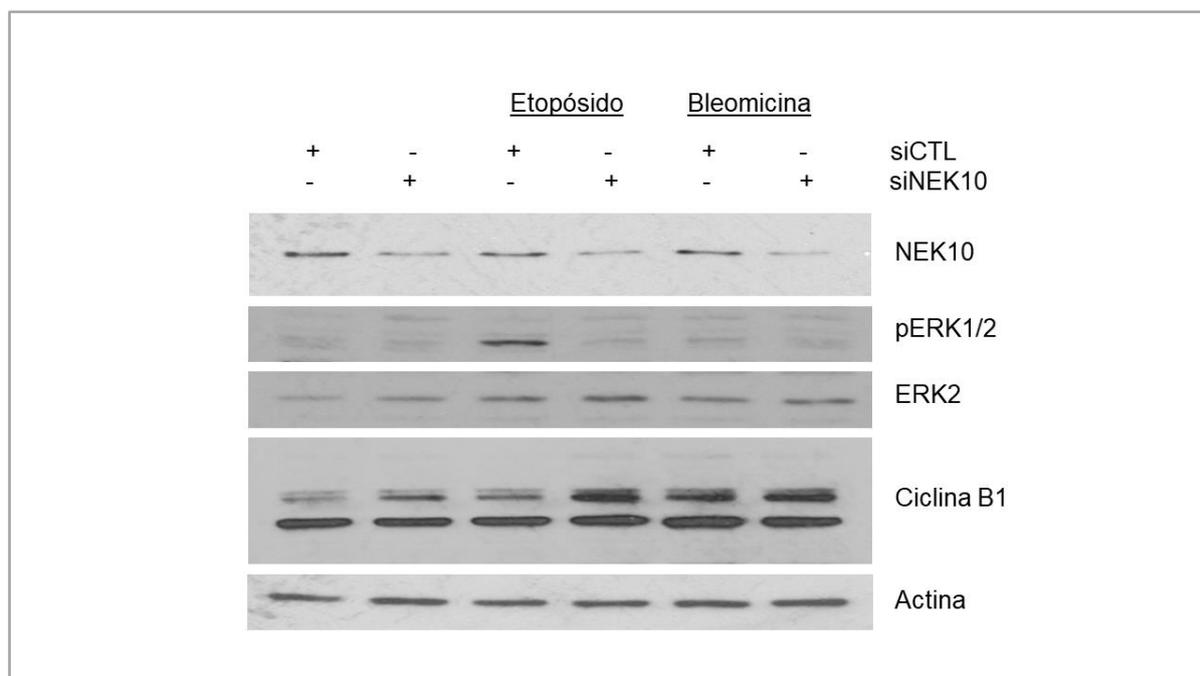
Los miembros de la familia NIMA (*Never-in-mitosis A*) o NEK juegan un papel importante en el control del ciclo celular, habiéndose implicado en la respuesta al daño celular.<sup>145</sup> La función de NEK10 en la progresión del CEC se estudió en células HaCaT con niveles reducidos de NEK10, en las que se analizó el ciclo celular en condiciones basales y bajo el efecto de agentes que producen daño en el ADN (bleomicina y etopósido). Mientras que el ciclo celular no variaba en células con niveles reducidos de NEK10 en condiciones basales, se observaba un aumento de la fase G2/M y una disminución de G1 en condiciones de daño al ADN (**figura 6**).



**Figura 6. Efectos del agotamiento de NEK10 en células HaCat tras la exposición a agentes genotóxicos.** Las células HaCat se oligofectaron con el ARNip de control (siCTL) o de NEK10 (siNEK10) y se trataron durante 24h con etopósido 1  $\mu$ M o bleomicina 5  $\mu$ g / ml **(A)** Perfiles representativos de análisis del ciclo celular, según lo determinado por citometría de flujo. **(B)** Cuantificación de las poblaciones durante las diferentes etapas del ciclo celular. Los resultados son de tres experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar de la media. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,005$ .

La disminución de NEK10 dificulta la fosforilación de ERK1/2 en respuesta a la RUV en células HEK293 y se ha sugerido que la acción de NEK10 sobre el ciclo celular podría estar mediada por la activación de ERK1/2.<sup>146</sup> De cara a conocer si la acción de NEK10 sobre el ciclo celular en las células HaCat estaba mediada por la activación de ERK1/2, procedimos a estudiar su fosforilación **(figura 7)**. Sin embargo, mientras que ERK1/2 se activó por fosforilación en las células tratadas con etopósido sin niveles disminuidos de NEK10, la bleomicina no afectó a la fosforilación de ERK1/2, sugiriendo un mecanismo diferente para la actuación de

NEK10 sobre el punto de control G2/M del ciclo celular. Este punto de control del ciclo previene a las células de entrar en mitosis cuando existe daño en el ADN, siendo su principal regulador los complejos de ciclina B-CDK1, que se inhiben en respuesta al estrés genotóxico. El análisis por *Western blot* de los niveles de ciclina B en las células HaCat mostró dos bandas: la inferior, correspondiente al peso molecular esperado para Ciclina B1 (55 kDa), y otra que correspondería a una forma de ciclina B1 ubiquitinada de 63 kDa descrita previamente y que estaría protegida frente a la degradación mediada por proteosomas (**figura 7**).<sup>147</sup> Por lo tanto, en nuestro estudio la depleción de NEK10 dio lugar a un aumento de la ciclina B1 de 63 kDa en respuesta al daño al ADN, lo que, junto con los aumentos de la población en la fase G2/M del ciclo celular, sugeriría que la pérdida de NEK10 podría favorecer la progresión del ciclo celular en las células tumorales.



**Figura 7.** Niveles de proteína en células HaCat oligoinfectadas con RNAi de control (siCTL) y de NEK10 (siNEK10) y no tratadas o tratadas con etopósido o bleomicina. Actina como control de carga.

### 5.5. Hallazgos clínicos e histopatológicos

De los 99 CECs primarios estudiados, 51 se clasificaron como CECNMs y 48 como CECMs (**tabla 6**). La composición por sexo y edad fue similar en ambos grupos, con predominio de los hombres y una edad media de 76 y 79 años en CECNM y CECM, respectivamente. La mayoría de los tumores se localizaban en áreas fotoexpuestas siendo la cabeza la localización más frecuente, seguida de las extremidades y el tronco. Únicamente una minoría de casos (6 en CECNMs frente a 5 en CECMs) correspondían a pacientes inmunodeprimidos. Dos CENMs y 10 CECMs eran recidivas de tumorales locales.

Los siguientes parámetros se asociaron con un aumento del riesgo de metástasis en el análisis univariante ( $p < 0,05$ ): la recurrencia, la mala diferenciación, el grosor vertical, el nivel anatómico (Clark  $\geq 4$ ), la infiltración perineural y el diámetro del nervio invadido  $\geq 0.1$ mm. Además, los CECMs presentaban un mayor estadio de la T por los sistemas de AJCC-8 ( $p < 0,01$ ) y BWH ( $p < 0,01$ ).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con respecto al tamaño tumoral, la invasión vascular ni la presencia de desmoplasia.

**Tabla 6.** Características clínicas, histopatológicas e inmunohistoquímicas de los CECNMs y CECMs y su asociación con el riesgo de metástasis en el análisis univariado.

|                                   | CECNM (n=51) | CECM (n=48)  | p     |
|-----------------------------------|--------------|--------------|-------|
| <b>Variables clínicas</b>         |              |              |       |
| <b>Sexo varón, n (%)</b>          | 34/51 (66.6) | 36/48 (75)   | NS    |
| <b>Edad, media (± DS)</b>         | 76.3 (9.2)   | 79.2 (8.8)   | NS    |
| <b>Localización</b>               |              |              |       |
| Cabeza                            | 42/51 (82.4) | 41/48 (85.4) | NS    |
| Tronco                            | 1/51 (2)     | 2/48 (4.2)   |       |
| Extremidades                      | 8/51 (15.7)  | 5/48 (10.4)  |       |
| <b>Oreja</b>                      | 5/50 (10)    | 9/48 (18.8)  | NS    |
| <b>Labio</b>                      | 2/50 (4)     | 0/49 (0)     | NS    |
| <b>Exposición solar</b>           |              |              |       |
| Sí                                | 46/49 (93.9) | 43/48 (89.6) | NS    |
| <b>Tamaño horizontal (mm)</b>     |              |              |       |
| > 20                              | 20/51 (39.2) | 19/44 (43.2) | NS    |
| <b>Caso recurrente</b>            |              |              |       |
| Sí                                | 2/51 (3.9)   | 10/47 (21.3) | <0.01 |
| <b>Inmunosupresión</b>            |              |              |       |
| Sí                                | 6/51 (11.8)  | 5/44 (11.4)  | NS    |
| <b>Variables histopatológicas</b> |              |              |       |
|                                   | <b>n (%)</b> | <b>n (%)</b> |       |
| <b>Diferenciación, n (%)</b>      |              |              |       |
| Buena                             | 21/51 (41.2) | 7/48 (14.6)  | <0.01 |
| Moderada                          | 27/51 (52.9) | 33/48 (68.8) |       |
| Mala                              | 3/51 (5.9)   | 8/48 (16.7)  |       |
| <b>Grosor tumoral</b>             |              |              |       |
| > 6 mm                            | 10/51 (19.6) | 22/46 (47.8) | <0.01 |
| <b>Nivel de Clark</b>             |              |              |       |
| ≥ 4                               | 35/51 (66.8) | 43/46 (93.5) | <0.01 |
| <b>Invasión perineural</b>        |              |              |       |
| Sí                                | 1/51 (2)     | 8/48 (16.7)  | 0.014 |
| <b>Diámetro del nervio</b>        |              |              |       |
| ≥ 0.1mm                           | 0/51 (0)     | 7/48 (14.6)  | <0.01 |
| <b>Invasión vascular</b>          |              |              |       |
| Sí                                | 0/51 (0)     | 2/48 (4.2)   | NS    |
| <b>Desmoplasia</b>                |              |              |       |
| Sí                                | 1/51 (2)     | 3/48 (6.3)   | NS    |
| <b>Sistemas de estadificación</b> |              |              |       |
| <b>TNM (AJCC-8), n (%)</b>        |              |              |       |
| pT1                               | 24/51 (47.1) | 12/46 (26.1) | <0.01 |
| pT2                               | 13/51 (25.5) | 6/46 (13)    |       |
| pT3                               | 14/51 (27.5) | 25/46 (54.3) |       |
| pT4                               | 0/51 (0)     | 3/46 (6.5)   |       |

## Resultados

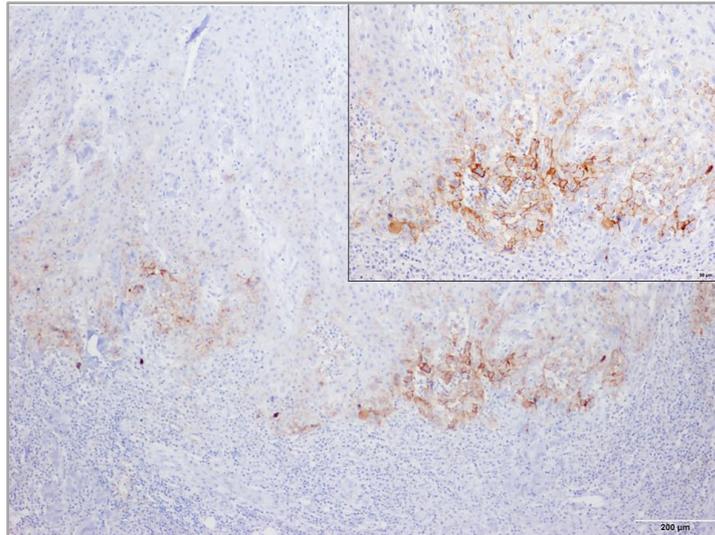
|                      |              |              |                 |
|----------------------|--------------|--------------|-----------------|
| <b>TNM (Brigham)</b> | 24/51 (47.1) | 10/45 (22.2) | <b>&lt;0.01</b> |
| <b>1</b>             | 23/51 (45.1) | 22/45 (48.9) |                 |
| <b>2a</b>            | 4/51 (7.8)   | 9/45 (20.0)  |                 |
| <b>2b</b>            | 0/51 (0)     | 4/45 (8.9)   |                 |
| <b>3</b>             |              |              |                 |

| <b>Inmunohistoquímica</b>                                    |               |              |              |
|--|---------------|--------------|--------------|
| <b>PD-L1 +, punto corte <math>\geq 1\%</math><br/>n, (%)</b> | 13/50 (26)    | 23/46 (50)   | <b>0.02</b>  |
| <b>Intensidad PD-L1</b>                                      |               |              |              |
| <b>0</b>   | 36/51 (72)    | 23/46 (50)   |              |
| <b>1+</b>  | 5/51 (10)     | 14/46 (30.4) | <b>0.055</b> |
| <b>2+</b>  | 7/51 (14)     | 6/46 (13)    |              |
| <b>3+</b>  | 2/51 (4)      | 3/46 (6.5)   |              |
| <b>Mediana del % de células tumorales PD-L1 + (rango)</b>    | 0 (0-1)       | 0.5 (0-2)    | <b>0.027</b> |
| <b>Histoscore de inflamación peritumoral</b>                 | 140 (30-240)  | 100 (50-240) | NS           |
| <b>Histoscore de CD8 peritumorales (rango)</b>               | 40 (10.2-120) | 32.5 (8-72)  | NS           |

### 5.6. Expresión de PD-L1 y CD8 en los tumores primarios

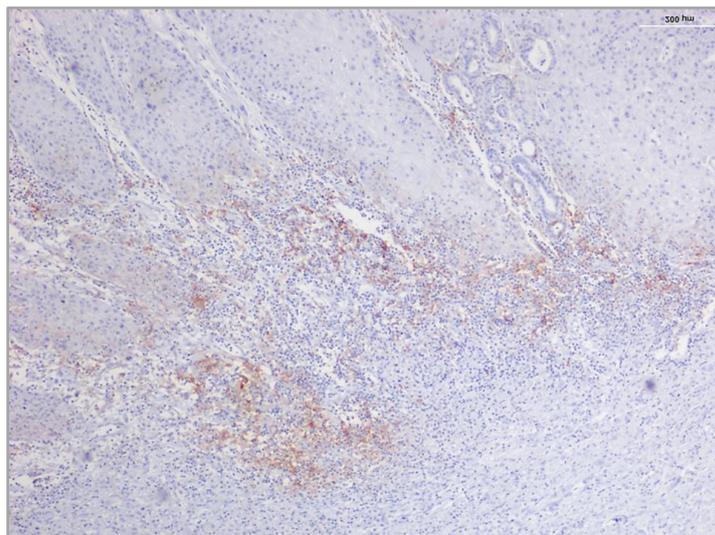
Se encontró expresión positiva de PD-L1 (punto de corte  $\geq 1\%$ ) en el 26% de los CECNMs y 50% de los CECMs ( $p = 0,02$ ) (**tabla 6**). Al comparar los dos grupos en función del porcentaje de células tumorales PD-L1 positivas, este también era significativamente superior en los CECMs ( $p = 0,027$ ).

Casi todos los CECs positivos para PD-L1 mostraron una expresión de PDL1 baja, con un porcentaje medio de células tumorales positivas de 1,5 (1–10) y una intensidad baja (1+) en el 50%. En la mayoría de los tumores positivos la tinción de PD-L1 se observaba en el borde invasivo periférico del tumor (**figura 8**).



**Figura 8.** Tinción de PD-L1 con intensidad 3+ de las células del margen infiltrativo del CEC. Se puede apreciar una tinción más suave (1+) de las células del interior del tumor. Escala 200 y 50  $\mu\text{m}$ .

Con respecto a la expresión de PD-L1 por las células inflamatorias, no se observaron diferencias entre los CECNMs y CECMs. Por norma general, las células inflamatorias positivas para PD-L1 se disponían a lo largo del borde de avance profundo del CEC, junto con las células tumorales positivas para PD-L1 (**figura 9**).



**Figura 9.** Positividad de las células inflamatorias (1-2+) a lo largo del margen invasivo tumoral. Escala 200  $\mu\text{m}$ .

## Resultados

Asimismo, no se hallaron diferencias respecto a la cantidad del infiltrado inflamatorio o a la expresión de CD8 por las células inflamatorias entre CECNMs y CECMs (**tabla 6**).

Para controlar los posibles factores de confusión, se realizó un análisis multivariable ajustado por la edad y el sexo. Se encontró una asociación de los siguientes parámetros con un mayor riesgo de metástasis: la expresión de PD-L1 positiva, la recurrencia, la mala diferenciación y la invasión perineural (**tabla 7**).

**Tabla 7.** Análisis multivariable de las variables clínicas, histopatológicas e inmunohistoquímicas del CEC asociadas a riesgo de metástasis.

|  | OR <sub>crudo</sub> | IC 95%     | <i>p</i> | OR <sub>ajustado</sub> | CI 95%      | <i>p</i>     |
|--|---------------------|------------|----------|------------------------|-------------|--------------|
| <b>Diferenciación</b>                          | 2.32                | 0.97-5.53  | 0.057    | 2.66                   | 1.02-6.93   | <b>0.045</b> |
| <b>Invasión perineural</b>                     | 10.47               | 1.10-99.50 | 0.041    | 11.23                  | 1.08-117.05 | <b>0.043</b> |
| <b>Caso recurrente</b>                         | 8.40                | 1.39-50.83 | 0.02     | 7.71                   | 1.17-50.95  | <b>0.034</b> |
| <b>PD-L1+ punto corte <math>\geq</math> 1%</b> | 3.74                | 1.36-10.34 | 0.011    | 3.37                   | 1.17-9.68   | <b>0.024</b> |
| <b>Grosor tumoral &gt;6 mm</b>                 | 1.63                | 0.56-4.76  | 0.374    | 1.75                   | 0.58-5.31   | 0.319        |

OR, odds ratio ajustados por edad y sexo

Además, con el objetivo de detectar las posibles variables asociadas con una expresión aumentada de PD-L1, se analizaron los datos demográficos, histopatológicos y de inmunohistoquímica de los tumores PD-L1 positivos y negativos (**tabla 8**). En el análisis univariado, los tumores PD-L1 positivos presentaban un mayor tamaño horizontal y una mayor proporción de nivel de Clark  $\geq$  IV que los tumores PD-L1 negativos ( $p < 0,01$  y  $p = 0,035$ , respectivamente). Finalmente, no se encontraron diferencias entre los tumores PD-L1 positivos y

negativos en cuanto a la cantidad del infiltrado inflamatorio peritumoral ni el *histoscore* de CD8.

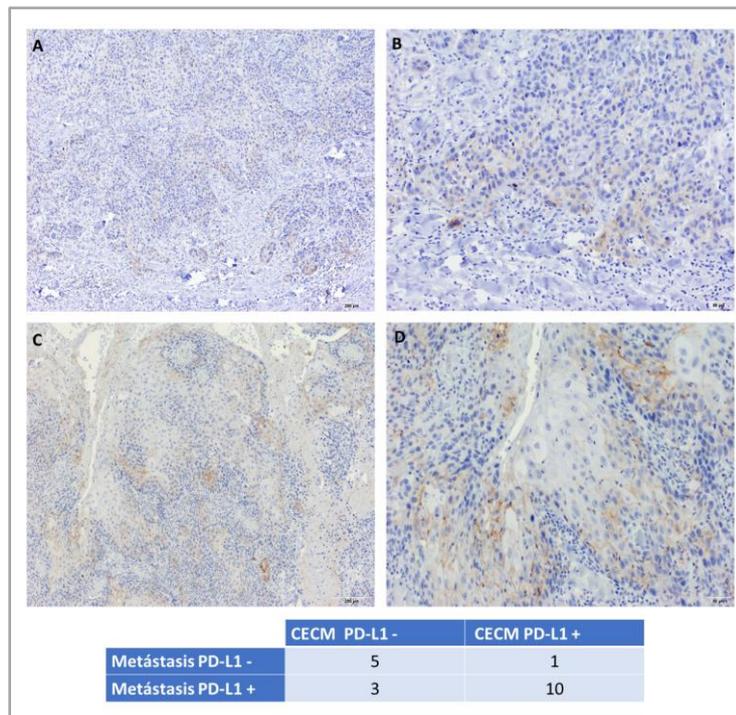
**Tabla 8.** Características clínicas, histopatológicas e inmunohistoquímicas de los CECs PD-L1 negativos y positivos (punto de corte  $\geq 1\%$ ). Asociación de las variables con la expresión positiva de PD-L1 en el análisis univariado.

|  | PD-L1 - (n=60) | PD-L1 + (n=36) | <i>p</i>        |
|--|----------------|----------------|-----------------|
| <b>VARIABLES CLÍNICAS</b>                |                |                |                 |
| <b>Sexo hombre, n (%)</b>                | 43/60 (71.7)   | 26/36 (72.2)   | NS              |
| <b>Edad, (media <math>\pm</math> DS)</b> | 76.4 (8.2)     | 79.4 (10.4)    | NS              |
| <b>Localización</b>                      |                |                |                 |
| Cabeza                                   | 51/60 (85)     | 29/36 (80.6)   | NS              |
| Tronco                                   | 2/60 (3.3)     | 1/36 (2.8)     |                 |
| Extremidades                             | 7/60 (11.7)    | 6/36 (16.7)    |                 |
| <b>Fotoexposición</b>                    |                |                |                 |
| Sí                                       | 54/58 (93.1)   | 32/36 (88.9)   | NS              |
| <b>Tamaño horizontal (mm)</b>            |                |                |                 |
| > 20                                     | 17/59 (28.8)   | 21/34 (61.8)   | <b>&lt;0.01</b> |
| <b>Caso recurrente</b>                   |                |                |                 |
| Sí                                       | 8/59 (13.6)    | 3/36 (8.3)     | NS              |
| <b>Imunosupresión</b>                    |                |                |                 |
| Sí                                       | 7/57 (12.3)    | 4/35 (11.4)    | NS              |
| <b>VARIABLES PATOLÓGICAS</b>             |                |                |                 |
| <b>Diferenciación</b>                    |                |                |                 |
| Buena                                    | 21/60 (35)     | 6/36 (16.7)    | NS              |
| Moderada                                 | 32/60 (53.3)   | 26/36 (72.2)   |                 |
| Mala                                     | 7/60 (11.7)    | 4/36 (11.1)    |                 |
| <b>Grosor tumoral (mm)</b>               |                |                |                 |
| > 6                                      | 17/59 (28.8)   | 15/35 (42.9)   | NS              |
| <b>Nivel de Clark</b>                    |                |                |                 |
| $\geq 4$                                 | 43/59 (72.9)   | 32/35 (91.4)   | <b>0.035</b>    |
| <b>Invasión perineural</b>               |                |                |                 |
| Sí                                       | 5/60 (8.3)     | 3/36 (8.3)     | NS              |
| <b>Diámetro del nervio (mm)</b>          |                |                |                 |
| $\geq 0.1$                               | 4/60 (6.7)     | 3/36 (8.3)     | NS              |
| <b>Invasión vascular</b>                 |                |                |                 |
| Sí                                       | 1/60 (1.7)     | 1/36 (2.8)     | NS              |
| <b>Desmoplasia</b>                       |                |                |                 |
| Sí                                       | 1/60 (2)       | 3/3 (6.3)      | NS              |

| Sistemas de estadificación                   |              |              |    |
|--|--------------|--------------|----|
| <b>TNM (AJCC-8)</b>                          |              |              |    |
| <b>pT1</b>                                   | 25/59 (42.4) | 10/36 (27.8) | NS |
| <b>pT2</b>                                   | 12/59 (20.3) | 6/36 (16.7)  |    |
| <b>pT3</b>                                   | 21/59 (35.6) | 18/36 (50)   |    |
| <b>pT4</b>                                   | 1/59 (1.7)   | 2/36 (5.6)   |    |
| <b>TNM (Brigham)</b>                         |              |              |    |
| <b>1</b>                                     | 24/59 (40.7) | 9/35 (25.7)  | NS |
| <b>2a</b>                                    | 29/59 (42.2) | 15/35 (42.9) |    |
| <b>2b</b>                                    | 5/59 (8.5)   | 8/35 (22.9)  |    |
| <b>3</b>                                     | 1/59 (1.7)   | 3/35 (8.6)   |    |
| Inmunohistoquímica                           |              |              |    |
| <b>Histoscore de inflamación peritumoral</b> | 140 (20-210) | 120 (60-240) | NS |
| <b>Histoscore de CD8 mediana (rango)</b>     | 32 (7-96)    | 40 (12-112)  | NS |

### 5.7. Expresión de PD-L1 y CD8 en los CECM y sus metástasis

Siguiendo los mismos procedimientos descritos para los CECs primarios, se estudió la expresión de PD-L1 y CD8 en 25 CECMs primarios y sus correspondientes metástasis. La expresión de PD-L1 pudo valorarse en ambos tumores (primario y su metástasis) en 19 de los pacientes, presentando 13 de ellos una expresión positiva de PD-L1 en las dos muestras. La mayoría (90,9%) de las metástasis pertenecientes a tumores positivos para PD-L1 también eran positivas para esta proteína ( $p = 6.25$ ). Sin embargo, se encontró una tendencia no significativa hacia una expresión más alta de PD-L1 en las metástasis en comparación con sus tumores primarios ( $p = 0,058$ ) (**figura 10**). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos para la expresión de CD8.



**Figura 10.** Tinción de PD-L1 de un CEC primario (A y B) y de su metástasis (C y D). **(A y B)** CEC primario con tinción de PD-L1 en la membrana de las células tumorales con intensidad 1+. Escala 200 y 50  $\mu\text{m}$ . **(C y D)** Metástasis con tinción de PD-L1 de la membrana de las células con intensidad 2+. Escala 200 y 50  $\mu\text{m}$ . Tabla con los datos de expresión de PD-L1 correspondientes a los 19 casos de CEC primario y su metástasis estudiados.



## 6. Discusión

---



El CEC es un tumor heterogéneo que presenta una carga de mutaciones somáticas muy elevada y alteraciones en múltiples cromosomas.<sup>14</sup> Este hecho, junto con la elevada carga mutacional presente en la PF, probablemente ha dificultado que se tenga un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares clave implicados en su carcinogénesis y progresión desde las lesiones precursoras a las lesiones malignas establecidas y a sus metástasis. Asimismo, no disponemos de biomarcadores con valor pronóstico ni de dianas moleculares que permitan aproximaciones terapéuticas más precisas y dirigidas, tanto para las lesiones precoces (QAs) como para los estadios avanzados (CECs irresecables o metastásicos).

En los últimos años han surgido distintas plataformas que permiten un estudio más exhaustivo y detallado del genoma y del transcriptoma. Recientemente, un mejor conocimiento de los mecanismos de progresión del CEC y de la interacción entre las células tumorales y el sistema inmunológico, ha permitido estudiar nuevas moléculas como posibles biomarcadores y desarrollar nuevos fármacos antineoplásicos dirigidos frente a dianas inmunológicas. La experiencia inicial con alguno de estos tratamientos, como los dirigidos frente a las moléculas PD-1 o PD-L1, ha permitido obtener unos resultados prometedores en distintos subtipos de cánceres, incluyendo el CEC.

En la primera parte de nuestro trabajo, analizamos el perfil de expresión génica (ARN) y las variaciones en el número de copias (ADN) en muestras apareadas de 10 individuos, incluyendo piel no-tumoral fotoexpuesta (PF), pretumoral (QA) y

tumoral (CEC). Los resultados de este trabajo han sido publicados en el artículo 1 adjuntado en la sección de anexos del manuscrito de esta tesis doctoral.

En los últimos años, se han publicado un número considerable de estudios en los que se han valorado las diferencias de expresión génica entre biopsias de CEC y de piel sana,<sup>18,148–150</sup> algunos de los cuales incluían también lesiones premalignas (QAs).<sup>28,36,37,151</sup> Únicamente en uno de estos estudios se valoraron simultáneamente las alteraciones genómicas y de expresión.<sup>28</sup> Sin embargo, en dicho estudio, los pacientes incluidos eran individuos inmunosuprimidos y las muestras de piel sana fueron obtenidas de zonas no fotoexpuestas.

En nuestro análisis del transcriptoma, a partir de los resultados de un *array* de expresión, encontramos muy pocos genes diferencialmente expresados entre las biopsias de PF y QAs (n=189), siendo la mayoría de ellos genes implicados en vías relacionadas con la inflamación. Las escasas diferencias detectadas parecen apoyar el concepto de campo de cancerización. En consonancia con nuestros resultados, la presencia de una respuesta inflamatoria intensa se considera como uno de los hallazgos histopatológicos que pueden servir para diferenciar el campo de cancerización o la PF de las QAs.<sup>152</sup>

Se detectaron únicamente 400 genes diferencialmente expresados entre QA y CEC, si bien la mayoría de las QAs correspondían a lesiones no adyacentes al CEC. En contraste, al comparar los CECs con las PFs, detectamos un total de 1135 genes diferencialmente expresados, a pesar de que una proporción considerable de las muestras de PFs fueron obtenidas de la piel adyacente al CEC. Las similitudes observadas en el perfil de expresión génica entre CECs y QAs apoyan

un origen común para ambas patologías y son similares a los resultados de estudios previos en los que se ha analizado su transcriptoma.<sup>28,36,37,151,153,154</sup> Recientemente, Rodríguez-Paredes y cols. evidenciaron que las QAs y los CECs comparten también diferencias epigenéticas (metilación), en contraste con la PF.<sup>155</sup>

Se ha objetivado una falta de homogeneidad en los resultados entre los distintos estudios cuando se utilizan plataformas de *arrays* para evaluar la expresión génica del CEC.<sup>38</sup> Estas diferencias podrían deberse a la falta de uniformidad en la metodología técnica y analítica utilizada (plataformas, tipo de muestras, análisis estadísticos).<sup>38</sup> Sin embargo, nuestros resultados presentaban semejanzas (específicamente con respecto a los genes más sobreexpresados, como mieloperoxidasas o *PTHLH*) con estudios previos de expresión génica en los que se utilizaron plataformas de *arrays* similares.<sup>28,36,37,148,149,154,156</sup> No obstante, en contraste con dos trabajos anteriores en los que se observaba un número considerable de genes (173 y 186 genes en total) que seguían un gradiente de expresión progresivo desde las lesiones precursoras hasta el CEC, nosotros únicamente encontramos 22 genes que siguieran este patrón de expresión a lo largo de las tres etapas de la carcinogénesis del CEC.<sup>28,36</sup>

Sorprendentemente, no detectamos diferencias entre los tres tipos de muestras estudiadas con relación a la expresión de muchos de los genes frecuentemente mutados en el CEC descritos en la literatura y/o en la base de datos COSMIC, incluyendo: *TP53*, *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *CDKN2A*, *FAT1*, *HRAS*, *KRAS*, *KMT2C* y *KMT2D*. Las únicas excepciones fueron *TGFBR1* y *NRAS*, que se encontraban sobreexpresados en el CEC en el *array* de expresión. En consonancia con nuestros hallazgos, Kathpalia y cols. y Haider y cols. tampoco encontraron

diferencias en la expresión de p53 y CDKN2A entre los CECs y la piel sana no-tumoral.<sup>18,157</sup> Esta ausencia de correlación mutación/expresión podría explicarse por la posible naturaleza funcional de dichas mutaciones, sin dar lugar a una alteración en la expresión, o porque dichas mutaciones ocasionaran cambios significativos, pero de baja intensidad, en los niveles de expresión que podrían no ser detectados (al quedar fuera de los puntos de corte) en el análisis estadístico del *array*.<sup>28,149</sup> Finalmente, las mutaciones en algunos de estos genes (*NOTCH1*, *NOTCH2*, *RAS* y *TP53*) tendrían lugar en etapas precoces de la evolución del CEC y ya estarían presentes en PF.<sup>2,13,17,21-24</sup> Por todo ello, parece probable que, junto con las mutaciones somáticas, sea necesaria la participación de otros factores para el desarrollo y la progresión de un CEC.

Una de las limitaciones de los estudios utilizando *arrays* de expresión es el gran número de genes diferencialmente expresados detectados, lo que puede dificultar la identificación de genes cruciales para la evolución tumoral. En nuestro trabajo identificamos dos genes con una potencial función biológica relevante en el CEC: *BNC1* y *FOSL1*.

EL BNC1, o basonuclina-1, es un factor de transcripción de dedos de zinc específico del tipo de célula y altamente conservado a lo largo de la evolución. Inicialmente fue descrito como una proteína específica de queratinocitos basales de epitelios escamosos estratificados, como la epidermis o la córnea, donde parece que actuaría manteniendo su capacidad proliferativa y evitando su diferenciación terminal.<sup>158,159</sup> Posteriormente, también se ha detectado su expresión en otras células, tales como las células germinales de testículos y ovarios.<sup>159,160</sup>

El gen *BNC1* se localiza en el cromosoma 15 y posee 3 pares de brazos de zinc y una banda de serina.<sup>159</sup> *BNC1* actuaría como un factor de transcripción regulando la transcripción de las RNA polimerasas I, II y posiblemente también la III.<sup>161</sup> Modula la expresión de proteínas implicadas en múltiples funciones celulares: síntesis de RNA ribosomal, estructura de la cromatina, transcripción y unión a DNA, canales de iones, unión y adhesión celular, transducción de señales y transporte intracelular.<sup>161</sup>

Numerosos estudios han demostrado que una expresión aberrante de *BNC1* contribuye a la progresión tumoral, pudiendo actuar como un gen supresor tumoral o como un oncogén. Se ha descrito el silenciamiento de *BNC1* por metilación de su promotor en una amplia variedad de tumores malignos, incluyendo el carcinoma hepatocelular, carcinoma renal, cáncer colorrectal, mesotelioma maligno, leucemia linfocítica, neoplasias pulmonares, prostáticas y pancreáticas.<sup>162–169</sup> En estos tumores *BNC1* actuaría como un gen supresor tumoral. Apoyando esta función, se ha observado que la expresión aumentada de *BNC1* inhibe la formación de colonias y la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de páncreas.<sup>170</sup> Sin embargo, en otros tumores, como el cáncer de mama y el carcinoma escamoso (CE) de cabeza y cuello, la expresión elevada de *BNC1* se ha relacionado con una mayor capacidad metastática e invasiva.<sup>171,172</sup> Se ha descrito asimismo una expresión aumentada de *BNC1* en el carcinoma basocelular.<sup>173</sup> Por lo tanto, *BNC1* podría jugar distintos papeles en el cáncer, dependiendo tanto del tipo de tumor como del estadio evolutivo de la enfermedad.

En la piel sana, BNC1 se localiza en la capa basal y suprabasal de la epidermis, así como en la vaina folicular externa y en las glándulas sebáceas.<sup>158</sup> En la epidermis, BNC1 puede localizarse tanto en el núcleo como en el citoplasma de los queratinocitos.<sup>174</sup> Por análisis mutagénico se ha demostrado que la localización citoplasmática depende de una fosforilación reversible y dinámica de la serina 541, pudiendo variar dentro de la misma célula.<sup>144,174</sup> El papel de las diferentes localizaciones subcelulares de BNC1 en los queratinocitos humanos continúa siendo desconocido, ya que, aunque su localización nuclear se ha relacionado con una elevada proliferación celular en cultivos de queratinocitos, en las células del folículo piloso, donde la proteína se localiza en el núcleo, dicha expresión no se ha relacionado con una alta tasa de proliferación.<sup>174</sup>

En nuestro estudio, de manera similar a estudios previos de CE de cabeza y cuello, detectamos un aumento de la expresión de BNC1 en los CECs.<sup>171</sup> Dicho aumento era de intensidad ascendente y progresiva desde la PF, a las QAs y los CECs. En la detección por inmunohistoquímica de la expresión de BNC1 llamaba la atención que, mientras en los queratinocitos de PF la localización de BNC1 era predominantemente nuclear, en la mayoría de las muestras de CEC se situaba principalmente en el citoplasma. Matsuzaki y cols. observaron que la RUV B promovía la localización nuclear de BNC1 en la piel de un ratón *in vivo*, siendo dicha traslocación reversible tras cesar la radiación, excepto cuando la dosis total de radiación alcanzaba niveles carcinogénicos.<sup>175</sup>

Respecto al posible papel de BNC1 en el CEC y su localización en el citoplasma, una posibilidad sería que la proteína presente en el citoplasma fuese inactiva y que

actuara en el queratinocito como un gen supresor tumoral. Así, BNC1 actuaría como un factor de transcripción regulador del queratinocito en condiciones fisiológicas, pero sería desplazada al citoplasma para impedir su actividad tras un daño al ADN que pudiera conllevar una transformación maligna. Otra posibilidad es que BNC1 fuese funcionalmente activa en el citoplasma de la célula, donde ejercería un papel distinto al de factor de transcripción nuclear, posiblemente a nivel de señalización celular. El aumento progresivo de la expresión del gen BNC1 desde la PF hasta el CEC detectado en nuestro estudio apoyaría más esta segunda hipótesis. A este respecto, se ha detectado que BNC1 presenta una localización únicamente citoplasmática en las células del epitelio anterior del cristalino, siendo la función que ejerce desconocida.<sup>176</sup> Asimismo, en etapas precoces de la espermatogénesis, BNC1 se concentra en los núcleos de las espermatogonias y los espermatozoides, mientras que durante la espermiogénesis se desplaza desde el núcleo al citoplasma.<sup>177</sup> Wu y cols. descubrieron que la proteína de unión al factor de transcripción de choque térmico 2 (HSF2BP) presente en los testes podía interactuar con BNC1 inhibiendo su actividad transcripcional sin afectar a su nivel de expresión, a través del secuestro de BNC1 desde el núcleo al citoplasma de la célula.<sup>178</sup> Por lo tanto, son necesarios estudios adicionales para comprender mejor el papel funcional del BNC1 y su distribución intracelular durante la carcinogénesis en el CEC.

Junto a BNC1, en nuestro estudio identificamos el antígeno 1 relacionado con Fos o *Fos-related antigen-1* (FOSL1), también conocido como FRA1, como un gen con potencial relevancia biológica en el desarrollo del CEC. El gen *FOSL1* se localiza en el locus 11q13 y codifica un factor de transcripción perteneciente a la familia

FOS. Esta familia de proteínas incluye a c-FOS, FOSB y FRA2 y es un componente importante del factor de transcripción AP-1, un heterodímero de las proteínas de las familias JUN y FOS que juegan un papel central en la regulación de la transcripción génica en múltiples procesos biológicos.<sup>179</sup> La expresión y la función de FOSL1 pueden regularse tanto a nivel transcripcional como post-traducciona (principalmente a través de la fosforilación), dependiendo principalmente de la vía de señalización RAS/ERK.<sup>179</sup> La expresión de FOSL1 también puede regularse a través de miARNs.

Se ha descrito una expresión anómala de FOSL1 en múltiples tumores como el melanoma, cáncer de mama, de cérvix, ovario, esófago, colorrectal o CE de cabeza y cuello.<sup>179,180</sup> Puede actuar tanto como un protooncogén o como un gen supresor tumoral. En la mayoría de los casos se detecta un aumento de la expresión que se ha relacionado con una mayor proliferación, capacidad de invasión, desarrollo de metástasis (a través de la regulación de la TEM) y apoptosis.<sup>179</sup> Además, se ha relacionado su expresión en las células tumorales con la respuesta a la radioterapia y quimioterapia, habiéndose propuesto como una potencial diana terapéutica.<sup>143,179,181</sup> Zoumpourlis y cols., en un estudio de carcinogénesis experimental realizado en líneas celulares de piel de ratón derivadas de tumores inducidos por mutágenos químicos, observaron niveles aumentados de FOSL1 (forma fosforilada) en las células del CEC.<sup>182</sup> Asimismo, el aumento en la función del factor de transcripción AP-1 resultante de la activación epigenética de la expresión de JUN y FOSL1 se ha relacionado con la capacidad de los CEs de cabeza y cuello para el crecimiento invasivo y la producción de metástasis.<sup>183</sup> En esta misma línea, los niveles de FOSL1 se han asociado con un aumento en la

proliferación (vía AKT) y la producción de metástasis (vía JNK/C-Jun) en líneas celulares de CE de cabeza y cuello y CEC. Finalmente, en este mismo estudio, la inhibición de la expresión de FOSL1 *in vitro* daba lugar a un bloqueo en la capacidad de las células del CEC para crecer y migrar.<sup>181</sup>

En nuestro estudio, al igual que en la mayoría de CEs de otras localizaciones, la expresión a nivel de ARNm de FOSL1 estaba aumentada en QAs y CECs con respecto a la PF, aunque no observamos diferencias entre CEC y QA. También evaluamos la expresión inmunohistoquímica de FOSL1 y, en contraste con algunos estudios en CEs de cabeza y cuello en los que se observaba un cambio de localización subcelular (citoplasma vs. núcleo) en función del tipo de lesión, objetivamos una localización predominantemente nuclear en todas las muestras estudiadas (PF, QA y CEC).<sup>180</sup> Estos resultados concuerdan con otros trabajos realizados en cáncer de cabeza y cuello y en esófago, en los que también observaban una localización principalmente nuclear.<sup>184,185</sup> En nuestra serie observamos una expresión selectiva de la proteína FOSL1 en las células del frente de invasión tumoral de los CECs, un fenómeno descrito previamente por algunos autores en el CE oral.<sup>186</sup> Este hallazgo apoyaría la hipótesis de que FOSL1 podría actuar aumentando la capacidad de invasión de las células tumorales en el CEC, con potencial valor pronóstico. Sin embargo, son necesarios estudios en un mayor número de muestras para confirmar estos resultados.

En una segunda parte de nuestro trabajo estudiamos las alteraciones en el número de copias de ADN de todas las muestras mediante un *microarray* de SNP. La mayoría de las alteraciones se observaron en los cromosomas 8, 9 y 3 y se

detectaron con mayor frecuencia en los CECs que en las QAs, unos resultados similares a los descritos en la literatura.<sup>28,33,187</sup> Sin embargo, en contraste con otras publicaciones, las alteraciones en el cromosoma 17 no fueron un hallazgo habitual en nuestros CECs.<sup>29,188</sup>

De manera similar a Hameetman y cols. detectamos pocas alteraciones genéticas compartidas entre los CECs y las QAs, incluso entre lesiones obtenidas de un mismo paciente. Sin embargo, algunas alteraciones del genoma eran comunes para ambas patologías, apoyando su relación.<sup>28</sup> En contraste, Asthon y cols., mediante técnicas de hibridación genómica comparada, observaron que ambas lesiones compartían un número elevado de alteraciones cromosómicas, aunque el CEC presentaba un número significativamente mayor de aberraciones.<sup>29</sup> Al igual que en su investigación, los CECs y las QAs de nuestra serie compartían ganancias en 3q y 8q, aunque no compartían el resto de alteraciones detectadas por estos autores.<sup>30</sup> Estas diferencias podrían deberse al bajo número de muestras analizadas en ambos estudios, al hecho de que únicamente dos de nuestras QAs fueran adyacentes al CEC (frente a cinco de las QAs de Ashton y cols.) y a la distinta técnica empleada para detectar las alteraciones genómicas.

De manera adicional, estudiamos las SORIs compartidas por al menos 3 muestras, lo que permitió detectar una SORI compartida por siete de los CEC analizados, que correspondía a una delección de la banda p24.1 del cromosoma 3 que contiene únicamente 6 genes. Este hallazgo es consistente con estudios previos en los que se han detectado frecuentes delecciones y LOH en el brazo corto del cromosoma 3 en el CEC.<sup>29,33,188,189</sup> Más concretamente, Sikkink y cols. identificaron la región 3p24 como un área comúnmente delecionada en el CEC.<sup>190</sup>

Finalmente, comparamos las alteraciones identificadas en el transcriptoma y en el genoma de las distintas muestras (FPs, QAs y CECs). Al igual que en el único estudio anteriormente realizado comparando ambos análisis, observamos muy pocos casos en los que ambas alteraciones fueran concordantes y en los que las alteraciones a nivel de ADN se reflejaran en la expresión de los genes contenidos en dichas regiones.<sup>28</sup> Esta discordancia, junto a la previamente mencionada entre la expresión de ARNm y las mutaciones somáticas, apoyaría la importancia de otros mecanismos de regulación epigenética para el desarrollo del CEC.

Una de las pocas regiones genómicas alteradas con impacto en la expresión génica, identificada al comparar los CECs con las QAs, era la del gen NEK10. El gen NEK10 era uno de los genes que se encontraban dentro de la región delecionada 3p24.1 previamente mencionada. NEK10 es uno de los componentes de la familia de quinasas NEKs que hasta la fecha incluye once quinasas de serinas y treoninas, las cuales se han relacionado con la regulación del ciclo celular, incluyendo la respuesta al estrés genotóxico, la ciliogénesis y el cáncer.<sup>145</sup> Recientemente se ha demostrado que NEK10 podría ser una quinasa con especificidad dual, es decir, con capacidad de fosforilar tanto residuos de serinas y treoninas como de tirosina.<sup>191</sup> NEK10 se ha relacionado con el cáncer de mama en diversos estudios de asociación del genoma completo (GWAS) y de *arrays* de exomas, siendo uno de los dos genes que se sitúan en la subregión 3p24 que ha sido identificada como un nuevo locus con potencial de susceptibilidad al cáncer de mama.<sup>192,193</sup> Además, las mutaciones somáticas en el gen NEK10 se han relacionado con el cáncer de pulmón y melanoma.<sup>194,195</sup> NEK10 es considerada

actualmente como una quinasa candidata a presentar mutaciones somáticas con relevancia biológica en el cáncer.<sup>196</sup>

Mediante técnicas de inmunohistoquímica y *Western blot* pudimos comprobar que los cambios transcripcionales detectados en NEK10 se traducían a nivel proteico, ya que observamos la pérdida progresiva de la expresión de la proteína NEK10 desde PF y QA hasta CEC, tanto en muestras de tejidos como de líneas celulares. De manera similar a nuestros hallazgos, se ha detectado una disminución de la expresión de NEK10 por inmunohistoquímica en cáncer de próstata y en glioblastoma.<sup>197</sup>

Moniz y cols. demostraron que NEK10 participa en el mantenimiento del punto de control G2/M del ciclo celular en respuesta a la RUV en distintas líneas celulares, incluyendo los queratinocitos HEK293.<sup>146</sup> Esto lo haría a través de su actuación como un regulador positivo de la señal ERK1/2, mediante la formación de un complejo con raf-1 y MEK1, que a su vez daría lugar a la autoactivación de MEK1. Sin embargo, nuestros resultados parecen indicar que en las células HaCaT la activación de ERK1/2 no estaría implicada en la progresión del ciclo celular mediada por NEK10. Hemos observado que, en presencia de daño al ADN, las células con déficit de NEK10 presentan un aumento de los niveles de ciclina B1 y de la fase G2/M del ciclo celular. Estos efectos podrían estar mediados por ERLIN2, una proteína de unión a los microtúbulos que estabilizaría la ciclina B1 en la fase G2/M.<sup>147</sup> La ciclina B1 facilita el paso de las células de la fase G2 a la M del ciclo celular y su sobreexpresión puede contribuir a una proliferación celular incontrolada.<sup>198</sup> Se ha descrito una sobreexpresión de ciclina B1 en distintas neoplasias malignas: laríngeas, colorrectales, esofágicas, mamarias (en tumores

de alto grado, de mayor tamaño y con aumento del riesgo metastásico) y en CEs de cabeza y cuello (con mayor riesgo metastásico, recurrencias y resistencia a la radioterapia).<sup>199–204</sup> Por lo tanto, la pérdida de NEK10 a lo largo de la progresión del CEC podría actuar facilitando la proliferación y división de los queratinocitos a pesar de los daños en el ADN causados por la RUV, lo que parece indicar que NEK10 actuaría como un factor de protección de los queratinocitos frente a la RUV.

Por último, cabe destacar que, aunque todas las muestras analizadas de CEC presentaban una pérdida de la expresión de NEK10 por inmunohistoquímica, sólo detectamos la deleción de la región 3p24.1 en 7 de los 10 CECs analizados. Esto sugiere la participación de otros mecanismos tales como la metilación, las mutaciones somáticas o mecanismos post-traduccionales, que podrían actuar regulando la expresión de esta proteína. Por ejemplo, Porpora y cols. observaron que la baja expresión de NEK10 en tejidos de glioblastoma y cáncer de próstata iba ligada a una fuerte tinción en los mismos de la E3 ubiquitín ligasa CHIP. La ubiquitinación de NEK10 por CHIP resultaba en la degradación de NEK10 por proteólisis.<sup>197</sup>

Existen algunas limitaciones en nuestro primer estudio que deben ser mencionadas. En primer lugar, el bajo número de muestras apareadas de CEC, QA y PF analizadas mediante el *array* de expresión y de SNP puede haber sido insuficiente para detectar otras alteraciones que podrían haberse identificado utilizando una cohorte mayor de pacientes. Además, la mayoría de las biopsias de QAs no fueron obtenidas de la piel adyacente al CEC, lo que puede haber contribuido al bajo número de alteraciones cromosómicas compartidas entre las

QAs y CECs de un mismo paciente identificadas por el *array* de SNPs. En segundo lugar, en el análisis de los datos generados por el *array* de expresión, al valorar los resultados, no utilizamos la tasa de descubrimientos falsos (*false discovery rate* [FDR]). Esto es debido a que se consideró que dicha tasa era demasiado restrictiva y, dado que los resultados iban a ser validados posteriormente con otras técnicas, se optó por una *p* estricta de 0.01, en vez de la habitual en este tipo de análisis (<0.05). En tercer lugar, como ya se ha mencionado previamente, uno de los problemas de los *arrays* de expresión es la falta de concordancia entre los resultados obtenidos por los distintos estudios. Sin embargo, nuestros resultados coincidían en líneas generales con trabajos previos y fueron validados en muestras independientes de PF, QA y CEC. Por último, no realizamos validación de los resultados del *microarray* de SNP mediante técnicas de FISH ni de qPCR, por lo que los resultados de este deben interpretarse con cautela. Sin embargo, debemos destacar que se llevaron a cabo estudios utilizando distintas técnicas (inmunohistoquímica, *Western blot*) en muestras independientes que confirmaron los hallazgos en los genes seleccionados.

En nuestro segundo trabajo, nos centramos en el estudio de la siguiente etapa de la carcinogénesis del CEC: el CEC invasivo y metastásico. Analizamos la expresión de PD-L1 y CD8 mediante técnicas inmunohistoquímicas en una serie de 99 CECs primarios, con y sin diseminación metastásica (n=48 y n=51, respectivamente), y en las metástasis correspondientes de algunos de los primeros (n=24). Los resultados de este estudio han sido publicados en el artículo 2 adjuntado en la sección de anexos del manuscrito de esta tesis doctoral.

PD-L1, también conocido como CD274 y B7-H1, es una proteína transmembrana habitualmente presente en la superficie de las células presentadoras de antígeno, tales como linfocitos T y B, células dendríticas, macrófagos o células madre mesenquimales, así como en algunos tipos de células tumorales.<sup>95,205</sup> El receptor al que se une específicamente se denomina PD-1 y está presente en la superficie de los linfocitos T y B y de las células mieloides.<sup>205</sup> La unión de PD-L1 con PD1 da lugar a una potente señal inhibitoria que reduce la respuesta inmunológica antitumoral a través de la depleción de las células T CD8+ efectoras, favoreciendo que las células tumorales escapen de la inmunovigilancia.<sup>95</sup>

La expresión de PD-L1 por las propias células tumorales o las células del sistema inmune que infiltran el tumor se ha detectado en múltiples neoplasias malignas, indicando un posible rol del eje PD-1/PD-L1 como marcador pronóstico y como diana terapéutica.<sup>96,206</sup> Se ha observado la expresión de PD-L1 en distintos tumores sólidos como el cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma, CE de cabeza y cuello, cáncer colorrectal, cáncer de ovario o cáncer de vejiga, entre otros.<sup>96,207-210</sup> Esta amplia expresión de PD-L1 explicaría que el bloqueo del eje PD-1/PD-L1 mediante anticuerpos monoclonales dirigidos frente PD-1 o PD-L1 haya demostrado una respuesta clínica significativa en una gran variedad de neoplasias malignas.<sup>95</sup> Por lo tanto, el estudio de la expresión de PD-L1 por las células tumorales puede cumplir dos objetivos, por un lado, como marcador de respuesta a los fármacos anti-PD1/PD-L1 y, por otro, como biomarcador pronóstico.

Los tumores que habitualmente responden a la terapia con anti-PD1/PD-L1 suelen presentar una expresión de PD-L1 (determinada por inmunohistoquímica)

aumentada.<sup>211</sup> Sin embargo, existe una correlación poco homogénea entre los niveles de expresión de PD-L1 y la respuesta clínica a los anticuerpos anti-PD1/PD-L1. Por un lado, se ha asociado una expresión de PD-L1 elevada con una respuesta favorable en el melanoma, el cáncer de pulmón no escamoso y los CEs de cabeza y cuello.<sup>212,213</sup> Sin embargo, en otras neoplasias malignas como el carcinoma renal o el cáncer de pulmón de células escamosas, la respuesta de los pacientes al tratamiento ant-PD1/PD-L1 no difiere de manera significativa en función de la expresión de PD-L1.<sup>212</sup> Incluso en los tumores en los que existe una buena correlación, se ha visto que algunos de los pacientes con expresión negativa para PD-L1 también responden al tratamiento.<sup>212,213</sup> Este fenómeno podría explicarse, al menos en parte, a un resultado falsamente negativo en relación a la toma de muestras o a errores técnicos, así como a dificultades propias de la tinción inmunohistoquímica para PD-L1.<sup>212,214</sup> En la actualidad, se están realizando varios ensayos clínicos valorando el uso de distintos inhibidores de PD-1/PD-L1 en CECs y se han publicado casos aislados en los que se ha evidenciado su eficacia. Sin embargo, el único fármaco anti-PD-1 aprobado hasta el momento por la EMA y FDA en el CEC es el cemiplimab.<sup>97,114–129,215</sup> Sólo se han publicado los resultados de un único ensayo clínico evaluando la expresión de PD-L1 por las células tumorales como predictor de la respuesta clínica al tratamiento con cemiplimab.<sup>215</sup> En este ensayo abierto pivotal fase 2 en pacientes con CEC localmente avanzado se valoró la asociación entre la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en células del CEC, y la carga mutacional, con la eficacia clínica del cemiplimab. A pesar de que se observó un porcentaje superior de respuesta en aquellos pacientes con tumores con una expresión de PD-L1 > 1% de las células, también se objetivó respuesta en pacientes con porcentajes inferiores, por lo que los autores concluyeron que la

expresión inmunohistoquímica de PDL1-, al menos por sí sola, no era un buen biomarcador para determinar la respuesta al tratamiento. Como limitaciones cabe destacar que, de los 78 pacientes incluidos en el estudio, únicamente se pudo estudiar la expresión basal de PD-L1 en 48 pacientes y que esta fue valorada a partir de biopsias parciales.

Existe una cierta controversia con respecto a la utilidad de la expresión de PD-L1 como marcador del pronóstico. En general su expresión se ha relacionado con mal pronóstico en múltiples neoplasias como el adenocarcinoma gástrico, pancreático, carcinoma urotelial o carcinoma hepatocelular.<sup>216-220</sup> Sin embargo, en algunos tumores, como en el carcinoma de células de Merkel o en el cáncer de mama, su expresión se ha asociado con un buen pronóstico.<sup>221-223</sup> En determinadas neoplasias como el cáncer de pulmón o el melanoma, su expresión puede poseer tanto un valor predictivo positivo como negativo.<sup>96,220</sup> En algunos casos, (timoma y carcinoma de timo, cáncer cervical o CE de pulmón) la expresión de PD-L1 por sí sola no tiene valor pronóstico y debe combinarse con otros marcadores tales como la proporción de células CD8/Foxp3+.<sup>96</sup>

Distintos estudios han valorado la expresión de PD-L1 en el CEC,<sup>97-104,141,224,225</sup> aunque únicamente tres de ellos incluían un número significativo de casos metastásicos<sup>101,102</sup> y/o de metástasis.<sup>103</sup> Los resultados obtenidos con respecto al valor pronóstico de la expresión de PD-L1 por las células tumorales son contradictorios. En nuestro estudio encontramos una asociación entre dicha expresión ( $\geq 1\%$  células positivas) con distintos parámetros clínico-patológicos de alto riesgo (mayor tamaño tumoral y profundidad) y con un riesgo elevado de

metástasis linfáticas. En consonancia con nuestros hallazgos, Slater y cols. también observaron que los CECs con características clínico-patológicas de alto riesgo metastásico presentaban una mayor expresión de PD-L1.<sup>100</sup> Cabe destacar que, tanto el clon de anticuerpo anti-PD-L1 (SP-142) como el punto de corte utilizados ( $\geq 1\%$ ) para valorar la expresión de PD-L1, fueron los mismos que en nuestro trabajo. Siguiendo un enfoque similar, García-Pedrero y cols. estudiaron 50 CECs de cabeza y cuello con metástasis ganglionares y 50 CECs sin metástasis, detectando asimismo una asociación entre la expresión de PD-L1 y la presencia de metástasis linfáticas y también con algunos hallazgos clínico-patológicos asociados a mayor riesgo metastásico, aunque la asociación con parámetros tales como la desmoplasia, la mala diferenciación de las células tumorales y el *budding* no coincidían con los observados en nuestro estudio. Al contrario que en nuestro trabajo, dichos autores utilizaron *microarrays* de tejido tumoral, un clon de anticuerpo anti-PD-L1 distinto (E1L3N) y establecieron el punto de corte óptimo en una expresión de PD-L1 en un porcentaje de células  $\geq 25\%$ . Sin embargo, utilizando el mismo anticuerpo que García-Pedrero y cols., Schaper y cols. y Kamiya y cols. no encontraron asociación entre la proporción de células tumorales que expresaban PD-L1 y el riesgo metastásico, aunque detectaron una asociación entre la alta intensidad de la expresión de PD-L1 y el riesgo de metástasis.<sup>98,104</sup> No obstante, los resultados de ambos estudios estarían seriamente limitados por el bajo número de casos de CEC metastásicos incluidos.

En contraste con las publicaciones previas, Roper y cols. analizaron la expresión de PD-L1 en un número elevado de CECs con metástasis ganglionares y sin metástasis (n=39 y n= 35, respectivamente), y observaron que los pacientes con

CECs primarios con expresión de PD-L1 en  $\geq 5\%$  de células tumorales presentaban una mayor supervivencia libre de enfermedad.<sup>101</sup> Al igual que en los casos anteriores, el anticuerpo anti-PD-L1 utilizado (SP263) fue distinto al nuestro y cabe destacar que al valorar la relación entre la expresión de PD-L1 y las variables clínico-patológicas no se informó previamente de la cantidad de casos presentes para cada variable (en total ni separados entre el grupo control y el metastásico), lo que dificulta, una vez más, la interpretación de los resultados.

Respecto a las células inflamatorias del microambiente tumoral, es conocido que los linfocitos T asociados al tumor juegan un papel en la respuesta inmune frente al tumor y participan en la destrucción de células malignas.<sup>226</sup> Debido a esta actividad antitumoral, los linfocitos T CD8+ peritumorales se han asociado con buen pronóstico en distintas neoplasias malignas, como en el CE de cabeza y cuello, el cáncer de colon, el cáncer de mama, el carcinoma de células de Merkel y el melanoma.<sup>227-232</sup> Sin embargo, tanto las células tumorales como las del estroma pueden inhibir la acción de los linfocitos favoreciendo su paso a linfocitos T reguladores a través de la producción de diversas citocinas y quimiocinas.<sup>226</sup> Asimismo, en modelos animales, se ha demostrado que en el CE, los linfocitos T CD8+ pueden presentar signos de activación crónica y agotamiento, lo que daría lugar a una pérdida de su capacidad citotóxica.<sup>233</sup> Además, las propias células T activadas pueden contribuir a la inhibición de la respuesta inmune frente al tumor a través del aumento de la expresión de PD-L1 en las células neoplásicas y en las células mieloides reguladoras.<sup>226,233,234</sup> Esto podría explicar la correlación existente entre la expresión de PD-L1 y la presencia de linfocitos infiltrantes tumorales y CD8+ en múltiples tumores sólidos, incluidos el CE oral, el carcinoma pulmonar de

células no pequeñas, el cáncer de mama, el melanoma y el CEC.<sup>100,101,235–239</sup> En algunos tumores, como el melanoma, la expresión aumentada de PD-L1 podría reflejar una respuesta adaptativa inducida por la producción de interferón gamma por los linfocitos T CD8+ que infiltran el tumor.<sup>214,240,241</sup> Cabe destacar que, además de esta expresión inducida de PD-L1, también se ha descrito una expresión constitutiva de esta molécula que se ha relacionado con mecanismos genéticos a través de la desregulación de múltiples vías oncogénicas, pudiendo algunos tumores presentar ambos tipos de regulación de la expresión de PD-L1.<sup>214</sup> Por lo tanto, mientras que en algunos casos la expresión de PD-L1 por las células tumorales junto con el infiltrado inflamatorio y/o los linfocitos CD8+ podría ser un reflejo de la respuesta inmune antitumoral, en otros podría corresponder a un mecanismo de evasión tumoral de la respuesta inmune.<sup>238,241</sup> Debido a la expresión inducida de PD-L1 en la mayoría de tumores, se ha propuesto que para predecir la posible respuesta al tratamiento con fármacos anti-PD1/PD-L1, debería correlacionarse la expresión de PD-L1 con la intensidad del infiltrado de linfocitos T acompañantes.<sup>214</sup> De la misma manera, la expresión de PD-L1 en el CEC debería interpretarse con cautela en ausencia de una valoración simultánea de los linfocitos infiltrantes tumorales y/o CD8+. Sin embargo, en nuestra serie no encontramos correlación entre la presencia de linfocitos CD8+ y los tumores PD-L1 positivos ni tampoco con la cantidad del infiltrado inflamatorio. Sólo en uno de los estudios previos realizados en CEC valorando simultáneamente PD-L1 y CD8+ se incluyeron algunos casos de CEC metastásico, detectándose una correlación entre la expresión de PD-L1 y CD8+, pero no entre PD-L1 y un mayor riesgo de metástasis.<sup>98</sup> Podría postularse que la sobreexpresión de PD-L1 por las células del CEC en ausencia de un infiltrado de células CD8+ significativo podría traducirse en

un mayor riesgo metastásico, mientras que cuando esta expresión va asociada a un aumento de TILs o CD8 peritumorales podría relacionarse con un mejor pronóstico.

Aunque existen datos limitados con respecto al valor pronóstico de la expresión de PD-L1 por las células inflamatorias, dicha expresión se ha asociado con buen pronóstico en algunos tumores sólidos.<sup>238,242-245</sup> Una posible explicación para este hecho sería que la expresión de PD-L1 por las células inflamatorias tumorales obedecería a mecanismos adaptativos tales como un ataque inmunológico mediado por inflamación exógena y sería, por lo tanto, un reflejo de la inmunidad pre-existente.<sup>245</sup> Además, la expresión de PD-L1 por las células inflamatorias también puede ser indicativa de una mayor respuesta a la terapia anti-PD1/PD-L1 en algunas neoplasias malignas.<sup>246</sup> En el CEC algunos estudios han relacionado su expresión con buen pronóstico,<sup>101</sup> mientras que otros no han detectado ninguna relación con factores pronósticos o de riesgo metastásico.<sup>103,104</sup> En nuestro trabajo tampoco encontramos una asociación de la expresión de PD-L1 por las células del infiltrado inflamatorio con el riesgo metastásico ni con ninguna de las variables clínico-patológicas estudiadas.

Por último, algunos trabajos han estudiado la expresión de PD-L1 en metástasis linfáticas de CEC,<sup>98,100,101,103,104</sup> aunque sólo un estudio incluía un número significativo de metástasis correspondientes a los CEC primarios previamente estudiados.<sup>101</sup> En nuestra serie, la mayoría (90%) de los casos analizados mostraron una buena concordancia de la expresión de PD-L1, positiva o negativa, entre los CECs primarios y sus respectivas metástasis, lo que coincide con estudios

previos.<sup>98,101</sup> Sin embargo, cabe destacar que en un 21% de los casos detectamos una tendencia no significativa hacia una mayor expresión de PD-L1 en las metástasis. Con un enfoque similar Roper y cols. detectaron una mayor proporción de CECs primarios y sus metástasis con expresión discordante de PD-L1 (38% frente al 10% de nuestra serie), donde el 61% del total de casos discordantes se debían a la positivización de la expresión de PD-L1 en las metástasis.<sup>101</sup> Asimismo, cuando se han estudiado CECs primarios y metástasis pertenecientes a distintos pacientes, también se ha observado una mayor expresión de esta molécula en las metástasis.<sup>100,247</sup> Esta discordancia y tendencia hacia una mayor expresión de PD-L1 en las metástasis podría ser el reflejo de una selección clonal de células PD-L1+ en el tumor primario. Al igual que en el CEC, el estudio de PD-L1 en distintos tumores malignos también ha mostrado diferencias en la expresión de esta molécula entre las metástasis y el tumor primario.<sup>248-253</sup> Estas observaciones parecen relevantes en cuanto a la posible respuesta a los fármacos anti-PD1/PD-L1 de los CEC metastásicos utilizando PD-L1 como biomarcador, sugiriendo que parece razonable estudiar tanto el tumor primario como sus correspondientes metástasis.

La heterogeneidad de los resultados de los distintos estudios con respecto a la expresión inmunohistoquímica de PD-L1 en el CEC puede obedecer a distintos factores: En primer lugar, no existe una técnica inmunohistoquímica estandarizada, habiéndose utilizado distintos clones de anticuerpos y diferentes métodos de cuantificación y puntos de corte. Disponemos de una gran variedad de clones de anticuerpos anti-PD-L1 sin que, en contraste con otros tumores como el cáncer de pulmón o mama, existan en el CEC estudios comparativos entre los mismos.<sup>254,255</sup>

En nuestra serie, de forma similar a un estudio previo en CEC con el mismo clon de anticuerpo, se valoró como punto de corte  $\geq 1\%$ .<sup>100</sup> En segundo lugar, la expresión de PD-L1 puede ser variable en relación a una activación y sobreexpresión temporal, tanto en el tumor primario como en las células inflamatorias del microambiente.<sup>96</sup> Asimismo, tratamientos previos como la quimioterapia o la radioterapia también pueden alterar su expresión.<sup>96</sup> En tercer lugar, PD-L1 puede presentar una expresión difusa o focal en los distintos tumores, siendo su expresión en el CEC habitualmente heterogénea, por lo que su valoración en biopsias parciales o de pequeño tamaño puede no ser representativa.<sup>96,100,102</sup> Finalmente, se ha descrito la expresión de PD-L1 tanto intracelular como de membrana, aunque es esta última la que parece tener mayor significación biológica y la que se ha evaluado en la mayoría de las publicaciones.<sup>256</sup>

Este segundo estudio presenta algunas limitaciones que deben mencionarse. En primer lugar, cabe destacar su naturaleza retrospectiva, lo que puede dar lugar a potenciales sesgos. En segundo lugar, todas las muestras pertenecían a pacientes de hospitales universitarios de tercer nivel, siendo habitual que dichos pacientes presenten tumores avanzados, de peor pronóstico, más agresivos y con múltiples tratamientos previos, lo que podría explicar el alto porcentaje de tumores recurrentes de nuestra serie de CECMs. En tercer lugar, en nuestro trabajo no diferenciamos entre zonas fotoexpuestas y no fotoexpuestas, aunque la gran mayoría de tumores (83,8%) provenían de la cabeza y cuello, una zona habitualmente fotoexpuesta. Una mayor fotoexposición se ha relacionado con una mayor expresión de PD-L1 por las células del infiltrado inflamatorio.<sup>100</sup> Sin embargo, en nuestro estudio no detectamos diferencias en la expresión de PD-L1 por las

células inflamatorias ni tumorales en función de la localización de las muestras. Finalmente, nuestro trabajo no incluyó un segundo grupo de muestras para validar los resultados obtenidos, así como las hipótesis formuladas.

## 7. Conclusiones

---



7.1. Las similitudes el perfil de expresión génica entre CECs y QAs, así como la presencia de alteraciones citogenéticas compartidas, apoyan el papel de las QAs como lesiones precursoras del CEC.

7.2. El gen FOSL1 podría tener un papel como oncogén dentro del desarrollo del CEC, en el que podría actuar aumentando su capacidad invasiva. El gen BNC1 podría tener una función biológica relevante para la progresión a CEC de las lesiones premalignas, aunque desconocemos el papel exacto que ejercería a nivel celular.

7.3. La pérdida progresiva de la expresión de NEK10 a lo largo de las distintas etapas de la carcinogénesis del CEC, cuyo gen se localiza en la región 3p24.1 frecuentemente delecionada, sugiere un posible papel relevante de esta quinasa en la protección frente al desarrollo tumoral.

7.4. La molécula PD-L1 podría ser un factor importante dentro de la progresión del CEC, favoreciendo el desarrollo de metástasis linfáticas.

7.5. PD-L1 podría ser un biomarcador pronóstico de CECs de alto riesgo metastásico. Sin embargo, este papel se ve limitado por la necesidad de correlacionar su expresión con la cantidad y características del infiltrado inflamatorio tumoral, y por la ausencia de una tinción y método de evaluación de inmunohistoquímica estandarizados.



## 8. Líneas de futuro

---



8.1. Práctica de estudios funcionales utilizando FOSL1 y BNC1 con el objetivo de elucidar su papel dentro de la carcinogénesis del CEC.

8.2. Realización de estudios adicionales con NEK10, incluyendo estudios funcionales, con el objetivo de conocer mejor su papel en la regulación del ciclo celular en los queratinocitos y en células tumorales de CEC.

8.3. Estudios comparativos entre los distintos clones de anticuerpos anti-PD-L1 como biomarcadores pronósticos y de respuesta clínica al tratamiento con inhibidores de PD1/PD-L1. Establecer un sistema de valoración y un punto de corte estandarizados.

8.4. Estudios adicionales que valoren la expresión de PD-L1 en las células del CEC juntamente con la expresión de éste y otros marcadores, como el CD8, en las células del infiltrado inflamatorio tumoral, con el objetivo de definir las consecuencias de este en el papel de PD-L1 como biomarcador tanto pronóstico como de respuesta al tratamiento con fármacos anti-PD1/PD-L1.



## 9. Bibliografía

---



1. Green AC, Olsen CM. Cutaneous squamous cell carcinoma: an epidemiological review. *Br J Dermatol.* 2017 Aug;177(2):373–81.
2. Que SKT, Zwald FO, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2018 Feb;78(2):249–61.
3. Brewster DH, Bhatti LA, Inglis JHC, Nairn ER, Doherty VR. Recent trends in incidence of nonmelanoma skin cancers in the East of Scotland, 1992–2003. *Br J Dermatol.* 2007 Jun;156(6):1295–300.
4. Andersson EM, Paoli J, Wastensson G. Incidence of cutaneous squamous cell carcinoma in coastal and inland areas of Western Sweden. *Cancer Epidemiol.* 2011 Dec;35(6):e69-74.
5. Katalinic A, Kunze U, Schäfer T. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br J Dermatol.* 2003 Dec;149(6):1200–6.
6. Tejera-Vaquerizo A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, Posada-García C, Rodríguez-Pazos L, Pastushenko I, et al. Skin Cancer Incidence and Mortality in Spain: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Actas Dermosifiliogr.* 2016 May;107(4):318–28.
7. Martorell-Calatayud A, Sanmartín Jimenez O, Cruz Mojarrieta J, Guillén Barona C. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Defining the High-Risk Variant. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Ed.)* 2013 Jun;104(5):367–79.
8. Boyers LN, Karimkhani C, Naghavi M, Sherwood D, Margolis DJ, Hay RJ, et

- al. Global mortality from conditions with skin manifestations. *J Am Acad Dermatol*. 2014 Dec;71(6):1137-1143.e17.
9. Alam M, Armstrong A, Baum C, Bordeaux JS, Brown M, Busam KJ, et al. Guidelines of care for the management of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2018 Mar 1;78(3):560–78.
  10. Alam M, Ratner D. Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2001 Mar 29;344(13):975–83.
  11. Karia PS, Han J, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012. *J Am Acad Dermatol*. 2013;68(6):957–66.
  12. 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.
  13. Ratushny V, Gober MD, Hick R, Ridky TW, Seykora JT. From keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Invest*. 2012;122(2):464–72.
  14. Durinck S, Ho C, Wang NJ, Liao W, Jakkula LR, Collisson EA, et al. Temporal dissection of tumorigenesis in primary cancers. *Cancer Discov*. 2011;1(2):137–43.
  15. Wikonkal NM, Brash DE. Ultraviolet radiation induced signature mutations in photocarcinogenesis. *J Investig dermatology Symp Proc*. 1999 Sep;4(1):6–10.

16. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci*. 1991 Nov 15;88(22):10124–8.
17. Jonason AS, Kunala S, Price GJ, Restifo RJ, Spinelli HM, Persing JA, et al. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(24):14025–9.
18. Haider AS, Peters SB, Kaporis H, Cardinale I, Fei J, Ott J, et al. Genomic analysis defines a cancer-specific gene expression signature for human squamous cell carcinoma and distinguishes malignant hyperproliferation from benign hyperplasia. *J Invest Dermatol*. 2006 Apr;126(4):869–81.
19. Li YY, Hanna GJ, Laga AC, Haddad RI, Lorch JH, Hammerman PS. Genomic Analysis of Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2015 Mar 15;21(6):1447–56.
20. Pickering CR, Zhou JH, Lee JJ, Drummond JA, Peng SA, Saade RE, et al. Mutational Landscape of Aggressive Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014 Dec 15;20(24):6582–92.
21. Martincorena I, Roshan A, Gerstung M, Ellis P, Van Loo P, McLaren S, et al. Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* (80- ). 2015;348(6237):880–6.
22. South AP, Purdie KJ, Watt SA, Haldenby S, den Breems NY, Dimon M, et al. NOTCH1 mutations occur early during cutaneous squamous cell carcinogenesis. *J Invest Dermatol*. 2014;134(10):2630–8.

23. Spencer JM, Kahn SM, Jiang W, DeLeo VA, Weinstein IB. Activated ras genes occur in human actinic keratoses, premalignant precursors to squamous cell carcinomas. *Arch Dermatol.* 1995 Jul;131(7):796–800.
24. South AP, Purdie KJ, Watt SA, Haldenby S, den Breems NY, Dimon M, et al. NOTCH1 mutations occur early during cutaneous squamous cell carcinogenesis. *J Invest Dermatol.* 2014 Jan 1;134(10):2630–8.
25. Inman GJ, Wang J, Nagano A, Alexandrov LB, Purdie KJ, Taylor RG, et al. The genomic landscape of cutaneous SCC reveals drivers and a novel azathioprine associated mutational signature. *Nat Commun.* 2018 Dec 1;9(1).
26. Al-Rohil RN, Tarasen AJ, Carlson JA, Wang K, Johnson A, Yelensky R, et al. Evaluation of 122 advanced-stage cutaneous squamous cell carcinomas by comprehensive genomic profiling opens the door for new routes to targeted therapies. *Cancer.* 2016 Jan 15;122(2):249–57.
27. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: Cross-talk and compensation. Vol. 36, *Trends in Biochemical Sciences.* Trends Biochem Sci; 2011. p. 320–8.
28. Hameetman L, Commandeur S, Bavinck JN, Wisgerhof HC, de Gruijl FR, Willemze R, et al. Molecular profiling of cutaneous squamous cell carcinomas and actinic keratoses from organ transplant recipients. *BMC Cancer.* 2013;13(58):1471–2407.
29. Ashton KJ, Weinstein SR, Maguire DJ, Griffiths LR. Chromosomal aberrations in squamous cell carcinoma and solar keratoses revealed by

- comparative genomic hybridization. *Arch Dermatol.* 2003;139(7):876–82.
30. Ashton KJ, Carless MA, Griffiths LR. Cytogenetic alterations in nonmelanoma skin cancer: A review. Vol. 43, *Genes Chromosomes and Cancer.* 2005. p. 239–48.
  31. Rehman I, Takata M, Wu YY, Rees JL. Genetic change in actinic keratoses. *Oncogene.* 1996 Jun 20;12(12):2483–90.
  32. Rehman I, Quinn AG, Takata M, Taylor AE, Rees JL. Low frequency of allelic loss in skin tumours from immunosuppressed individuals. *Br J Cancer.* 1997;76(6):757–9.
  33. Purdie KJ, Lambert SR, Teh MT, Chaplin T, Molloy G, Raghavan M, et al. Allelic imbalances and microdeletions affecting the PTPRD gene in cutaneous squamous cell carcinomas detected using single nucleotide polymorphism microarray analysis. *Genes Chromosom Cancer.* 2007;46(7):661–9.
  34. Quinn AG, Sikkink S, Rees JL. Basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin show distinct patterns of chromosome loss. *Cancer Res.* 1994;54(17):4756–9.
  35. Mortier L, Marchetti P, Delaporte E, De Lassalle EM, Thomas P, Piette F, et al. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16 INK4a tumor suppressor. *Cancer Lett.* 2002 Feb 25;176(2):205–14.
  36. Padilla RS, Sebastian S, Jiang Z, Nindl I, Larson R. Gene expression

- patterns of normal human skin, actinic keratosis, and squamous cell carcinoma: a spectrum of disease progression. *Arch Dermatol.* 2010;146(3):288–93.
37. Lambert SR, Mladkova N, Gulati A, Hamoudi R, Purdie K, Cerio R, et al. Key differences identified between actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma by transcriptome profiling. *Br J Cancer.* 2014;110(2):520–9.
  38. Van Haren R, Feldman D, Sinha AA. Systematic comparison of nonmelanoma skin cancer microarray datasets reveals lack of consensus genes. *Br J Dermatol.* 2009;161(6):1278–87.
  39. Ashford BG, Clark J, Gupta R, Iyer NG, Yu B, Ranson M. Reviewing the genetic alterations in high-risk cutaneous squamous cell carcinoma: A search for prognostic markers and therapeutic targets. Vol. 39, *Head and Neck.* 2017.
  40. Darr OA, Colacino JA, Tang AL, McHugh JB, Bellile EL, Bradford CR, et al. Epigenetic alterations in metastatic cutaneous carcinoma. *Head Neck.* 2015 Jul;37(7):994–1001.
  41. Yilmaz AS, Ozer HG, Gillespie JL, Allain DC, Bernhardt MN, Furlan KC, et al. Differential mutation frequencies in metastatic cutaneous squamous cell carcinomas versus primary tumors. *Cancer.* 2017 Apr 1;123(7):1184–93.
  42. Lambert SR, Harwood CA, Purdie KJ, Gulati A, Matin RN, Romanowska M, et al. Metastatic cutaneous squamous cell carcinoma shows frequent deletion in the protein tyrosine phosphatase receptor Type D gene. *Int J Cancer.* 2012 Aug 1;131(3):E216–26.

43. Nissinen L, Farshchian M, Riihilä P, Kähäri VM. New perspectives on role of tumor microenvironment in progression of cutaneous squamous cell carcinoma. Vol. 365, *Cell and Tissue Research*. Springer Verlag; 2016. p. 691–702.
44. de Vries E, Trakatelli M, Kalabalikis D, Ferrandiz L, Ruiz-de-Casas A, Moreno-Ramirez D, et al. Known and potential new risk factors for skin cancer in European populations: a multicentre case-control study. *Br J Dermatol*. 2012;2:1–13.
45. Stratigos A, Garbe C, Lebbe C, Malveyh J, del Marmol V, Pehamberger H, et al. Diagnosis and treatment of invasive squamous cell carcinoma of the skin: European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer*. 2015 Sep;51(14):1989–2007.
46. Brewer JD, Shanafelt TD, Khezri F, Sosa Seda IM, Zubair AS, Baum CL, et al. Increased incidence and recurrence rates of nonmelanoma skin cancer in patients with non-Hodgkin lymphoma: a Rochester Epidemiology Project population-based study in Minnesota. *J Am Acad Dermatol*. 2015 Feb;72(2):302–9.
47. Mehrany K, Weenig RH, Lee KK, Pittelkow MR, Otley CC. Increased metastasis and mortality from cutaneous squamous cell carcinoma in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Am Acad Dermatol*. 2005 Dec;53(6):1067–71.
48. Zhao H, Shu G, Wang S. The risk of non-melanoma skin cancer in HIV-infected patients: new data and meta-analysis. *Int J STD AIDS*. 2016 Jun

- 20;27(7):568–75.
49. Berg D, Otley CC. Skin cancer in organ transplant recipients: Epidemiology, pathogenesis, and management. *J Am Acad Dermatol.* 2002 Jul;47(1):1–17; quiz 18–20.
  50. Sahovaler A, Krishnan RJ, Yeh DH, Zhou Q, Palma D, Fung K, et al. Outcomes of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in the Head and Neck Region With Regional Lymph Node Metastasis: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2019 Mar 7;145(4):352.
  51. Eigentler TK, Leiter U, Häfner HM, Garbe C, Röcken M, Breuninger H. Survival of Patients with Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Results of a Prospective Cohort Study. *J Invest Dermatol.* 2017;137(11).
  52. Nindl I, Gottschling M, Stockfleth E. Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: basic virology and clinical manifestations. *Dis Markers.* 2007;23(4):247–59.
  53. Riddel C, Rashid R, Thomas V. Ungual and periungual human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma: a review. *J Am Acad Dermatol.* 2011 Jun;64(6):1147–53.
  54. McLaughlin-Drubin ME. Human Papillomaviruses and Non-melanoma Skin Cancer. *Semin Oncol.* 2015 Apr;42(2):284–90.
  55. Viarisio D, Gissmann L, Tommasino M. Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models. *Curr Opin Virol.* 2017 Oct;26:56–62.

56. Rollison DE, Viarasio D, Amorrortu RP, Gheit T, Tommasino M. An Emerging Issue in Oncogenic Virology: the Role of Beta Human Papillomavirus Types in the Development of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. Sullivan CS, editor. *J Virol*. 2019 Jan 30;93(7).
57. Fine J-D, Johnson LB, Weiner M, Li K-P, Suchindran C. Epidermolysis bullosa and the risk of life-threatening cancers: The National EB Registry experience, 1986-2006. *J Am Acad Dermatol*. 2009 Feb;60(2):203–11.
58. Peng L, Wang Y, Hong Y, Ye X, Shi P, Zhang J, et al. Incidence and relative risk of cutaneous squamous cell carcinoma with single-agent BRAF inhibitor and dual BRAF/MEK inhibitors in cancer patients: a meta-analysis. *Oncotarget*. 2017 Oct 10;8(47):83280–91.
59. Fabiano A, Calzavara-Pinton P, Monari P, Moggio E, Pellacani G, Manganoni AM, et al. Eruptive squamous cell carcinomas with keratoacanthoma-like features in a patient treated with ruxolitinib. *Br J Dermatol*. 2015 Oct;173(4):1098–9.
60. Aggressive Skin Cancers Occurring in Patients Treated With the Janus Kinase Inhibitor Ruxolitinib - PubMed [Internet]. [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28628689/?from\\_single\\_result=Aggressive+skin+cancers+occurring+in+patients+treated+with+the+Janus+Kinase+inhibitor+Ruxolitinib](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28628689/?from_single_result=Aggressive+skin+cancers+occurring+in+patients+treated+with+the+Janus+Kinase+inhibitor+Ruxolitinib).
61. Smith KJ, Skelton HG. Rapid onset of cutaneous squamous cell carcinoma in patients with rheumatoid arthritis after starting tumor necrosis factor  $\alpha$  receptor IgG1-Fc fusion complex therapy. *J Am Acad Dermatol*.

- 2001;45(6):953–6.
62. Ly L, Czarnecki D. The rapid onset of multiple squamous cell carcinomas during etanercept treatment for psoriasis [22]. Vol. 157, *British Journal of Dermatology*. Br J Dermatol; 2007. p. 1076–8.
  63. Siegel JA, Korgavkar K, Weinstock MA. Current perspective on actinic keratosis: a review. Vol. 177, *British Journal of Dermatology*. Blackwell Publishing Ltd; 2017. p. 350–8.
  64. Röwert-Huber J, Patel MJ, Forschner T, Ulrich C, Eberle J, Kerl H, et al. Actinic keratosis is an early in situ squamous cell carcinoma: a proposal for reclassification. Br J Dermatol. 2007 May;156 Suppl 3(s3):8–12.
  65. Guenther ST, Hurwitz RM, Buckel LJ, Gray HR. Cutaneous squamous cell carcinomas consistently show histologic evidence of in situ changes: a clinicopathologic correlation. J Am Acad Dermatol. 1999 Sep;41(3 Pt 1):443–8.
  66. Cockerell CJ. Histopathology of incipient intraepidermal squamous cell carcinoma ('actinic keratosis'). In: *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2000.
  67. Motaparthy K, Kapil JP, Velazquez EF. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Review of the Eighth Edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Guidelines, Prognostic Factors, and Histopathologic Variants. Adv Anat Pathol. 2017 Jul;24(4):171–94.
  68. Breuninger H, Eigentler T, Bootz F, Hauschild A, Kortmann R-D, Wolff K, et

- al. Brief S2k guidelines - Cutaneous squamous cell carcinoma. *JDDG J der Dtsch Dermatologischen Gesellschaft*. 2013 Jun;11(s3):37–45.
69. Navarrete-Dechent C, Veness MJ, Droppelmann N, Uribe P. High-risk cutaneous squamous cell carcinoma and the emerging role of sentinel lymph node biopsy: A literature review. Vol. 73, *Journal of the American Academy of Dermatology*. Mosby Inc.; 2015. p. 127–37.
70. Burton KA, Ashack KA, Khachemoune A. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: A Review of High-Risk and Metastatic Disease. Vol. 17, *American Journal of Clinical Dermatology*. Springer International Publishing; 2016. p. 491–508.
71. Edge SB, American Joint Committee on Cancer. *AJCC cancer staging manual*. Springer; 2010. 648 p.
72. Bichakjian CK et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology GuidelinesVR, (NCCN National, ) Squamous Cell Skin Cancer 2.2019. Comprehensive Cancer Network, Inc.; 2018. Available at NCCN.org. Accessed may, 2019.
73. Thompson AK, Kelley BF, Prokop LJ, Murad MH, Baum CL. Risk Factors for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Recurrence, Metastasis, and Disease-Specific Death. *JAMA Dermatology*. 2016 Apr 1;152(4):419.
74. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. *J Am Acad Dermatol*. 1992 Jun;26(6):976–90.

75. Brantsch KD, Meisner C, Schonfisch B, Trilling B, Wehner-Caroli J, Rocken M, et al. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol.* 2008;9(8):713–20.
76. Tejera-Vaquerizo A, García-Doval I, Llombart B, Cañueto J, Martorell-Calatayud A, Descalzo-Gallego MA, et al. Systematic review of the prevalence of nodal metastases and the prognostic utility of sentinel lymph node biopsy in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Dermatol.* 2018 Jul;45(7):781–90.
77. Brougham NDLS, Dennett ER, Cameron R, Tan ST. The incidence of metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma and the impact of its risk factors. *J Surg Oncol.* 2012 Dec 1;106(7):811–5.
78. Krediet JTT, Beyer M, Lenz K, Ulrich C, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, et al. Sentinel lymph node biopsy and risk factors for predicting metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2015 Apr 1;172(4):1029–36.
79. Clayman GL, Lee JJ, Holsinger FC, Zhou X, Duvic M, El-Naggar AK, et al. Mortality Risk From Squamous Cell Skin Cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Feb 1;23(4):759–65.
80. Schmults CD, Karia PS, Carter JB, Han J, Qureshi AA. Factors Predictive of Recurrence and Death From Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Dermatology.* 2013 May 1;149(5):541.
81. Cherpelis BS, Marcusen C, Lang PG. Prognostic Factors for Metastasis in

- Squamous Cell Carcinoma of the Skin. *Dermatologic Surg.* 2002 Mar 1;28(3):268–73.
82. Campoli M, Brodland DG, Zitelli J. A prospective evaluation of the clinical, histologic, and therapeutic variables associated with incidental perineural invasion in cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2014 Apr;70(4):630–6.
83. Amin MB, Edge SB, American Joint Committee on Cancer. *AJCC cancer staging manual.* 2017th ed. 1024 p.
84. Karia PS, Jambusaria-Pahlajani A, Harrington DP, Murphy GF, Qureshi AA, Schmults CD. Evaluation of American Joint Committee on Cancer, International Union Against Cancer, and Brigham and Women’s Hospital tumor staging for cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2014 Feb 1;32(4):327–34.
85. Moore BA, Weber RS, Prieto V, El-Naggar A, Holsinger FC, Zhou X, et al. Lymph Node Metastases from Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Laryngoscope.* 2005 Sep;115(9):1561–7.
86. Haisma MS, Plaat BEC, Bijl HP, Roodenburg JLN, Diercks GFH, Romeijn TR, et al. Multivariate analysis of potential risk factors for lymph node metastasis in patients with cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Am Acad Dermatol.* 2016;75(4).
87. Kyrgidis A, Tzellos TG, Kechagias N, Patrikidou A, Xirou P, Kitikidou K, et al. Cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) of the head and neck: Risk factors of overall and recurrence-free survival. *Eur J Cancer.* 2010 Jun

- 1;46(9):1563–72.
88. Breuninger H, Brantsch K, Eigentler T, Häfner H-M. Comparison and evaluation of the current staging of cutaneous carcinomas. *JDDG J der Dtsch Dermatologischen Gesellschaft*. 2012 Aug;10(8):579–86.
  89. Breuninger H, Schaumburg-Lever G, Holzschuh J, Horny HP. Desmoplastic squamous cell carcinoma of skin and vermilion surface: a highly malignant subtype of skin cancer. *Cancer*. 1997 Mar 1;79(5):915–9.
  90. Toll A, Masferrer E, Hernández-Ruiz ME, Ferrandiz-Pulido C, Yébenes M, Jaka A, et al. Epithelial to mesenchymal transition markers are associated with an increased metastatic risk in primary cutaneous squamous cell carcinomas but are attenuated in lymph node metastases. *J Dermatol Sci*. 2013 Nov;72(2):93–102.
  91. Ch'ng S, Low I, Ng D, Brasch H, Sullivan M, Davis P, et al. Epidermal growth factor receptor: a novel biomarker for aggressive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2008 Mar;39(3):344–9.
  92. Cañueto J, Cardeñoso E, García JL, Santos-Briz Á, Castellanos-Martín A, Fernández-López E, et al. Epidermal growth factor receptor expression is associated with poor outcome in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2017 May;176(5):1279–87.
  93. Sweeny L, Dean NR, Magnuson JS, Carroll WR, Helman EE, Hyde SO, et al. EGFR expression in advanced head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2012 May;34(5):681–6.

94. Fischer C, Zlobec I, Stöckli E, Probst S, Storck C, Tornillo L, et al. Is immunohistochemical epidermal growth factor receptor expression overestimated as a prognostic factor in head-neck squamous cell carcinoma? *Hum Pathol*. 2008 Oct;39(10):1527–34.
95. Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol*. 2016;7(December):550.
96. Wang X, Teng F, Kong L, Yu J, Press D. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther*. 2016 Aug 12;Volume 9:5023–39.
97. Stevenson ML, Wang CQF, Abikhair M, Roudiani N, Felsen D, Krueger JG, et al. Expression of Programmed Cell Death Ligand in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Treatment of Locally Advanced Disease With Pembrolizumab. *JAMA dermatology*. 2017 Apr 1;10016(4):1–5.
98. Schaper K, Köther B, Hesse K, Satzger I, Gutzmer R. The pattern and clinicopathological correlates of programmed death-ligand 1 expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2017;176(5):1354–6.
99. Jiao Q, Liu C, Li W, Li W, Fang F, Qian Q, et al. Programmed death-1 ligand 1 and 2 expression in cutaneous squamous cell carcinoma and their relationship with tumor- infiltrating dendritic cells. *Clin Exp Immunol*. 2017;420–9.
100. Slater NA, Googe PB. PD-L1 expression in cutaneous squamous cell carcinoma correlates with risk of metastasis. *J Cutan Pathol*.

- 2016;43(8):663–70.
101. Roper E, Lum T, Palme CE, Ashford B, Ch'ng S, Ranson M, et al. PD-L1 expression predicts longer disease free survival in high risk head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Pathology*. 2017 Aug;49(5):499–505.
  102. García-Pedrero JM, Martínez-Cambolor P, Diaz-Coto S, Munguia-Calzada P, Vallina-Alvarez A, Vazquez-Lopez F, et al. Tumor programmed cell death ligand 1 expression correlates with nodal metastasis in patients with cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Am Acad Dermatol*. 2017 Sep;77(3):527–33.
  103. Amoils M, Kim J, Lee C, Sunwoo JB, Colevas AD, Aasi SZ, et al. PD-L1 Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in High-Risk and Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019 Jan 17;160(1):93–9.
  104. Kamiya S, Kato J, Kamiya T, Yamashita T, Sumikawa Y, Hida T, et al. Association between PD-L1 expression and lymph node metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2018 Nov 8;
  105. Ruiz ES, Karia PS, Besaw R, Schmults CD. Performance of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual, 8th Edition vs the Brigham and Women's Hospital Tumor Classification System for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *JAMA dermatology*. 2019 Apr 10;
  106. Califano JA, Lydiatt WM, Nehal KS et al. Chapter 15: Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck *AJCC Cancer Staging Manual, 8th ed*. New York, NY: Springer; 2017. 171–181 p.

107. Cañueto J, Burguillo J, Moyano-Bueno D, Viñolas-Cuadros A, Conde-Ferreirós A, Corchete-Sánchez LA, et al. Comparing the eighth and the seventh editions of the American Joint Committee on Cancer staging system and the Brigham and Women's Hospital alternative staging system for cutaneous squamous cell carcinoma: Implications for clinical practice. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Jan;80(1):106-113.e2.
108. Karia PS, Morgan FC, Califano JA, Schmults CD. Comparison of Tumor Classifications for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck in the 7th vs 8th Edition of the *AJCC Cancer Staging Manual*. *JAMA Dermatology*. 2018 Feb 1;154(2):175.
109. Wermker K, Kluwig J, Schipmann S, Klein M, Schulze HJ, Hallermann C. Prediction score for lymph node metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma of the external ear. *Eur J Surg Oncol*. 2015 Jan 1;41(1):128–35.
110. Fleming P, Zhou S, Bobotsis R, Lynde C. Comparison of the Treatment Guidelines for Actinic Keratosis: A Critical Appraisal and Review. *J Cutan Med Surg*. 2017 Sep 16;21(5):408–17.
111. Ceilley RI, Jorizzo JL. Current issues in the management of actinic keratosis. *J Am Acad Dermatol*. 2013 Jan;68(1):S28–38.
112. Skulsky SL, O'Sullivan B, McArdle O, Leader M, Roche M, Conlon PJ, et al. Review of high-risk features of cutaneous squamous cell carcinoma and discrepancies between the American Joint Committee on Cancer and NCCN Clinical Practice Guidelines In Oncology. W. Eisele D, editor. *Head Neck*. 2017 Mar;39(3):578–94.

113. Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):26.
114. Chang ALS, Kim J, Luciano R, Sullivan-Chang L, Colevas AD. A Case Report of Unresectable Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Responsive to Pembrolizumab, a Programmed Cell Death Protein 1 Inhibitor. *JAMA dermatology.* 2016 Jan 1;152(1):106–8.
115. Papadopoulos KP, Owonikoko TK, Johnson M, Brana I, Gil Martin M, Perez RP, et al. Cemiplimab (REGN2810): A fully human anti-PD-1 monoclonal antibody for patients with unresectable locally advanced or metastatic cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC)—Initial safety and efficacy from expansion cohorts (ECs) of phase I study. *J Clin Oncol.* 2018 Feb 10;36(5\_suppl):195–195.
116. Tran DC, Colevas AD, Chang ALS. Follow-up on programmed cell death 1 inhibitor for cutaneous squamous cell carcinoma. Vol. 153, *JAMA Dermatology.* American Medical Association; 2017. p. 92–4.
117. Blum V, Müller B, Hofer S, Pardo E, Zeidler K, Diebold J, et al. Nivolumab for recurrent cutaneous squamous cell carcinoma: three cases. *Eur J Dermatology.* 2018 Jan 1;28(1):78–81.
118. Chen A, Ali N, Boasberg P, Ho A. Clinical Remission of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Auricle with Cetuximab and Nivolumab. *J Clin Med.* 2018 Jan 10;7(1):10.
119. Hermel DJ, Ragab OM, Higgins S, Wysong A, In GK. PD-1 inhibition in cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC). *J Clin Oncol.* 2018 May

- 20;36(15\_suppl):e15100–e15100.
120. Assam JH, Powell S, Spanos WC. Unresectable Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Forehead With MLH1 Mutation Showing Dramatic Response to Programmed Cell Death Protein 1 Inhibitor Therapy. *Clin Skin Cancer*. 2016 Jan 1;1(1):26–9.
  121. Sadaat M, Jang S. Complete Tumor Response to Pembrolizumab and Allograft Preservation in Renal Allograft Recipient on Immunosuppressive Therapy. *J Oncol Pract*. 2018 Mar;14(3):198–9.
  122. Winkler JKK, Schneiderbauer R, Bender C, Sedlacek O, Fröhling S, Penzel R, et al. Anti-programmed cell death-1 therapy in nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2017 Feb;176(2):498–502.
  123. Falchook GS, Leidner R, Stankevich E, Piening B, Bifulco C, Lowy I, et al. Responses of metastatic basal cell and cutaneous squamous cell carcinomas to anti-PD1 monoclonal antibody REGN2810. *J Immunother Cancer*. 2016 Dec 15;4(1):70.
  124. Miller DM, Faulkner-Jones BE, Stone JR, Drews RE. Complete pathologic response of metastatic cutaneous squamous cell carcinoma and allograft rejection after treatment with combination immune checkpoint blockade. *JAAD Case Reports*. 2017 Sep;3(5):412–5.
  125. Borradori L, Sutton B, Shayesteh P, Daniels GAA. Rescue therapy with anti-programmed cell death protein 1 inhibitors of advanced cutaneous squamous cell carcinoma and basosquamous carcinoma: preliminary experience in five cases. *Br J Dermatol*. 2016 Dec;175(6):1382–6.

126. Lipson EJ, Bagnasco SM, Moore J, Jang S, Patel MJ, Zachary AA, et al. Tumor Regression and Allograft Rejection after Administration of Anti-PD-1. *N Engl J Med*. 2016 Mar 3;374(9):896–8.
127. Migden MR, Rischin D, Schmults CD, Guminski A, Hauschild A, Lewis KD, et al. PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018 Jul 26;379(4):341–51.
128. Rischin D, Migden MR, Chang A, Chung CH, Dunn L, Guminski A, et al. Primary analysis of phase 2 results for cemiplimab, a human monoclonal anti-PD-1, in patients with metastatic cutaneous squamous cell carcinoma (mCSCC). *J Clin Oncol*. 2018 May 20;36(15\_suppl):9519–9519.
129. Maubec E, Boubaya M, Petrow P, Basset-Seguín N, Grob J-J, Dreno B, et al. Pembrolizumab as first line therapy in patients with unresectable squamous cell carcinoma of the skin: Interim results of the phase 2 CARSKIN trial. *J Clin Oncol*. 2018 May 20;36(15\_suppl):9534–9534.
130. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4(2):249–64.
131. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2004;3:12.
132. Dean CB, Nielsen JD. Generalized linear mixed models: a review and some extensions. *Lifetime Data Anal*. 2007;13(4):497–512.

133. Bengtsson H, Simpson K, Bullard J, Hansen K. aroma.affymetrix: A generic framework in R for analyzing small to very large Affymetrix data sets in bounded memory. Tech Rep #745, Dep Stat Univ California, Berkeley. 2008;
134. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods*. 2015;12(2):115–21.
135. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(7):20.
136. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545–50.
137. McIntyre A, Summersgill B, Jafer O, Rodriguez S, Zafarana G, Oosterhuis JW, et al. Defining minimum genomic regions of imbalance involved in testicular germ cell tumors of adolescents and adults through genome wide microarray analysis of cDNA clones. *Oncogene*. 2004 Dec 2;23(56):9142–7.
138. K. S, R. T, JR. P. DRI: DR-Integrator. R package version 1.1.  
<http://CRAN.R-project.org/package=DRI>. DRI: DR-In.
139. Toll A, Salgado R, Espinet B, Díaz-Lagares A, Hernández-Ruiz E, Andrades E, et al. MiR-204 silencing in intraepithelial to invasive cutaneous squamous cell carcinoma progression. *Mol Cancer*. 2016;15(1):53.

140. Fusenig NE, Boukamp P. Multiple stages and genetic alterations in immortalization, malignant transformation, and tumor progression of human skin keratinocytes. *Mol Carcinog.* 1998;23(3):144–58.
141. Gambichler T, Gnielka M, Rüdell I, Stockfleth E, Stücker M, Schmitz L. Expression of PD-L1 in keratoacanthoma and different stages of progression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2017 Sep;66(9):1199–204.
142. Boldrup L, Coates PJ, Laurell G, Nylander K. p63 Transcriptionally regulates BNC1, a Pol I and Pol II transcription factor that regulates ribosomal biogenesis and epithelial differentiation. *Eur J Cancer.* 2012 Jun;48(9):1401–6.
143. Young MR, Colburn NH. Fra-1 a target for cancer prevention or intervention. *Gene.* 2006/06/21. 2006;379:1–11.
144. Iuchi S, Green H. Nuclear localization of basoenuclin in human keratinocytes and the role of phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jul 22;94(15):7948–53.
145. Moniz L, Dutt P, Haider N, Stambolic V. Nek family of kinases in cell cycle, checkpoint control and cancer. Vol. 6, *Cell Division.* 2011.
146. Moniz LS, Stambolic V. Nek10 mediates G2/M cell cycle arrest and MEK autoactivation in response to UV irradiation. *Mol Cell Biol.* 2010/10/20. 2011;31(1):30–42.
147. Zhang X, Cai J, Zheng Z, Polin L, Lin Z, Dandekar A, et al. A novel ER-

- microtubule-binding protein, ERLIN2, stabilizes Cyclin B1 and regulates cell cycle progression. *Cell Discov.* 2015 Dec 8;1(1):15024.
148. Prasad NB, Fischer AC, Chuang AY, Wright JM, Yang T, Tsai H-L, et al. Differential expression of degradome components in cutaneous squamous cell carcinomas. *Mod Pathol.* 2014 Jul 20;27(7):945–57.
149. Hudson LG, Gale JM, Padilla RS, Pickett G, Alexander BE, Wang J, et al. Microarray analysis of cutaneous squamous cell carcinomas reveals enhanced expression of epidermal differentiation complex genes. *Mol Carcinog.* 2010;49(7):619–29.
150. Dooley TP, Reddy SP, Wilborn TW, Davis RL. Biomarkers of human cutaneous squamous cell carcinoma from tissues and cell lines identified by DNA microarrays and qRT-PCR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jul 11;306(4):1026–36.
151. Nindl I, Dang C, Forscher T, Kuban RJ, Meyer T, Sterry W, et al. Identification of differentially expressed genes in cutaneous squamous cell carcinoma by microarray expression profiling. *Mol Cancer.* 2006 Aug 8;5(1):30.
152. Fernandez Figueras MT. From actinic keratosis to squamous cell carcinoma: pathophysiology revisited. Vol. 31, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology.* 2017.
153. Chitsazzadeh V, Coarfa C, Drummond JA, Nguyen T, Joseph A, Chilukuri S, et al. Cross-species identification of genomic drivers of squamous cell carcinoma development across preneoplastic intermediates. *Nat Commun.*

- 2016 Nov 30;7(1):12601.
154. Ra SH, Li X, Binder S, Hui Ra S, Li X, Binder S. Molecular discrimination of cutaneous squamous cell carcinoma from actinic keratosis and normal skin. *Mod Pathol*. 2011 Jul;24(7):963–73.
155. Rodríguez-Paredes M, Bormann F, Raddatz G, Gutekunst J, Lucena-Porcel C, Köhler F, et al. Methylation profiling identifies two subclasses of squamous cell carcinoma related to distinct cells of origin. *Nat Commun*. 2018 Dec 1;9(1).
156. Mitsui H, Suárez-Fariñas M, Gulati N, Shah KR, Cannizzaro M V., Coats I, et al. Gene Expression Profiling of the Leading Edge of Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: IL-24-Driven MMP-7. *J Invest Dermatol*. 2014 May;134(5):1418–27.
157. Kathpalia VP, Mussak EN, Chow SS, Lam PH, Skelley N, Time M, et al. Genome-wide transcriptional profiling in human squamous cell carcinoma of the skin identifies unique tumor-associated signatures. *J Dermatol*. 2006 May;33(5):309–18.
158. Tseng H, Green H. Association of basonuclin with ability of keratinocytes to multiply and with absence of terminal differentiation. *J Cell Biol*. 1994;126(2):495–506.
159. Tseng H. Basonuclin, a zinc finger protein associated with epithelial expansion and proliferation. *Front Biosci*. 1998 Sep 1;1(3):D985-8.
160. Vanhoutteghem A, Djian P. Basonuclins 1 and 2, whose genes share a

- common origin, are proteins with widely different properties and functions. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Aug 15;103(33):12423–8.
161. Wang J, Zhang S, Schultz RM, Tseng H. Search for basonuclein target genes. Biochem Biophys Res Commun. 2006;348(4):1261–71.
  162. Wu Y, Zhang X, Liu Y, Lu F, Chen X. Decreased Expression of BNC1 and BNC2 Is Associated with Genetic or Epigenetic Regulation in Hepatocellular Carcinoma. Int J Mol Sci. 2016 Jan 25;17(2).
  163. Eissa MAL, Lerner L, Abdelfatah E, Shankar N, Canner JK, Hasan NM, et al. Promoter methylation of ADAMTS1 and BNC1 as potential biomarkers for early detection of pancreatic cancer in blood. Clin Epigenetics. 2019;11(1):59.
  164. Patai Á V, Barták BK, Péterfia B, Micsik T, Horváth R, Sumánszki C, et al. Comprehensive DNA Methylation and Mutation Analyses Reveal a Methylation Signature in Colorectal Sessile Serrated Adenomas. Pathol Oncol Res. 2017 Jul;23(3):589–94.
  165. Kim M-C, Kim N-Y, Seo Y-R, Kim Y. An Integrated Analysis of the Genome-Wide Profiles of DNA Methylation and mRNA Expression Defining the Side Population of a Human Malignant Mesothelioma Cell Line. J Cancer. 2016;7(12):1668–79.
  166. Tong W-G, Wierda WG, Lin E, Kuang S-Q, Bekele BN, Estrov Z, et al. Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. Epigenetics. 2010 Aug 16;5(6):499–508.

167. Devaney JM, Wang S, Funda S, Long J, Taghipour DJ, Tbaishat R, et al. Identification of novel DNA-methylated genes that correlate with human prostate cancer and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2013 Dec;16(4):292–300.
168. Shames DS, Girard L, Gao B, Sato M, Lewis CM, Shivapurkar N, et al. A genome-wide screen for promoter methylation in lung cancer identifies novel methylation markers for multiple malignancies. *PLoS Med.* 2006 Dec;3(12):2244–63.
169. Pangen RP, Channathodiyil P, Huen DS, Eagles LW, Johal BK, Pasha D, et al. The GALNT9, BNC1 and CCDC8 genes are frequently epigenetically dysregulated in breast tumours that metastasise to the brain. *Clin Epigenetics.* 2015;7:57.
170. Yi JM, Guzzetta AA, Bailey VJ, Downing SR, Neste L Van, Chiappinelli KB, et al. Novel methylation biomarker panel for the early detection of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2013 Dec 1;19(23):6544–55.
171. Boldrup L, Coates PJ, Laurell G, Nylander K. p63 Transcriptionally regulates BNC1, a Pol I and Pol II transcription factor that regulates ribosomal biogenesis and epithelial differentiation. *Eur J Cancer.* 2012;48(9):1401–6.
172. Guo L, Fan D, Zhang F, Price JE, Lee JS, Marchetti D, et al. Selection of brain metastasis-initiating breast cancer cells determined by growth on hard agar. *Am J Pathol.* 2011;178(5):2357–66.
173. Cui C, Elsam T, Tian Q, Seykora JT, Grachtchouk M, Dlugosz A, et al. Gli proteins up-regulate the expression of basonuclin in Basal cell carcinoma.

- Cancer Res. 2004;64(16):5651–8.
174. Iuchi S, Easley K, Matsuzaki K, Weiner L, O'Connor N, Green H. Alternative subcellular locations of keratinocyte basonuclin. *Exp Dermatol*. 2000 Jun;9(3):178–84.
175. Matsuzaki K, Inoue H, Kumagai N. Re-epithelialisation and the possible involvement of the transcription factor, basonuclin. *Int Wound J*. 2004 Jun;1(2):135–40.
176. Tseng H, Matsuzaki K, Lavker RM. Basonuclin in murine corneal and lens epithelia correlates with cellular maturation and proliferative ability. *Differentiation*. 1999;65(4):221–7.
177. Yang ZH, Gallicano GI, Yu QC, Fuchs E. An unexpected localization of basonuclin in the centrosome, mitochondria, and acrosome of developing spermatids. Vol. 137, *Journal of Cell Biology*. The Rockefeller University Press; 1997. p. 657–69.
178. Wu Y, Liao S, Wang X, Wang S, Wang M, Han C. HSF2BP represses BNC1 transcriptional activity by sequestering BNC1 to the cytoplasm. *FEBS Lett*. 2013 Jul 11;587(14):2099–104.
179. Jiang X, Xie H, Dou Y, Yuan J, Zeng D, Xiao S. Expression and function of FRA1 protein in tumors. *Molecular Biology Reports*. Springer Netherlands; 2019.
180. Mangone FRR, Brentani MM, Nonogaki S, Begnami MDFS, Campos AHJFM, Walder F, et al. Overexpression of Fos-related antigen-1 in head

- and neck squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol*. 2005;86(4):205–12.
181. Zhang X, Wu J, Luo S, Lechler T, Zhang JY. FRA1 promotes squamous cell carcinoma growth and metastasis through distinct AKT and c-Jun dependent mechanisms. *Oncotarget*. 2016/05/05. 2016;7(23):34371–83.
182. Zoumpourlis V, Papassava P, Linardopoulos S, Gillespie D, Balmain A, Pintzas A. High levels of phosphorylated c-Jun, Fra-1, Fra-2 and ATF-2 proteins correlate with malignant phenotypes in the multistage mouse skin carcinogenesis model. *Oncogene*. 2000 Aug 17;19(35):4011–21.
183. Ding X, Pan H, Li J, Zhong Q, Chen X, Dry SM, et al. Epigenetic activation of AP1 promotes squamous cell carcinoma metastasis. *Sci Signal*. 2013;6(273):ra28.1-13, S0-15.
184. Serewko MM, Popa C, Dahler AL, Smith L, Strutton GM, Coman W, et al. Alterations in gene expression and activity during squamous cell carcinoma development. *Cancer Res*. 2002 Jul 1;62(13):3759–65.
185. Hu YC, Lam KY, Law S, Wong J, Srivastava G. Identification of differentially expressed genes in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) by cDNA expression array: overexpression of Fra-1, Neogenin, Id-1, and CDC25B genes in ESCC. *Clin Cancer Res*. 2001 Aug;7(8):2213–21.
186. Zhang L, Pan H-Y, Zhong L-P, Wei K-J, Yang X, Li J, et al. Fos-related activator-1 is overexpressed in oral squamous cell carcinoma and associated with tumor lymph node metastasis. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(6):470–6.

187. Purdie KJ, Harwood CA, Gulati A, Chaplin T, Lambert SR, Cerio R, et al. Single nucleotide polymorphism array analysis defines a specific genetic fingerprint for well-differentiated cutaneous SCCs. *J Invest Dermatol.* 2009;129(6):1562–8.
188. Quinn AG, Sikkink S, Rees JL. Basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas of human skin show distinct patterns of chromosome loss. *Cancer Res.* 1994;54(17):4756–9.
189. Popp S, Waltering S, Holtgreve-Grez H, Jauch A, Proby C, Leigh IM, et al. Genetic characterization of a human skin carcinoma progression model: From primary tumor to metastasis. *J Invest Dermatol.* 2000;115(6):1095–103.
190. Sikkink SK, Rehman I, Rees JL. Deletion mapping of chromosome 3p and 13q and preliminary analysis of the FHIT gene in human nonmelanoma skin cancer. *J Invest Dermatol.* 1997;109(6):801–5.
191. Kooij B van de, Creixell P, Vlimmeren A van, Joughin BA, Miller CJ, Haider N, et al. Comprehensive substrate specificity profiling of the human nek kinome reveals unexpected signaling outputs. *Elife.* 2019 May 1;8.
192. Ahmed S, Thomas G, Ghousaini M, Healey CS, Humphreys MK, Platte R, et al. Newly discovered breast cancer susceptibility loci on 3p24 and 17q23.2. *Nat Genet.* 2009/03/31. 2009;41(5):585–90.
193. Bryan MS, Argos M, Andrulis IL, Hopper JL, Chang-Claude J, Malone KE, et al. Germline variation and breast cancer incidence: A gene-based association study and whole-genome prediction of early-onset breast

- cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2018 Sep 1;27(9):1057–64.
194. Kaji T, Yamasaki O, Takata M, Otsuka M, Hamada T, Morizane S, et al. Comparative study on driver mutations in primary and metastatic melanomas at a single Japanese institute: A clue for intra- and inter-tumor heterogeneity. *J Dermatol Sci.* 2016/10/25. 2017;85(1):51–7.
195. Davies H, Hunter C, Smith R, Stephens P, Greenman C, Bignell G, et al. Somatic mutations of the protein kinase gene family in human lung cancer. *Cancer Res.* 2005 Sep 1;65(17):7591–5.
196. Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature.* 2007 Mar 8;446(7132):153–8.
197. Porpora M, Sauchella S, Rinaldi L, Delle Donne R, Sepe M, Torres-Quesada O, et al. Counterregulation of cAMP-directed kinase activities controls ciliogenesis. *Nat Commun.* 2018 Dec 26;9(1):1224.
198. Suzuki T, Urano T, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, et al. Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci.* 2007 May;98(5):644–51.
199. Hassan KA, Ang KK, El-Naggar AK, Story MD, Lee JI, Liu D, et al. Cyclin B1 overexpression and resistance to radiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002 Nov 15;62(22):6414–7.
200. Takeno S, Noguchi T, Kikuchi R, Uchida Y, Yokoyama S, Müller W. Prognostic value of cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell

- carcinoma. *Cancer*. 2002 Jun 1;94(11):2874–81.
201. Dong Y, Sui L, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Clinical relevance of cyclin B1 overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Lett*. 2002 Mar 8;177(1):13–9.
202. Li J-Q, Kubo A, Wu F, Usuki H, Fujita J, Bando S, et al. Cyclin B1, unlike cyclin G1, increases significantly during colorectal carcinogenesis and during later metastasis to lymph nodes. *Int J Oncol*. 2003 May;22(5):1101–10.
203. Kawamoto H, Koizumi H, Uchikoshi T. Expression of the G2-M checkpoint regulators cyclin B1 and cdc2 in nonmalignant and malignant human breast lesions: immunocytochemical and quantitative image analyses. *Am J Pathol*. 1997 Jan;150(1):15–23.
204. Dutta A, Chandra R, Leiter LM, Lester S. Cyclins as markers of tumor proliferation: immunocytochemical studies in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5386–90.
205. Wu Y, Chen W, Xu ZP, Gu W. PD-L1 distribution and perspective for cancer immunotherapy— blockade, knockdown, or inhibition. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
206. Qin W, Hu L, Zhang X, Jiang S, Li J, Zhang Z, et al. The Diverse Function of PD-1/PD-L Pathway Beyond Cancer. Vol. 10, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
207. Hino R, Kabashima K, Kato Y, Yagi H, Nakamura M, Honjo T, et al. Tumor

- cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer*. 2010 Apr 1;116(7):1757–66.
208. Strome SE, Dong H, Tamura H, Voss SG, Flies DB, Tamada K, et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003 Oct;63(19):6501–5.
209. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3360–5.
210. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother*. 2007 May;56(8):1173–82.
211. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(4):847–56.
212. Gandini S, Massi D, Mandalà M. PD-L1 expression in cancer patients receiving anti PD-1/PD-L1 antibodies: A systematic review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology Elsevier Ireland Ltd*; Apr 1, 2016 p. 88–98.
213. Cohen EEW, Bell RB, Bifulco CB, Burtneess B, Gillison ML, Harrington KJ, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on immunotherapy for the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *J Immunother Cancer*. 2019 Jul 15;7(1).

214. Ribas A, Hu-Lieskovan S. What does PD-L1 positive or negative mean? *J Exp Med*. 2016;213(13):2835–40.
215. Migden MR, Khushalani NI, Chang ALS, Lewis KD, Schmults CD, Hernandez-Aya L, et al. Cemiplimab in locally advanced cutaneous squamous cell carcinoma: results from an open-label, phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol*. 2020 Jan 14;21(2).
216. Qing Y, Li Q, Ren T, Xia W, Peng Y, Liu GL, et al. Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer. *Drug Des Devel Ther*. 2015 Feb 16;9:901–9.
217. Geng L, Huang D, Liu J, Qian Y, Deng J, Li D, et al. B7-H1 up-regulated expression in human pancreatic carcinoma tissue associates with tumor progression. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008 Sep 18;134(9):1021–7.
218. Zeng Z, Shi F, Zhou L, Zhang M-N, Chen Y, Chang X-J, et al. Upregulation of Circulating PD-L1/PD-1 Is Associated with Poor Post-Cryoablation Prognosis in Patients with HBV-Related Hepatocellular Carcinoma. *Luk J*, editor. *PLoS One*. 2011 Sep;6(9):e23621.
219. Wu Y, Zhang X, Liu Y, Lu F, Chen X. No Title. 2016 Jan 25;17(2).
220. Wu P, Wu D, Li L, Chai Y, Huang J. PD-L1 and survival in solid tumors: A meta-analysis. *PLoS One*. 2015 Jun 26;10(6).
221. AiErken NJ, Shi HJ, Zhou Y, Shao N, Zhang J, Shi Y, et al. High PD-L1 expression is closely associated with tumor-infiltrating lymphocytes and leads to good clinical outcomes in Chinese triple negative breast cancer

- patients. *Int J Biol Sci.* 2017 Sep 5;13(9):1172–9.
222. Schalper KA, Velcheti V, Carvajal D, Wimberly H, Brown J, Pusztai L, et al. In Situ Tumor PD-L1 mRNA Expression Is Associated with Increased TILs and Better Outcome in Breast Carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2014 May;20(10):2773–82.
223. Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Lubner BS, Wang H, et al. PD-L1 Expression in the Merkel Cell Carcinoma Microenvironment: Association with Inflammation, Merkel Cell Polyomavirus, and Overall Survival. *Cancer Immunol Res.* 2013 Jul;1(1):54–63.
224. Varki V, Ioffe OB, Bentzen SM, Heath J, Cellini A, Feliciano J, et al. PD-L1, B7-H3, and PD-1 expression in immunocompetent vs. immunosuppressed patients with cutaneous squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2018 May 1;67(5):805–14.
225. Bauer C, Abdul Pari AA, Umansky V, Utikal J, Boukamp P, Augustin HG, et al. T-lymphocyte profiles differ between keratoacanthomas and invasive squamous cell carcinomas of the human skin. *Cancer Immunol Immunother.* 2018 Jul 1;67(7):1147–57.
226. Speiser DE, Ho PC, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. Vol. 16, *Nature Reviews Immunology.* Nature Publishing Group; 2016. p. 599–611.
227. Nguyen N, Bellile E, Thomas D, McHugh J, Rozek L, Virani S, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2016 Jul 1;38(7):1074–84.

228. Erdag G, Schaefer JT, Smolkin ME, Deacon DH, Shea SM, Dengel LT, et al. Immunotype and Immunohistologic Characteristics of Tumor-Infiltrating Immune Cells Are Associated with Clinical Outcome in Metastatic Melanoma. *Cancer Res.* 2012 Mar;72(5):1070–80.
229. Ali HR, Provenzano E, Dawson S-J, Blows FM, Liu B, Shah M, et al. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. *Ann Oncol.* 2014 Aug;25(8):1536–43.
230. Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Aug;58(16):3491–4.
231. Paulson KG, Iyer JG, Tegeder AR, Thibodeau R, Schelter J, Koba S, et al. Transcriptome-Wide Studies of Merkel Cell Carcinoma and Validation of Intratumoral CD8+ Lymphocyte Invasion As an Independent Predictor of Survival. *J Clin Oncol.* 2011 Apr;29(12):1539–46.
232. Gooden MJM, De Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: A systematic review with meta-analysis. Vol. 105, *British Journal of Cancer.* Br J Cancer; 2011. p. 93–103.
233. Mishra AK, Kadoishi T, Wang X, Driver E, Wang X, Wang JH. Squamous cell carcinomas escape immune surveillance via inducing chronic activation and exhaustion of CD8 + T Cells co-expressing PD-1 and LAG-3 inhibitory receptors. *Oncotarget.* 2016;7(49):81341–56.
234. Spranger S, Spaapen RM, Zha Y, Williams J, Meng Y, Ha TT, et al. Up-

- regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells. Vol. 5, *Science Translational Medicine*. American Association for the Advancement of Science; 2013. p. 200ra116-200ra116.
235. Kraft S, Fernandez-Figueras MT, Richarz NA, Flaherty KT, Hoang MP. PDL1 expression in desmoplastic melanoma is associated with tumor aggressiveness and progression. *J Am Acad Dermatol*. 2017;77(3):534–42.
236. Frydenlund N, Leone D, Yang S, Hoang MP, Deng A, Hernandez-Perez M, et al. Tumoral PD-L1 expression in desmoplastic melanoma is associated with depth of invasion, tumor-infiltrating CD8 cytotoxic lymphocytes and the mixed cytomorphological variant. *Mod Pathol*. 2017;1–13.
237. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Invest*. 2014 Jan 11;94(1):107–16.
238. Beckers RK, Selinger CI, Vilain R, Madore J, Wilmott JS, Harvey K, et al. Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Histopathology*. 2016 Jul 1;69(1):25–34.
239. Satgunaseelan L, Gupta R, Madore J, Chia N, Lum T, Palme CE, et al. Programmed cell death-ligand 1 expression in oral squamous cell carcinoma is associated with an inflammatory phenotype. *Pathology*. 2016 Oct 1;48(6):574–80.
240. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et

- al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014 Nov;515(7528):568–71.
241. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*. 2012 Mar;4(127):127ra37.
242. Bellmunt J, Mullane SA, Werner L, Fay AP, Callea M, Leow JJ, et al. Association of PD-L1 expression on tumor-infiltrating mononuclear cells and overall survival in patients with urothelial carcinoma. *Ann Oncol*. 2015 Apr;26(4):812–7.
243. Zou MX, Peng AB, Lv GH, Wang X Bin, Li J, She XL, et al. Expression of programmed death-1 ligand (PD-L1) in tumor-infiltrating lymphocytes is associated with favorable spinal chordoma prognosis. *Am J Transl Res*. 2016;8(7):3274–87.
244. Darb-Esfahani S, Kunze CA, Kulbe H, Sehouli J, Wienert S, Lindner J, et al. Prognostic impact of programmed cell death-1 (PD-1) and PD-ligand 1 (PD-L1) expression in cancer cells and tumorinfiltrating lymphocytes in ovarian high grade serous carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(2):1486–99.
245. Zhao T, Li C, Wu Y, Li B, Zhang B. Prognostic value of PD-L1 expression in tumor infiltrating immune cells in cancers: A metaanalysis. *PLoS One*. 2017 Apr 1;12(4).
246. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in

- cancer patients. *Nature*. 2014 Nov 27;515(7528):563–7.
247. Amoils M, Lee CS, Sunwoo J, Aasi SZ, Hara W, Kim J, et al. Node-positive cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck: Survival, high-risk features, and adjuvant chemoradiotherapy outcomes. *Head Neck*. 2017 May 1;39(5):881–5.
248. Callea M, Albiges L, Gupta M, Cheng SC, Genega EM, Fay AP, et al. Differential expression of PD-L1 between primary and metastatic sites in clear-cell renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2015 Oct 1;3(10):1158–64.
249. Evans M, O’Sullivan B, Hughes F, Mullis T, Smith M, Trim N, et al. The Clinicopathological and Molecular Associations of PD-L1 Expression in Non-small Cell Lung Cancer: Analysis of a Series of 10,005 Cases Tested with the 22C3 Assay. *Pathol Oncol Res*. 2018;
250. Terra SBSP, Mansfield AS, Dong H, Peikert T, Roden AC. Temporal and spatial heterogeneity of programmed cell death 1-Ligand 1 expression in malignant mesothelioma. *Oncoimmunology*. 2017 Nov 2;6(11).
251. Dill EA, Gru AA, Atkins KA, Friedman LA, Moore ME, Bullock TN, et al. PD-L1 Expression and Intratumoral Heterogeneity Across Breast Cancer Subtypes and Stages: An Assessment of 245 Primary and 40 Metastatic Tumors. *Am J Surg Pathol*. 2017;41(3):334–42.
252. Manson QF, Schrijver WAME, ter Hoeve ND, Moelans CB, van Diest PJ. Frequent discordance in PD-1 and PD-L1 expression between primary breast tumors and their matched distant metastases. *Clin Exp Metastasis*.

- 2019 Feb 15;36(1):29–37.
253. Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, et al. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: Implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015 May 1;28(3):245–53.
254. Tsao MS, Kerr KM, Kockx M, Beasley MB, Borczuk AC, Botling J, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Comparability Study in Real-Life Clinical Samples: Results of Blueprint Phase 2 Project. *J Thorac Oncol.* 2018 Sep 1;13(9):1302–11.
255. Karnik T, Kimler BF, Fan F, Tawfik O. PD-L1 in breast cancer: comparative analysis of 3 different antibodies. *Hum Pathol.* 2018 Feb 1;72:28–34.
256. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Vol. 12, *Nature Reviews Cancer.* Nature Publishing Group; 2012. p. 252–64.



## 10. Anexos

---



## 10.1. ANEXO 1: Publicaciones relacionadas

### 10.1.1. Artículo 1

*Transcriptome and cytogenetic profiling analysis of matched in situ/invasive cutaneous squamous cell carcinomas from immunocompetent patients.*

**García-Díez Irene**, Hernández Muñoz Inmaculada, Hernández Ruiz Eugenia, Nonell Lara, Puigdecanet Eulalia, Bódalo Torruella Marta, Andrades Evelyn, Pujol Ramón M., Toll Agustí.

Genes Chromosomes and Cancer. 2019 Mar;58(3):164-174. (Factor de impacto 3,362 en 2017). DOI: **10.1002/gcc.22712**.

DOI: 10.1002/gcc.22712.

**10.1.2. Artículo 2**

***PD-L1 Expression is Increased in Metastasizing Squamous Cell Carcinomas and Their Metastases.***

**García-Díez Irene**, Hernández-Ruiz Eugenia, Andrades Evelyn, Gimeno Javier, Ferrándiz-Pulido Carla, Yébenes Mireia, García-Patos Vicente, Pujol Ramón María, Hernández-Muñoz Inmaculada, Toll Agustí.

The American Journal of Dermatopathology. 2018 Sep;40(9):647-654. (Factor de impacto 1,21 en 2017). DOI: 10.1097/DAD.0000000000001164.



### 10.1.3. Material suplementario artículo 1

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

##### Supplementary tables

**Table S1.** qRT-PCR primer sequences.

|                | Forward               | Reverse               |
|----------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>GAPDH</b>   | AGTCAGCCGCATCTTCTTTTG | AAATCCGTTGACTCCGACCTT |
| <b>TBPL2</b>   | TGTCAAATTCCCATTACAG   | CTGTAGTTGAGGTACAATTCC |
| <b>ANXA3</b>   | GAAAGATGACTTGAAGGGTG  | CCCTTCATGGATTTCTTTAGC |
| <b>BNC1</b>    | ACGCTCTAAGTAAGCTAAGG  | CGGTCCAGTAGGATTTTTAG  |
| <b>FOSL1</b>   | CTTGTGAACAGATCAGCC    | CCAGATTTCTCATCTCCAG   |
| <b>SVEP1</b>   | AGATGTCTGGAAGGTTATACG | CTATTCACACTGAAATCGTCC |
| <b>IL1A</b>    | AGAGGAAGAAATCATCAAGC  | TTATACTTGATTGAGGGCG   |
| <b>PPP1R3C</b> | CCAGAATGATCCAGGTTTTAG | ATTGAGACATGATTCAGGG   |
| <b>KIT</b>     | ACAAAACCAGAAATCCTGAC  | CAGTTCCTGGACAAAAATACC |
| <b>MET</b>     | CATGTGAATTTTCTCCTGGAC | ATCTTCTTCCCAGTGATAACC |
| <b>LYN</b>     | AAAGGAAGCTTCTCTCTGTC  | ATGTAATAGCCCCATTATCC  |
| <b>ID1</b>     | ACTACTCACCAGAGACTTTAG | AAATCTGAGAAGCACCAAAC  |
| <b>GJB2</b>    | AGGATATCGGCATTTGTTC   | GAAAGTTGGCAAAAAGAACC  |
| <b>FOXC1</b>   | ATGGCGATTTGATTACAGAC  | ATTACTGCTTAAGTGTGCC   |
| <b>UPP1</b>    | CCCGTCAGACTTTTAAATCC  | ACTTCACATCTCCAAACAAG  |

**Table S2.** Results of the differentially expressed genes from the gene expression analysis from limma ( $\log_{2}FC > 0,58$  (ie  $|FC| > 1,5$ ),  $p < 0.01$ ). (attached as a pdf file as supplementary material 2)

**Table S3.** Shared chromosomal aberrations between AK and cSCC of the same patient.

| AK  | cSCC | Alteration | Chromosome            | N° of shared alterations |
|-----|------|------------|-----------------------|--------------------------|
| 101 | 99   | Gain       | 3, 5, 6, 8            | 5                        |
|     |      | Loss       | 9                     |                          |
| 116 | 114  | Gain       | 3                     | 3                        |
|     |      | Loss       | 9, 21                 |                          |
| 148 | 145  | Gain       | 8                     | 4                        |
|     |      | Loss       | 3, 21(2)              |                          |
| 149 | 151  | Gain       | 8, 9(3)               | 5                        |
|     |      | Loss       | 13                    |                          |
| 163 | 161  | Gain       | 8, 15(2), 18,         | 10                       |
|     |      | Loss       | 2, 10, 21, X,<br>Y(2) |                          |
| 81  | 78   | Gain       | 3, 9                  | 5                        |
|     |      | Loss       | 9, 13, 14             |                          |

\*In brackets number of chromosomal regions showing alterations (gains/losses) if more than one region involved.

**Table S4.** Results of the comparison of transcriptome and copy number analysis.

| AK vs SES  |               |            |               |               |              |
|------------|---------------|------------|---------------|---------------|--------------|
| Rank       | Gene          | Chromosome | Dna score     | Rna score     | Correlation  |
| 1          | PHF20L1       | 8          | 2.029         | 2.007         | 3.991        |
| 2          | KRTAP19-3     | 21         | -1.835        | -1.863        | -3.642       |
| 3          | KRTAP12-1     | 21         | -1.835        | -1.865        | -3.638       |
| cSCC vs AK |               |            |               |               |              |
| Rank       | Gene          | Chromosome | Dna score     | Rna score     | Correlation  |
| <b>1</b>   | <b>NEK10</b>  | <b>3</b>   | <b>-3.012</b> | <b>-2.865</b> | <b>-5.59</b> |
| 2          | LMOD3         | 3          | -2.433        | -2.423        | -4.836       |
| 3          | RP13-131K19.2 | 3          | -2.433        | -2.467        | -4.832       |
| 4          | HSPD1P6       | 3          | -2.433        | -2.474        | -4.826       |
| 5          | HESX1         | 3          | -2.433        | -2.507        | -4.794       |
| 6          | PRSS46        | 3          | -2.433        | -2.406        | -4.786       |
| 7          | SUSD5         | 3          | -2.433        | -2.4          | -4.767       |
| 8          | ITGA9-AS1     | 3          | -2.433        | -2.396        | -4.755       |
| 9          | ZNF660        | 3          | -2.433        | -2.393        | -4.747       |
| 10         | SCAP          | 3          | -2.433        | -2.369        | -4.676       |
| 11         | RNU6-905P     | 3          | -2.433        | -2.365        | -4.665       |
| 12         | CTD-2013N24.2 | 3          | -2.433        | -2.363        | -4.657       |
| 13         | KLHDC8B       | 3          | -2.433        | -2.69         | -4.634       |
| 14         | LRIG1         | 3          | -2.433        | -2.352        | -4.626       |
| 15         | CHDH          | 3          | -2.433        | -2.71         | -4.617       |
| 16         | RPL14         | 3          | -2.433        | -2.733        | -4.599       |
| 17         | PDZRN3        | 3          | -2.433        | -2.738        | -4.595       |
| 18         | RP11-20B7.1   | 3          | -2.433        | -2.743        | -4.591       |
| 19         | CDHR4         | 3          | -2.433        | -2.751        | -4.585       |
| 20         | DOCK3         | 3          | -2.433        | -2.76         | -4.578       |
| 21         | LINC00877     | 3          | -2.433        | -2.764        | -4.575       |
| 22         | IL17RB        | 3          | -2.433        | -2.788        | -4.556       |
| 23         | VENTXP7       | 3          | -2.433        | -2.798        | -4.549       |
| 24         | SNORD13P3     | 3          | -2.433        | -2.325        | -4.547       |

| 25          | KCTD6        | 3          | -2.433    | -2.886    | -4.484      |
|-------------|--------------|------------|-----------|-----------|-------------|
| 26          | FGD5P1       | 3          | -2.433    | -2.916    | -4.463      |
| 27          | RNU4-78P     | 3          | -2.433    | -2.287    | -4.437      |
| 28          | EIF1B-AS1    | 3          | -2.433    | -2.286    | -4.433      |
| 29          | SEMA3G       | 3          | -2.433    | -2.284    | -4.427      |
| 30          | MITF         | 3          | -2.433    | -2.975    | -4.422      |
| 31          | RP11-804H8.6 | 3          | -2.433    | -2.978    | -4.42       |
| 32          | TMA7         | 3          | -2.433    | -2.278    | -4.412      |
| 33          | C3orf18      | 3          | -2.433    | -3.013    | -4.398      |
| 34          | HACL1        | 3          | -2.433    | -3.021    | -4.392      |
| 35          | PTPRG-AS1    | 3          | -2.433    | -2.271    | -4.39       |
| cSCC vs SES |              |            |           |           |             |
| Rank        | Gene         | Chromosome | Dna score | Rna score | Correlation |
| 1           | EPHA3        | 3          | -2.182    | -2.163    | -4.308      |
| 2           | FAM220A      | 9          | 2.002     | 1.997     | 3.989       |
| 3           | DAPK1        | 9          | 2.002     | 2.024     | 3.981       |
| 4           | MRPL50       | 9          | 2.002     | 2.025     | 3.98        |
| 5           | SNORA9       | 7          | 2.037     | 2.005     | 3.978       |
| 6           | TSTD2        | 9          | 2.002     | 1.993     | 3.978       |
| 7           | NAA35        | 9          | 2.002     | 1.985     | 3.954       |
| 8           | ANP32B       | 9          | 2.002     | 2.053     | 3.953       |
| 9           | BICD2        | 9          | 2.002     | 2.06      | 3.946       |
| 10          | SECISBP2     | 9          | 2.002     | 1.982     | 3.944       |
| 11          | ROR2         | 9          | 2.002     | 2.068     | 3.939       |
| 12          | INVS         | 9          | 2.002     | 2.074     | 3.933       |
| 13          | OSTF1        | 9          | 2.002     | 2.083     | 3.925       |
| 14          | HNRNPK       | 9          | 2.002     | 2.084     | 3.924       |
| 15          | ABHD17B      | 9          | 2.002     | 2.106     | 3.904       |
| 16          | KIF27        | 9          | 2.002     | 2.126     | 3.886       |
| 17          | MIR122       | 18         | -1.932    | -1.932    | -3.863      |
| 18          | SMIM21       | 18         | -1.932    | -1.931    | -3.861      |
| 19          | ZCCHC6       | 9          | 2.002     | 1.954     | 3.86        |
| 20          | MAPRE2       | 18         | -1.932    | -1.93     | -3.857      |

**Supplementary figures**

**(a) cSCC vs AK**

| Categories     | Diseases or Functions Annotation        | p-Value  | Predicted | Activation z | # Molecules |
|----------------|---|----------|-----------|--------------|-------------|
| Cell Death an  | apoptosis                               | 8.41E-14 |           | -0.903       | 94          |
| Cell Death an  | apoptosis of tumor cell lines           | 5.64E-11 |           | -1.248       | 67          |
| Cell Death an  | cell death                              | 3.21E-10 |           | -0.774       | 102         |
| Cell Death an  | necrosis                                | 3.31E-10 |           | -1.348       | 89          |
| Cell Death an  | cell death of tumor cell lines          | 1.25E-08 |           | -1.623       | 73          |
| Cell Death an  | apoptosis of breast cancer cell lines   | 2.54E-08 |           | 0.444        | 24          |
| Cell Death an  | cell death of breast cancer cell lines  | 3.85E-08 |           | 0.626        | 26          |
| Cell Death an  | necrosis of brain cancer cell lines     | 2.48E-07 | Decreased | -2.238       | 15          |
| Cell Death an  | apoptosis of connective tissue cells    | 1.82E-06 |           | -0.161       | 12          |
| Cell Death an  | anokis                                  | 9.32E-06 | Decreased | -2.453       | 9           |
| Cell Death an  | cell death of connective tissue cells   | 1.10E-05 |           | 0.096        | 14          |
| Cell Death an  | apoptosis of stomach cancer cell lines  | 2.28E-05 |           | 0.105        | 7           |
| Cancer, Cell l | cell death of tumor cells               | 2.44E-05 |           | 0.044        | 15          |
| Cell Death an  | apoptosis of prostate cancer cell lines | 3.48E-05 |           | 1.139        | 14          |
| Cell Death an  | fragmentation of DNA                    | 3.69E-05 |           | 0.160        | 10          |
| Cell Death an  | anokis of tumor cell lines              | 4.06E-05 | Decreased | -2.028       | 7           |
| Cell Death an  | cell death of carcinoma cell lines      | 4.40E-05 |           | -1.740       | 16          |
| Cell Death an  | necrosis of prostate cancer cell lines  | 5.07E-05 |           | 0.882        | 15          |
| Cell Death an  | apoptosis of carcinoma cell lines       | 5.12E-05 |           | -1.368       | 14          |
| Cell Death an  | apoptosis of brain cancer cell lines    | 8.17E-05 |           | -1.857       | 10          |
| Cell Death an  | cell death of lung cancer cell lines    | 8.36E-05 |           | -1.526       | 16          |
| Cancer, Cell l | apoptosis of tumor cells                | 1.11E-04 |           | -0.185       | 12          |

| Categories | Diseases or Functions Annotation          | p-Value  | Predicted | Activation z | # Molecules |
|------------|---|----------|-----------|--------------|-------------|
| Cellular N | migration of cells                        | 1.06E-21 | Increased | 4.834        | 86          |
| Cellular N | migration of tumor cell lines             | 4.07E-21 | Increased | 4.709        | 64          |
| Cellular N | cell movement                             | 1.79E-20 | Increased | 5.460        | 90          |
| Cellular N | cell movement of tumor cell lines         | 1.20E-19 | Increased | 5.183        | 68          |
| Cellular N | invasion of cells                         | 1.32E-16 | Increased | 5.534        | 57          |
| Cellular N | invasion of tumor cell lines              | 2.84E-14 | Increased | 5.541        | 50          |
| Cellular N | migration of breast cancer cell lines     | 4.35E-14 | Increased | 3.303        | 29          |
| Cellular N | cell movement of breast cancer cell lines | 5.75E-13 | Increased | 3.636        | 30          |
| Cancer, C  | invasion of tumor cells                   | 1.70E-12 | Increased | 3.274        | 14          |
| Cardiovas  | cell movement of endothelial cells        | 6.61E-10 | Increased | 2.832        | 24          |
| Cardiovas  | migration of endothelial cells            | 2.25E-08 |           | 1.969        | 21          |
| Cellular N | cell movement of keratinocytes            | 2.44E-08 |           | 1.654        | 9           |
| Cellular N | transmigration of mononuclear leuk        | 4.08E-08 | Increased | 2.401        | 9           |
| Cellular N | migration of dermal cells                 | 4.72E-08 |           | 1.342        | 8           |
| Cellular N | transmigration of cells                   | 6.12E-08 |           | 1.552        | 12          |
| Cellular N | cell movement of epithelial cells         | 1.06E-07 |           | 1.992        | 10          |
| Cellular N | transmigration of leukocytes              | 1.27E-07 |           | 1.815        | 10          |
| Cellular N | invasion of breast cancer cell lines      | 4.45E-07 | Increased | 3.997        | 19          |
| Cellular N | migration of keratinocytes                | 5.27E-07 |           | 1.000        | 7           |
| Cellular N | homing of breast cancer cell lines        | 5.87E-07 |           | 1.300        | 6           |
| Cancer, C  | invasion of cancer cells                  | 1.19E-06 | Increased | 2.286        | 7           |
| Cellular N | migration of leukemia cell lines          | 2.70E-06 |           | 0.465        | 10          |
| Cellular N | cell movement of leukemia cell line       | 3.05E-06 |           | 0.369        | 12          |

**(b) AK vs SES**

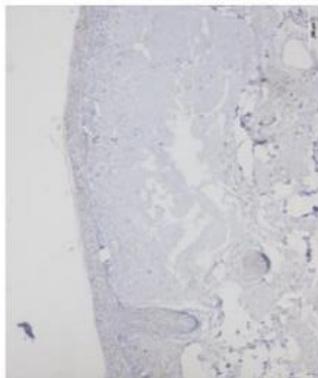
| Categories | Diseases or Functions Annotation      | p-Value  | Predicted | Active | Notes | Molecules |
|------------|---------------------------------------|----------|-----------|--------|-------|-----------|
| Cells      | cell movement of granulocytes         | 1.43E-11 | Increased | 3.152  | bias  | 14        |
| Cells      | cell movement of phagocytes           | 5.41E-11 | Increased | 3.795  | bias  | 16        |
| Cells      | cell movement of myeloid cells        | 6.54E-11 | Increased | 3.560  | bias  | 16        |
| Cells      | cell movement of leukocytes           | 3.44E-10 | Increased | 3.477  | bias  | 18        |
| Cells      | cell movement                         | 1.49E-09 | Increased | 3.376  | bias  | 37        |
| Cells      | chemotaxis                            | 1.65E-09 | Increased | 3.677  | bias  | 18        |
| Cells      | migration of cells                    | 3.11E-09 | Increased | 3.362  | bias  | 34        |
| Cells      | chemotaxis of phagocytes              | 7.14E-09 | Increased | 3.360  | bias  | 12        |
| Cells      | cell movement of mononuclear leuko    | 8.39E-09 | Increased | 3.104  | bias  | 14        |
| Cells      | chemotaxis of myeloid cells           | 1.27E-08 | Increased | 3.382  | bias  | 12        |
| Cells      | cell movement of neutrophils          | 1.84E-08 | Increased | 3.076  | bias  | 10        |
| Cells      | chemotaxis of cells                   | 3.74E-08 | Increased | 3.677  | bias  | 16        |
| Cells      | chemotaxis of monocytes               | 1.23E-07 | Increased | 2.769  | bias  | 8         |
| Cells      | migration of mononuclear leukocyte    | 2.07E-07 | Increased | 2.402  | bias  | 11        |
| Cells      | chemotaxis of granulocytes            | 2.42E-07 | Increased | 2.934  | bias  | 9         |
| Cells      | cell movement of monocytes            | 2.82E-07 | Increased | 2.769  | bias  | 9         |
| Cells      | Lymphocyte migration                  | 2.83E-07 | Increased | 2.402  | bias  | 10        |
| Cells      | chemotaxis of mononuclear leukocyt    | 1.27E-06 | Increased | 2.947  | bias  | 9         |
| Cells      | chemotaxis of T lymphocytes           | 6.38E-06 | Increased | 1.960  | bias  | 6         |
| Cells      | migration of breast cancer cell lines | 6.94E-06 | Increased | 2.453  | bias  | 11        |
| Cells      | cell movement of T lymphocytes        | 9.02E-06 | Increased | 2.195  | bias  | 7         |
| Cells      | cell movement of tumor cell lines     | 1.15E-05 | Increased | 2.493  | bias  | 22        |
| Cells      | cell movement of embryonic cell line  | 1.56E-05 | Increased | 1.181  | bias  | 7         |
| Cells      | cell movement of peripheral blood le  | 2.19E-05 | Increased | 2.219  | bias  | 5         |
| Cells      | migration of leukocyte cell lines     | 2.46E-05 | Increased | 2.000  | bias  | 4         |
| Cells      | cell rolling of blood cells           | 2.96E-05 | Increased | 2.675  | bias  | 4         |
| Cells      | migration of tumor cell lines         | 3.16E-05 | Increased | 2.675  | bias  | 19        |

**Supplementary figure 1.** Results of the Ingenuity Pathway Analysis showing upregulated (orange) and downregulated (blue) biological functions between cSCC and AK **(a)** and between AK and SES **(b)**.

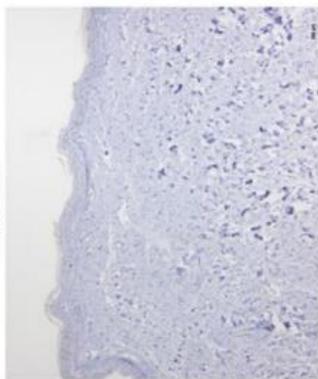
**Supplementary figure 2.** Immunohistochemistry panel showing the results of FOSL1, BNC1 and NEK10 in entire tissue samples (FOSL1) and TMAs (BNC1 and NEK10) of SES, AK and cSCC.

(a) FOSL1 SES (x40)

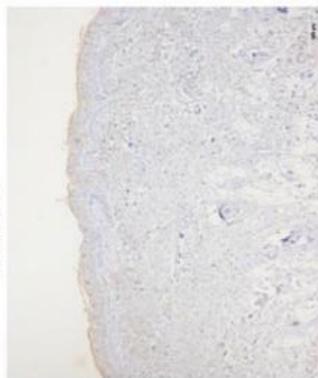
SES226



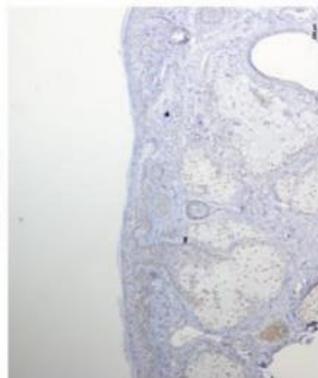
SES228



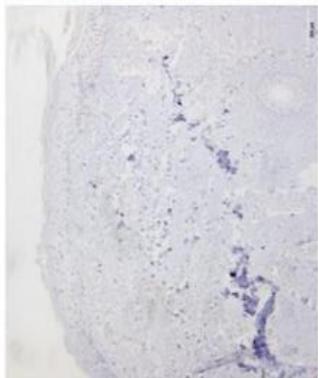
SES229



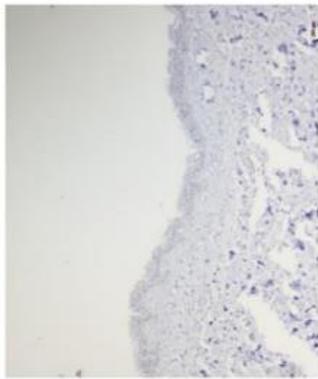
SES230



SES233



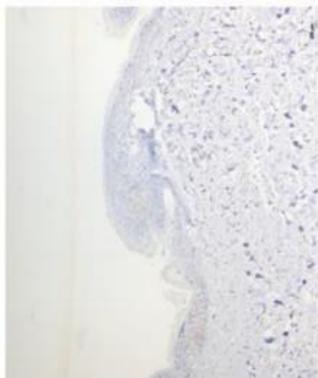
SES234



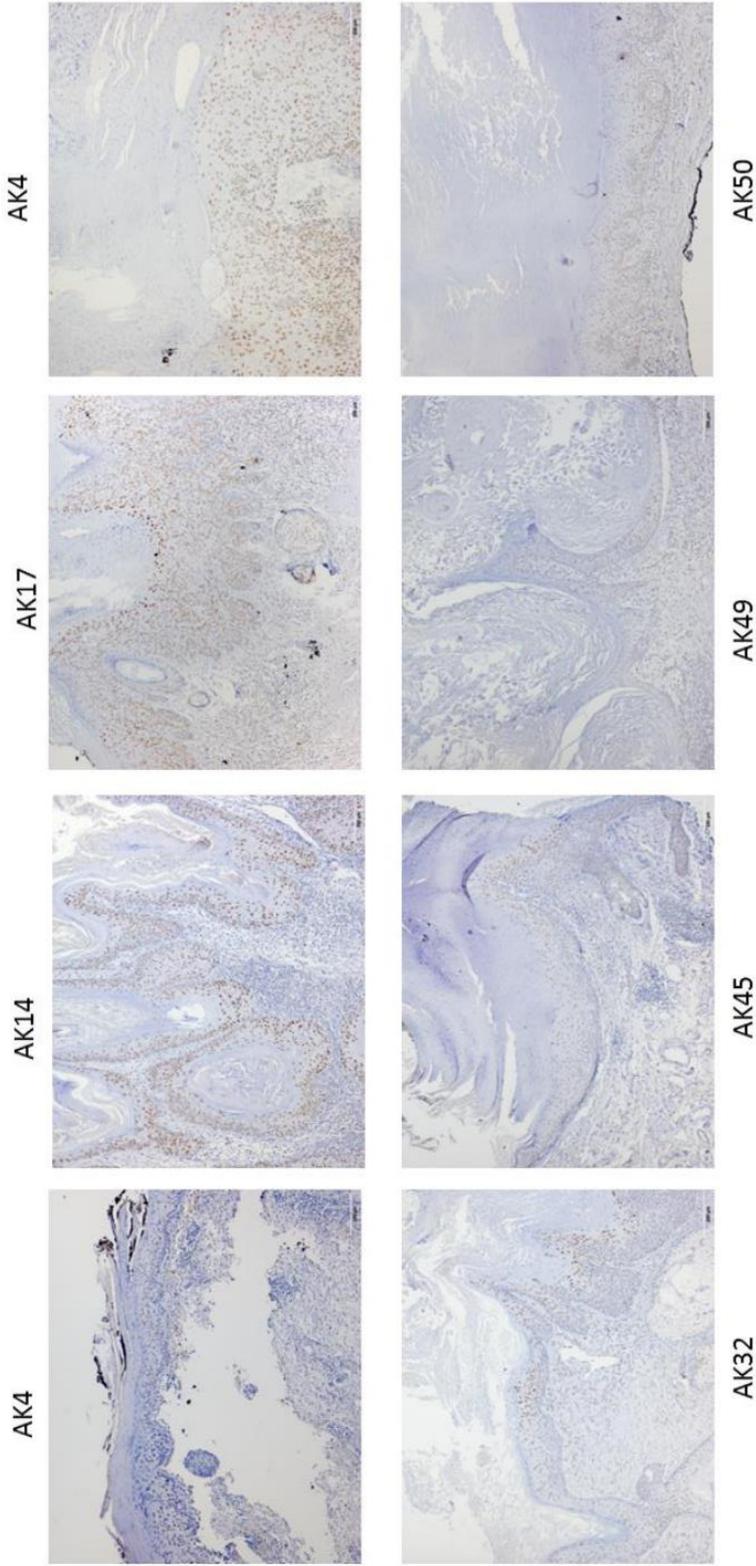
SES236

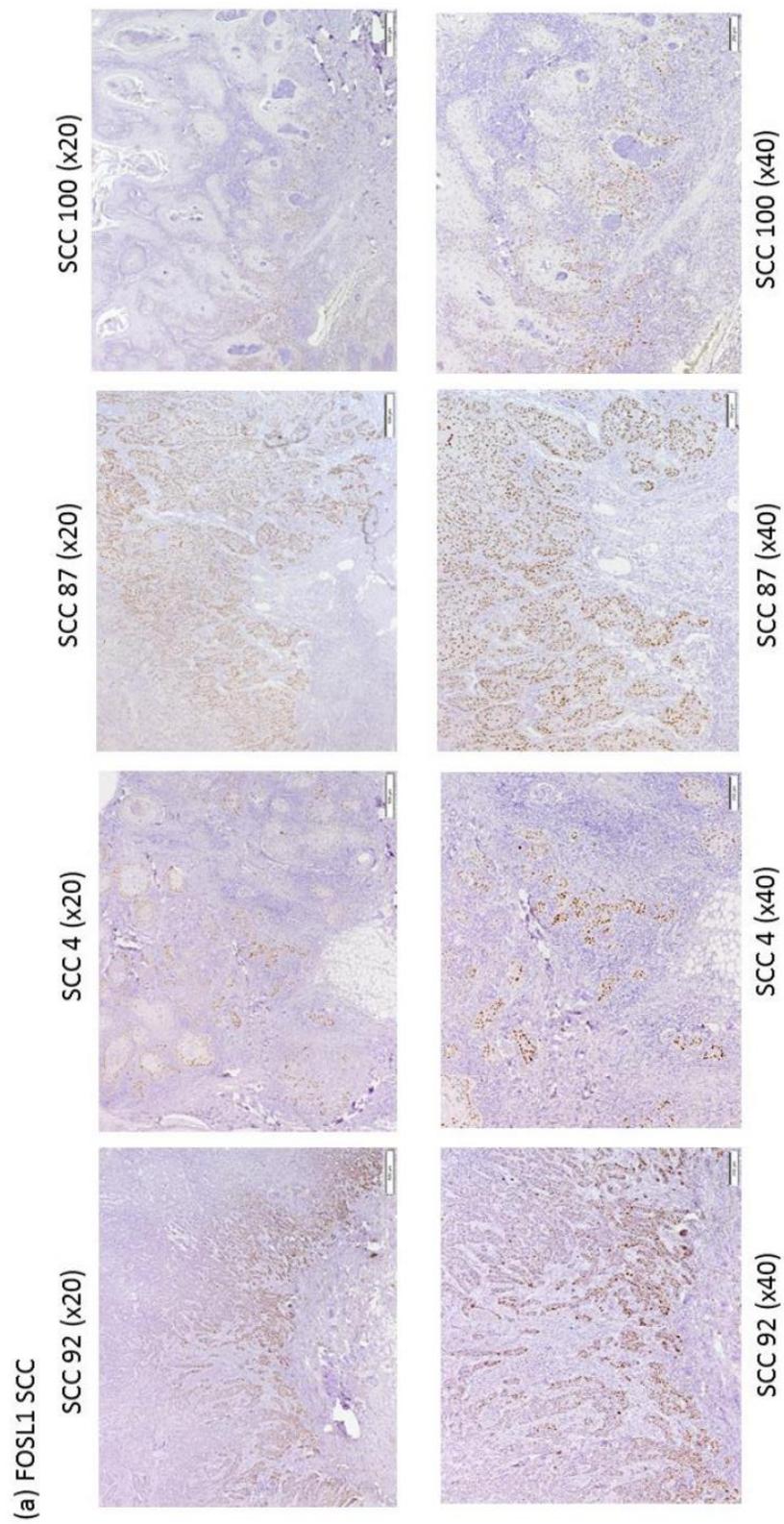


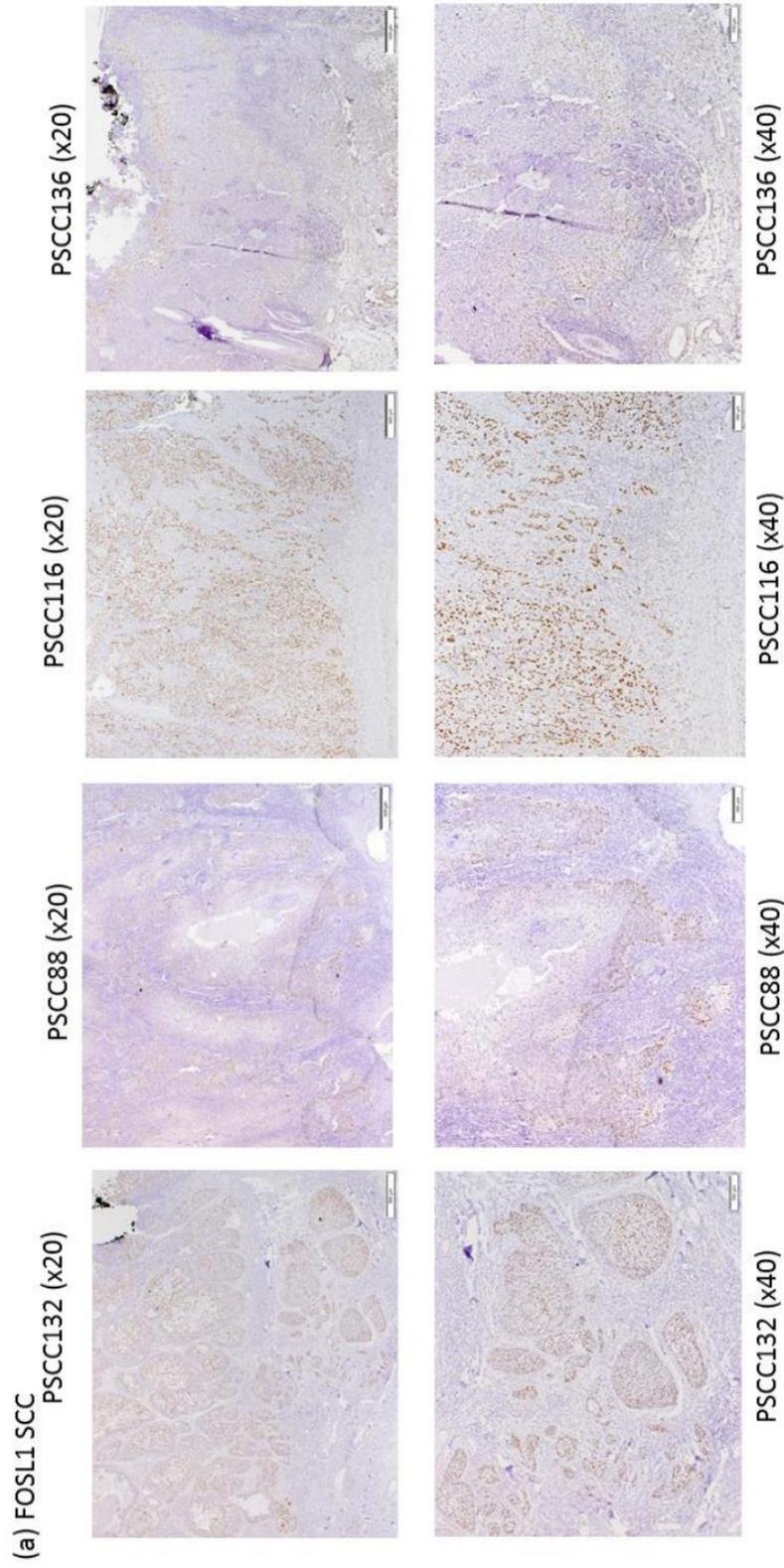
SES238



(a) FOSL1 AK (x40)

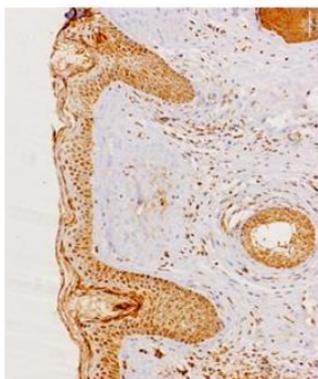




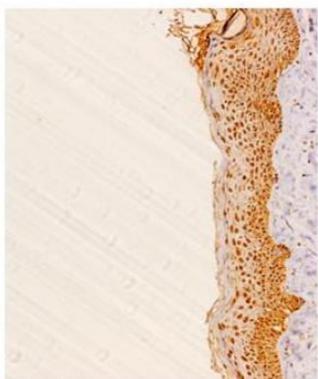


(b) BNC1 SES (x100)

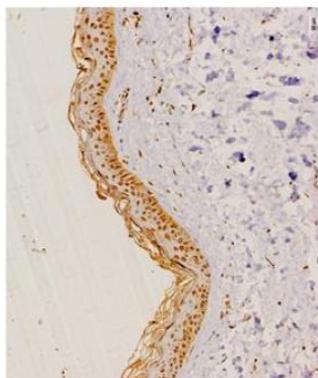
SES229



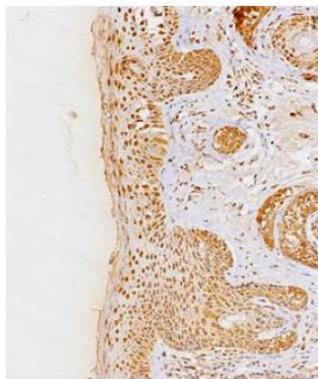
SES230



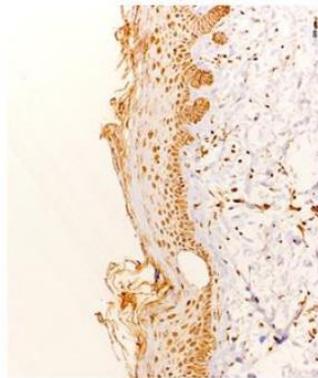
SES237



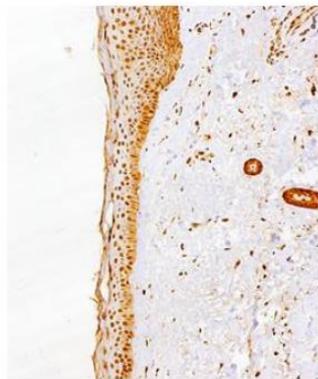
SES226



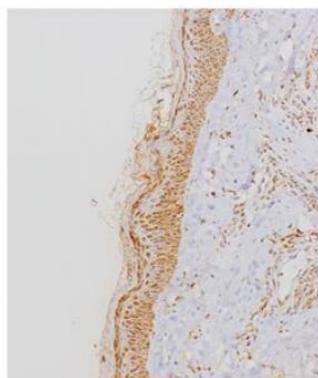
SES225



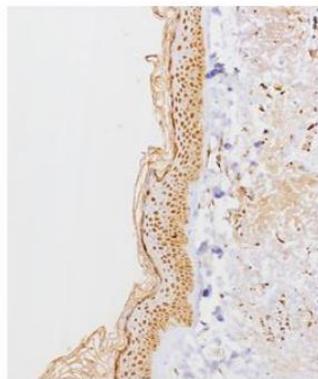
SES227



SES234

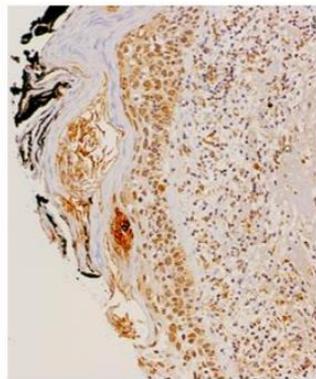


SES231

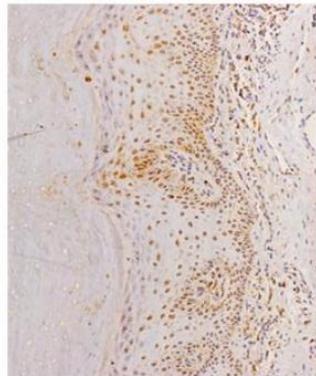


(b) BNC1 AK (100x)

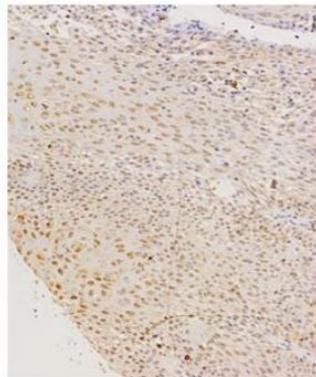
AK13



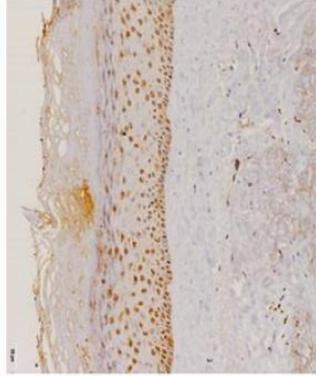
AK50



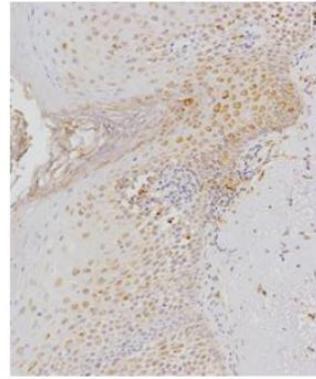
AK4



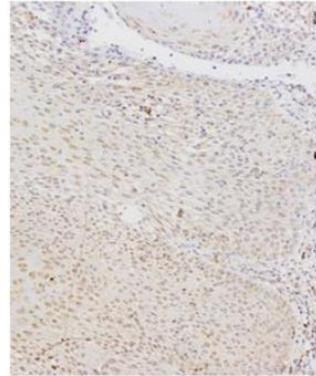
AK48



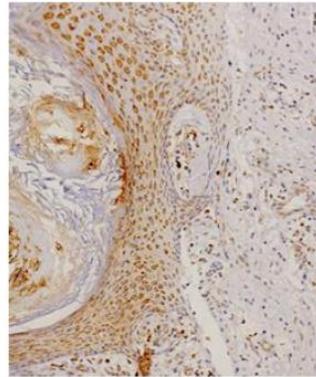
AK3



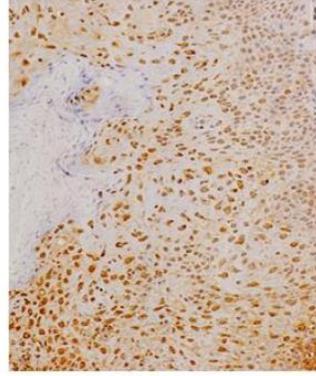
AK7



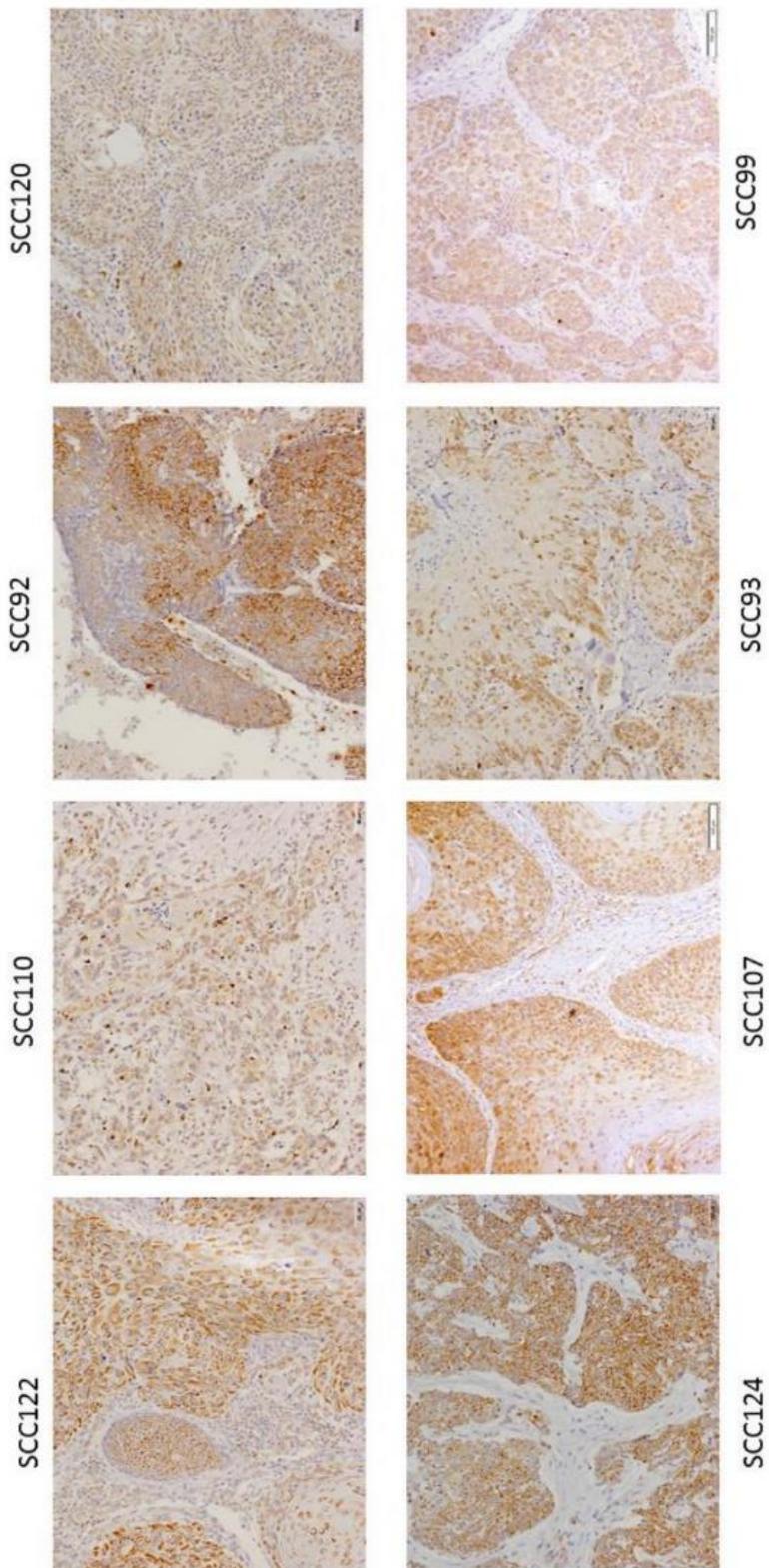
AK49



AK47

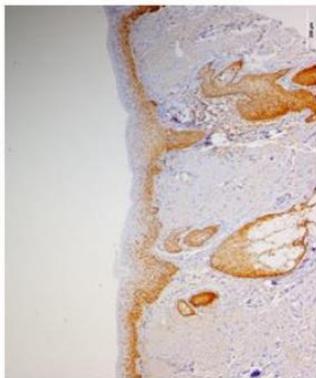


(b) BNC1 SCC (x100)

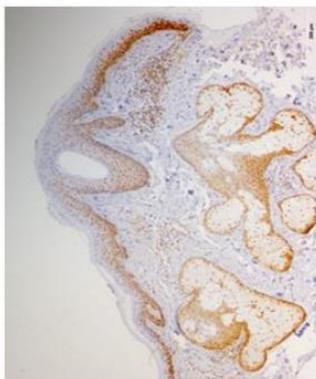


(c) NEK10 SES (x40)

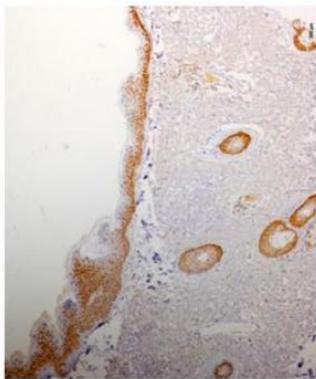
SES232



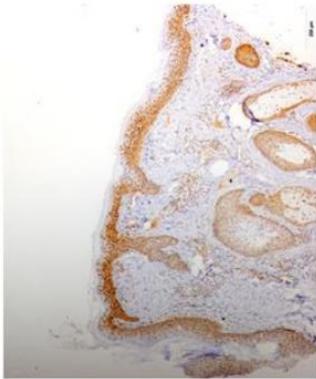
SES231



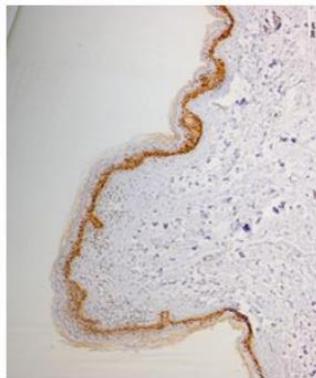
SES28



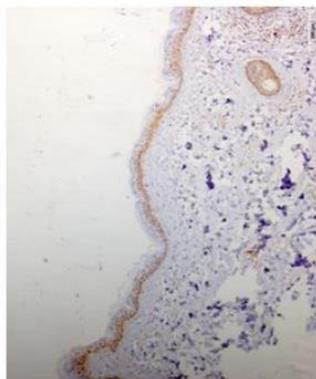
SES234



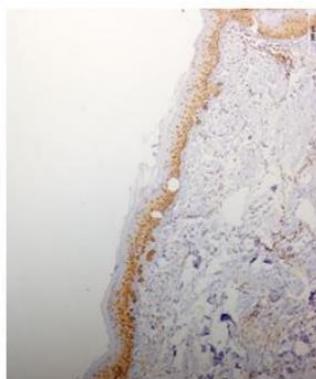
SES238



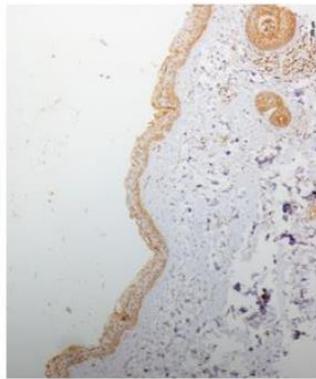
SES227



SES225



SES237



(c) NEK10 AK (x40)

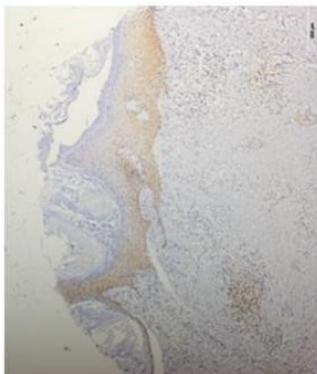
AK14



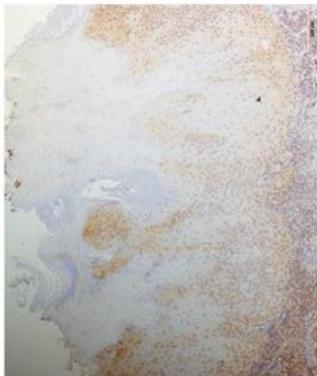
AK50



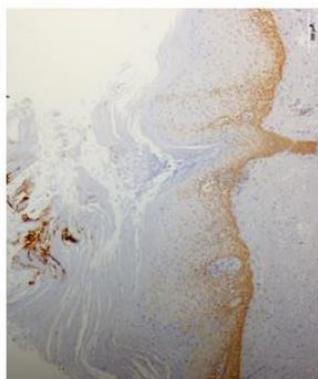
AK49



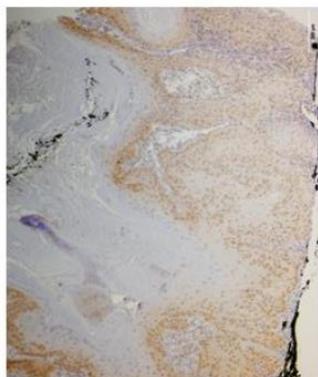
AK47



AK49



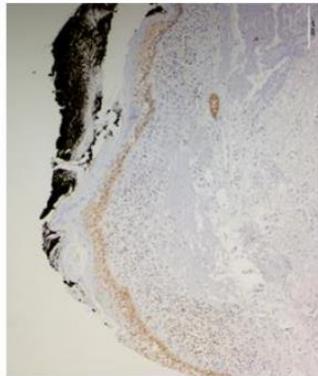
AK8



AK7



AK13



(c) NEK10 SCC (x40)

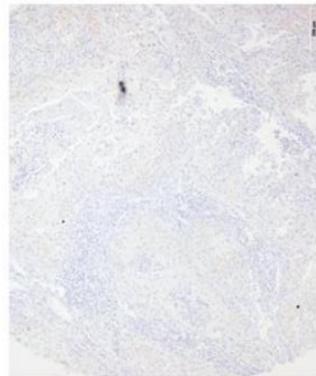
SCC99



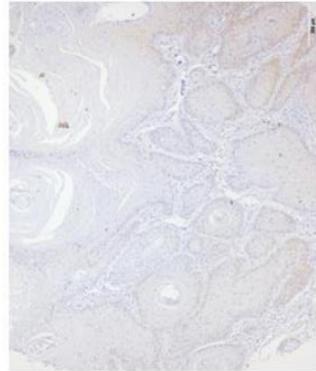
SCC106



SCC93



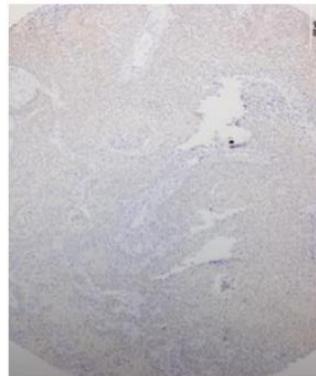
SCC125



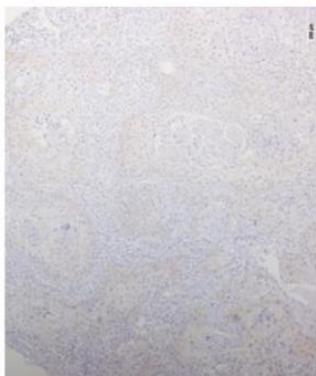
SCC124



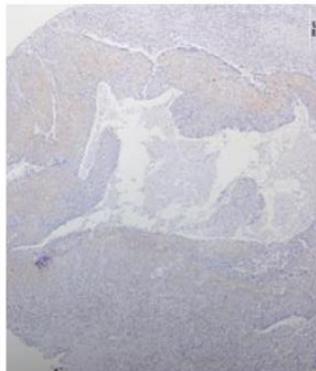
SCC92



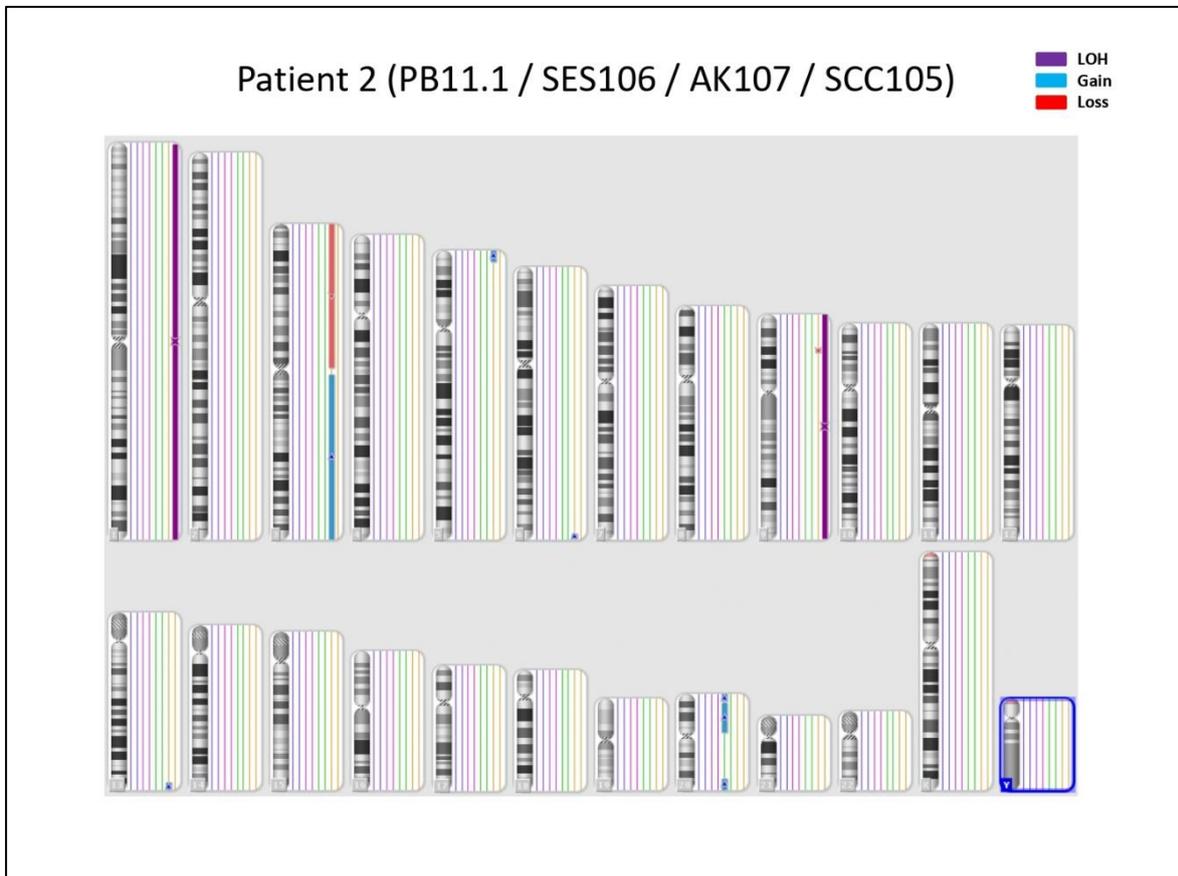
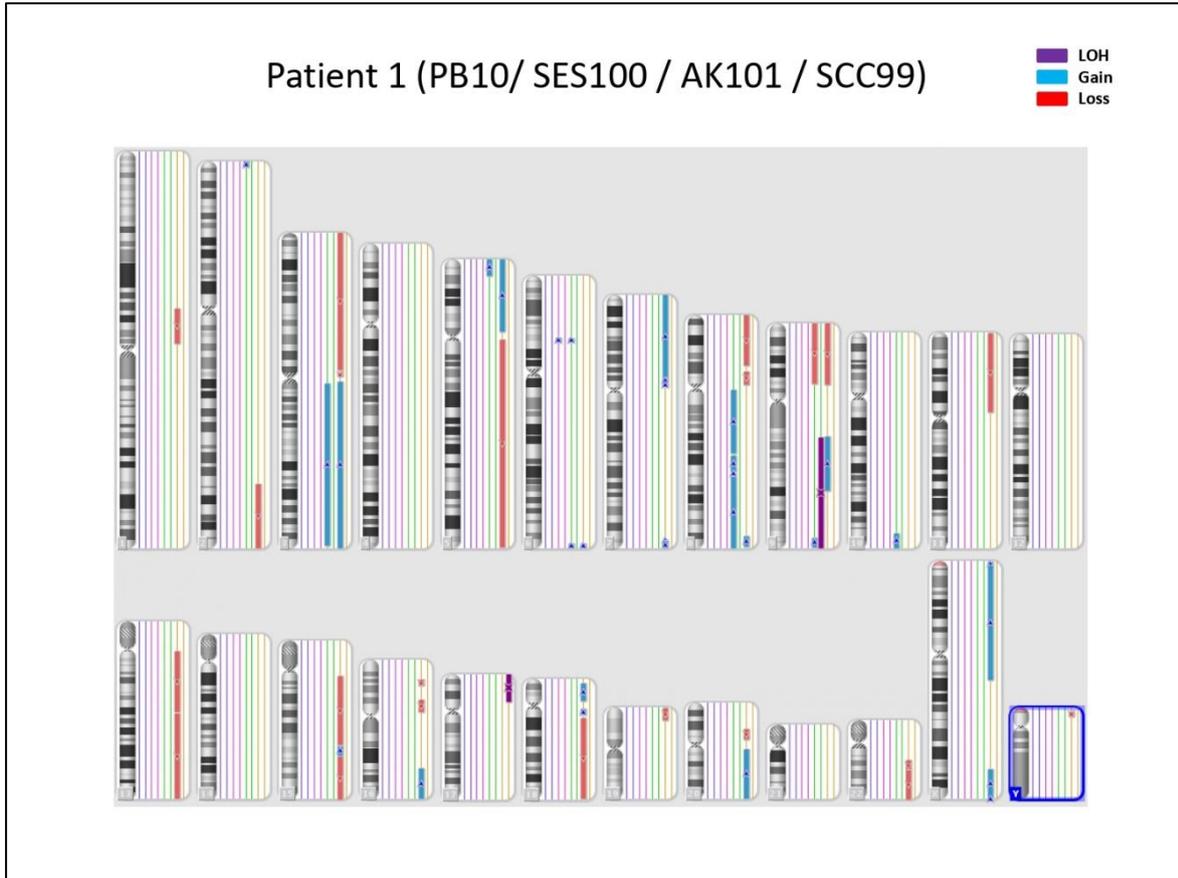
SCC122



SCC96

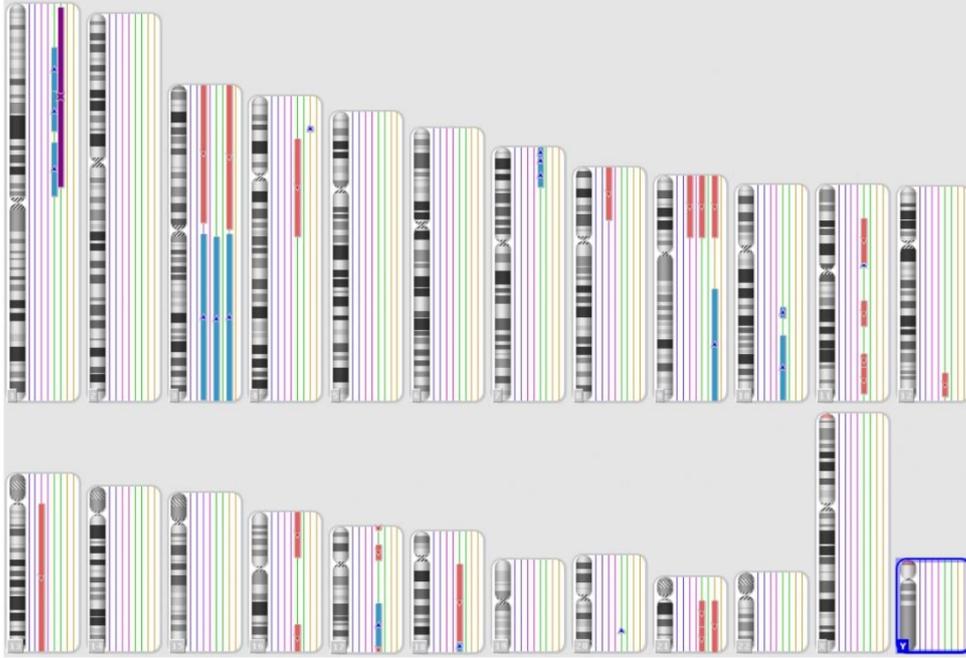


**Supplementary material figure 3.** Graphical overview of chromosomal aberrations in peripheral blood (PB) (blue), SES (pink), AK (green) and SCC (orange) from the 10 patients included in the study. LOH events are shown to the right of the chromosome in purple, gains are shown in blue and losses in red.



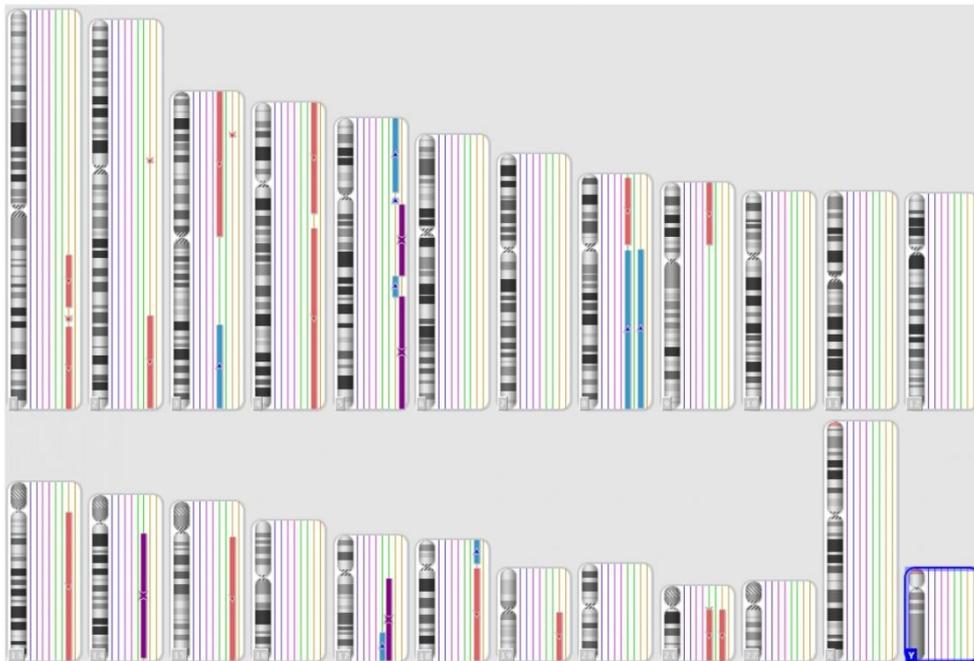
Paciente 3 (PB15 / SES115 / AK116 / SCC114)

LOH  
Gain  
Loss



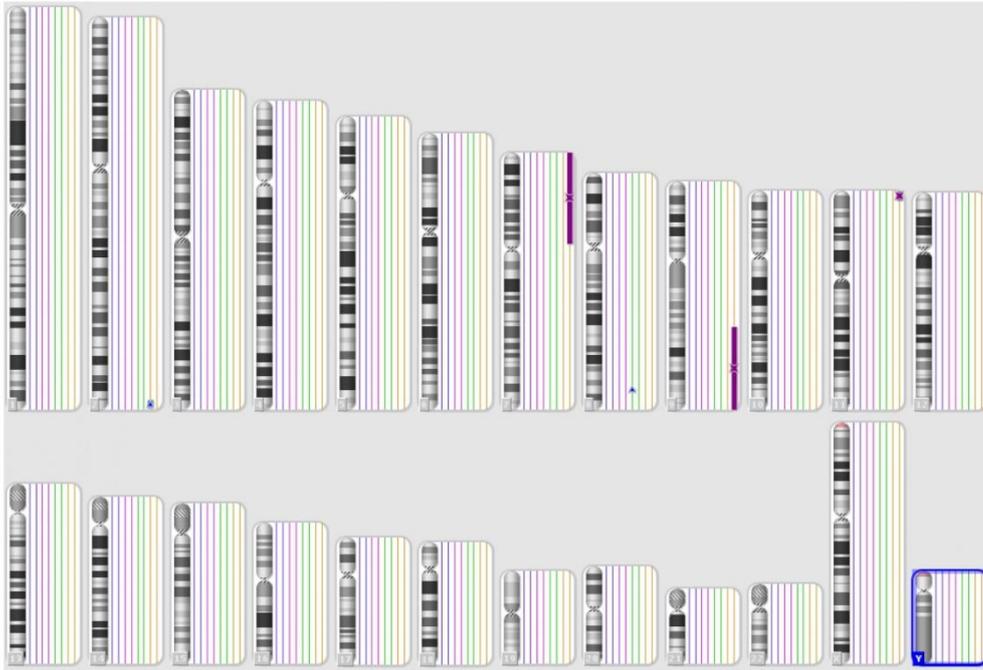
Patient 4 (PB24 / SES146 / AK148 / SCC145)

LOH  
Gain  
Loss



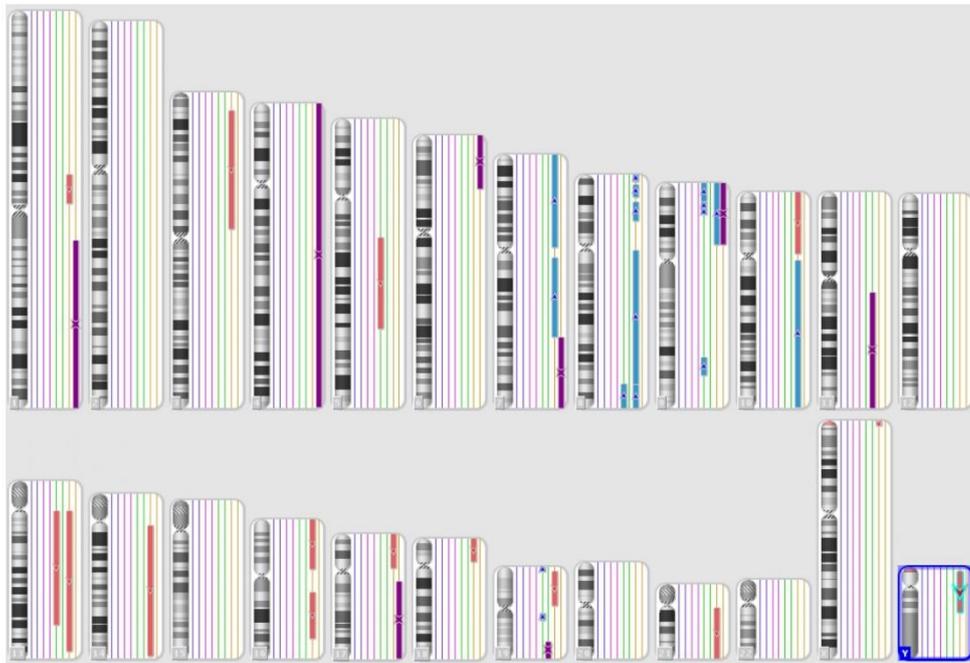
Patient 5 (PB18 / SES125 / AK126 / SCC124)

LOH  
Gain  
Loss



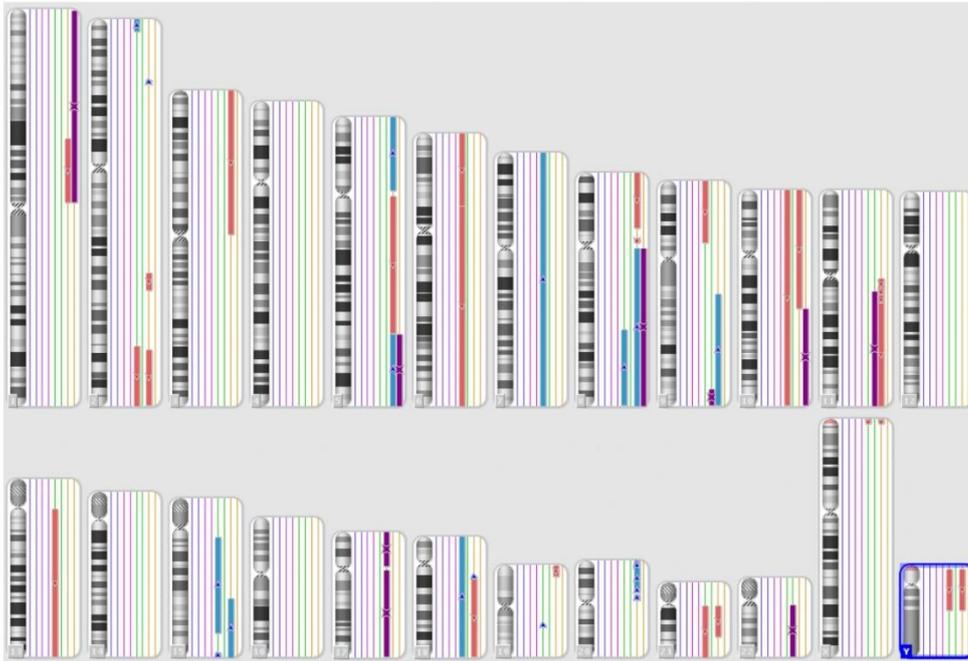
Patient 6 (PB25 / SES150 / AK151 / SCC149)

LOH  
Gain  
Loss



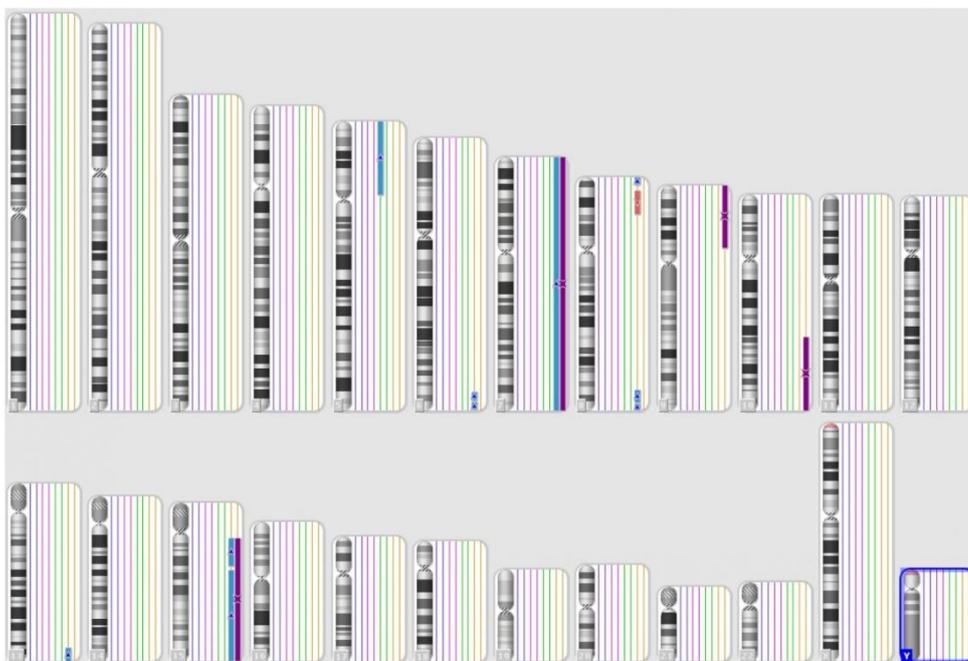
Patient 7 (PB27 / SES162 / AK163 / SCC161)

LOH  
Gain  
Loss



Patient 8 (PB / SES182 / AK183 / SCC181)

LOH  
Gain  
Loss



Patient 9 (PB/ SES191 / AK190 / SCC189)

LOH  
Gain  
Loss



Patient 10 (PB5 / SES79 / AK81 / SCC78)

LOH  
Gain  
Loss

