



Universitat de Lleida

Carcinomes de queratinòcits: aspectes epidemiològics a Catalunya i caracterització proteica del seu fluid intersticial tumoral

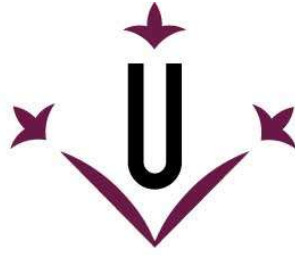
Clara Matas Nadal

<http://hdl.handle.net/10803/672236>

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

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

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



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

Carcinomes de queratinòcits: aspectes epidemiològics a Catalunya i caracterització proteica del seu fluid intersticial tumoral

Clara Matas Nadal

Memòria presentada per optar al grau de Doctora per la Universitat de Lleida
Programa de Doctorat en Salut

Directors
Rafael Aguayo Ortiz
Eloi Garí Marsol

Tutor
Eloi Garí Marsol

2021

Índex

Abreviatures.....	4
Resum.....	6
<i>Resumen</i>	7
<i>Abstract</i>	8
Introducció.....	9
- Carcinomes de queratinòcits.....	10
- Carcinoma basocel·lular.....	10
- Carcinoma escatós.....	12
- Factors de risc per als carcinomes de queratinòcits.....	13
- Factors associats a pitjor pronòstic en els carcinomes de queratinòcits.....	13
- Importància del carcinoma de queratinòcits.....	14
- Estudi proteòmic del fluid intersticial tumoral	14
Hipòtesis.....	16
Objectius.....	18
Resultats i discussió.....	20
Capítol I: Epidemiologia, tendències epidemiològiques i factors de risc pel CBC	21
- Introducció.....	22
- Material i mètodes.....	22
Recollida de dades de CBCs.....	22
Estudi de casos i controls sobre els factors de risc pel CBC en pacients joves.....	22
Distribució dels factors de risc pel càncer de pell entre la població general.....	24
Anàlisi estadística.....	24
- Resultats.....	24
Epidemiologia descriptiva dels CBCs diagnosticats l'any 2017 a Lleida.....	24
Diferències entre els CBCs diagnosticats en pacients ≤ 45 vs. ≥ 75 anys a Lleida.....	26
Estudi de casos i controls sobre els factors de risc en pacients joves de Lleida.....	27
Distribució dels FR per al càncer de pell entre la població general de Catalunya.....	32
- Discussió	37
Capítol II: Comparació dels diferents mètodes d'extracció de fluid intersticial tumoral per a l'anàlisi proteòmica en mostres de càncer cutani no melanoma	40
- Introducció.....	41
- Material i mètodes.....	41
Obtenció de les mostres.....	41
Mètodes per a obtenir TIF descrits en la literatura.....	42
Anàlisi proteòmica de les mostres de TIF.....	44
Anàlisi de les dades proteòmiques.....	45
- Resultats de les comparacions i discussió.....	46
TIF obtingut per centrifugació.....	46

Comparacions entre els proteomes generats per elució i per centrifugació	49
Capítol III: Caracterització del TIF dels carcinomes de queratinòcits	54
- Introducció.....	55
Fisiopatologia del CBC.....	55
Fisiopatologia del CEC.....	56
Microambient tumoral en el CQ.....	58
- Material i mètodes.....	59
Estudi proteòmic del TIF de mostres de CBC, CEC i pell sana.....	59
Anàlisi bioinformàtica.....	59
Immunohistoquímica.....	59
Immunoblot.....	60
Anàlisi estadística.....	60
- Resultats.....	60
Comparació de les proteïnes obtingudes del TIF de CQ vs. pell sana	60
Comparació de les proteïnes obtingudes del TIF de CEC vs. CBC.....	64
Selecció de les proteïnes candidates.....	70
Caracterització de l'expressió i la localització de les proteïnes candidates.....	70
Caracterització de l'expressió i la localització de les proteïnes candidates relacionades amb la resposta immunològica.....	72
Cromogranina A.....	73
PNP.....	74
FABP5.....	76
Caracterització de l'expressió i la localització de les proteïnes candidates relacionades amb el citoesquelet.....	80
Estratafina.....	80
Ladinina 1.....	84
Cornulina.....	87
- Discussió.....	93
Estudi proteòmic del TIF i selecció de les proteïnes candidates	93
Estudi mitjançant IHQ de l'expressió en el teixit de les proteïnes candidates.....	93
Proteïnes candidates relacionades amb la resposta immunològica.....	93
Cromogranina A.....	93
PNP.....	94
FABP5.....	94
Proteïnes candidates relacionades amb el citoesquelet.....	96
Estratafina.....	96
Ladinina 1.....	97
Cornulina.....	98
Conclusions.....	100
Futur de la línia d'investigació.....	103
Referències.....	105
Annexes.....	114

Abreviatures

ABC. Bicarbonat amònic
AG. Àcids grassos
AP. Antecedents personals
CALML5. *Calmodulin-like 5*
CBC. Carcinoma basocel·lular
CCNM. Càncer cutani no melanoma
CCP. Coeficient de correlació de Pearson
CEC. Carcinoma escatós
CEA. Antigen carcinoembrionari
Chga. Cromogranina A
CK7. Citoqueratina 7
CQ. Carcinoma de queratinòcits
CRNN. Cornulina
DALYs. *Disability-adjusted life years*
DDA. Adquisició dades dependent
DE. Desviació estàndard
DTT. *Dithiothreitol*
FABP5. *Fatty acid binding protein 5*
FDR. Rati de falses descobertes
FP. Fol·licle pilós
FR. Factors de risc
G. Força de centrifugació
GLI. Factors de transcripció GLI
GO. Ontologia gènica o *Gene ontology*
HUAV. Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida
HMW. *High molecular weight*
IAA. Iodoacetamida
IC. Interval de confiança
IHQ. Immunohistoquímica
INF- β . Interferó β
IS. Immunosupressió
LAD1. Ladinina 1
LC-MS/MS. *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry*
LMW. *Low molecular weight*
MM. Melanoma
M1. Metàstasi
NK. Limfòcits natural killer
NS. *Normal skin*
OR. *Odds Ratios*
PAS. *Periodic acid-schiff*
PBS. Buffer fosfat salí
PCA. *Principal component analysis*
PKC. Proteïna quinasa C
PNP. *Proteïna purine nucleoside phosphorylase*
PSMs. Monitorització de síntesi de proteïnes
PAGE. *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
PTCH. Receptors transmembrana *patched*
SDS-PAGE. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SFN. Estratafina
Shh. Via Sonic *hedgehog*
SMO. Proteïna *smoothened*
ST. *Standard*
TEM. Transició epiteli-mesènquima
TIF. Fluid intersticial tumoral
UV. Ultraviolada, UVA. Ultraviolada A, UVB. Ultraviolada B

Resum, *resumen*, *abstract*

Resum

Introducció: Els carcinomes de queratinòcits (CQ) són la neoplàsia maligna més freqüent a nivell mundial en poblacions caucàsiques. En conjunt, suposen un enorme problema de salut, tant en termes de morbiditat com de despesa sanitària. En les darreres dècades, la seva incidència ha augmentat de manera significativa. A més a més, pel que fa al carcinoma basocel·lular (CBC), han augmentat dramàticament els casos entre la gent jove, sobretot dones. Els CQ tenen, en general, un bon pronòstic. Malgrat això, el CBC pot créixer localment destruint els teixits circumdants i causant importants seqüeles funcionals i estètiques, i el carcinoma escatós (CEC) és moderadament invasiu i es pot associar a un risc substancial de recurrències locals, metastasis i mort (1.5-4 %). La fisiopatologia dels CQ és dependent de l'alteració de diverses vies de transducció de senyals i de control de la proliferació. Un dels efectes d'aquestes alteracions és la secreció de noves proteïnes a l'espai extracel·lular, que caracteritzaran el microambient tumoral. Les proteïnes i metabòlits senyalitzadors presents en el fluid intersticial que envolta el tumor (TIF) han estat estudiats en alguns tipus tumorals, però no hi ha res descrit pel que fa als CQ. **Objectius:** Aquesta tesi té dos objectius principals: 1) Estudi epidemiològic i de factors de risc del CBC a Catalunya (Capítol I), i 2) Caracteritzar el perfil proteòmic del TIF en els CQ i les implicacions en la seva fisiopatologia (Capítols II i III). **Resultats i conclusions:** En l'estudi epidemiològic hem observat que entre els < 60 anys el CBC ja és un tumor que té una incidència major en dones que en homes. Els factors de risc independents pel CBC en gent jove són el fototipus cutani, la història familiar de CQ, i la presència de ≥ 4 cremades a la infància. A més a més, la presència de repetides cremades a la infància és superior entre els casos de CBC en gent jove localitzats en zones cobertes que entre els localitzats en zones fotoexposades. De tots els factors de risc, entre la població general, l'ús de cabines de bronzejat és l'únic que és més freqüent entre les dones que entre els homes; per tant, la popularització del seu ús podria ser la causa de la tendència a la predominança femenina del CBC. En la segona part de la tesi, primer s'ha posat a punt el mètode d'aïllament de TIF. La centrifugació a 10 000 g permet obtenir una quantitat superior de proteïnes extracel·lulars, major sensibilitat i un maneig més ràpid i fàcil de les mostres, sense implicar un augment de la lisi cel·lular respecte als altres mètodes. Per aquests motius, la proposem com a mètode d'elecció en les mostres de tumors cutanis. L'anàlisi proteòmica mostra que el CBC, el CEC i la pell sana tenen cadascun un perfil específic de proteïnes secretades al seu TIF i suggereix l'existència d'una diferent resposta immunològica de l'organisme en front al CBC i al CEC. Hem determinat que la secreció de les proteïnes PNP, FABP5, SFN i LAD1 és un perfil propi del CEC, i que estan relacionades amb l'agressivitat tumoral i podrien ser dianes terapèutiques per al seu tractament. A més a més, el patró d'expressió de FABP5 permet distingir les zones diferenciades de les invasives en el CEC. També existeix una diferent localització cel·lular de l'SFN i la LAD1 en la pell sana vs. CEC, que podria estar relacionada amb el desenvolupament tumoral. Finalment, la secreció de cornulina és un marcador de CBC i tendeix a associar-se amb els subtipus més agressius.

Resumen

Introducción: Los carcinomas de queratinocitos (CQ) son la neoplasia maligna más frecuente a nivel mundial en poblaciones caucásicas. En conjunto, suponen un enorme problema de salud, tanto en términos de morbilidad como de gasto sanitario. En las últimas décadas, su incidencia ha aumentado de manera significativa. Además, en el carcinoma basocelular (CBC), han aumentado dramáticamente los casos entre la gente joven, sobre todo mujeres. Los CQ tienen, en general, un buen pronóstico. A pesar de ello, el CBC puede crecer localmente destruyendo los tejidos circundantes y causar importantes secuelas funcionales y estéticas, y el carcinoma escamoso (CEC) es moderadamente invasivo y se puede asociar a un riesgo sustancial de recurrencias locales, metástasis y muerte (1.5-4 %). La fisiopatología de los CQ es dependiente de la alteración de varias vías de transducción de señales y de control de la proliferación. Uno de los efectos de estas alteraciones es la secreción de nuevas proteínas en el espacio extracelular, que caracterizarán el microambiente tumoral. Las proteínas y metabolitos señalizadores presentes en el fluido intersticial que rodea el tumor (TIF) han sido estudiados en algunos tipos tumorales, pero no hay nada descrito en cuanto a CQ. **Objetivos:** Esta tesis tiene dos objetivos principales: 1) Estudio epidemiológico y de factores de riesgo del CBC en Cataluña (Capítulo I), y 2) Caracterizar el perfil proteómico del TIF en los CQ y las implicaciones en su fisiopatología (Capítulos II y III). **Resultados y conclusiones:** En el estudio epidemiológico se ha observado que entre los < 60 años el CBC ya es un tumor que tiene una incidencia mayor en mujeres que en hombres. Los factores de riesgo independientes para el CBC en gente joven son el fototipo cutáneo, la historia familiar de CQ, y la presencia de ≥ 4 quemaduras en la infancia. Además, la presencia de repetidas quemaduras en la infancia es superior entre los casos de CBC en gente joven localizados en zonas cubiertas que entre los localizados en zonas fotoexpuestas. De todos los factores de riesgo, en la población general, el uso de cabinas de bronceado es el único que es más frecuente entre las mujeres que entre los hombres; por lo tanto, la popularización de su uso podría ser la causa de la tendencia a la predominancia femenina del CBC. En la segunda parte de la tesis, primero se ha puesto a punto el método de aislamiento de TIF. La centrifugación a 10 000 g permite obtener una cantidad superior de proteínas extracelulares, mayor sensibilidad y un manejo más rápido y fácil de las muestras, sin implicar un aumento de la lisis celular respecto a los otros métodos. Por estos motivos, la proponemos como método de elección en las muestras de tumores cutáneos. El análisis proteómico muestra que el CBC, el CEC y la piel sana tienen cada uno un perfil específico de proteínas secretadas en su TIF y sugiere la existencia de una diferente respuesta inmunológica del organismo frente al CBC y al CEC. Hemos determinado que la secreción de las proteínas PNP, FABP5, SFN y LAD1 es un perfil propio del CEC, y que están relacionadas con la agresividad tumoral y podrían ser dianas terapéuticas para su tratamiento. Además, el patrón de expresión de FABP5 permite distinguir las zonas diferenciadas de las invasivas en el CEC. También existe una diferente localización celular de la SFN y la LAD1 en la piel sana vs. CEC, que podría estar relacionada con el desarrollo tumoral. Finalmente, la secreción de cornulina es un marcador de CBC y muestra tendencia a asociarse con los subtipos más agresivos.

Abstract

Introduction: Keratinocyte carcinomas (KC) are the most frequent malignancy in Caucasian populations worldwide. Altogether, they entail a huge health problem, both in terms of morbidity and health costs. In recent decades, their incidence has increased significantly. Moreover, basal cell carcinoma (BCC) cases have increased dramatically among young people, especially women. KC generally have a good prognosis. Despite this, BCC can grow locally, destroying surrounding tissues and causing important functional and aesthetic sequelae; and squamous cell carcinoma (SCC) is moderately invasive and can be associated with a substantial risk of local recurrences, metastasis, and death (1.5- 4 %). The physiopathology of KC depends on the alteration of several signal transduction pathways and proliferation control. One effect of these alterations is the secretion of new proteins in the extracellular space, which will characterize the tumor microenvironment. The signaling proteins and metabolites present in the interstitial fluid surrounding the tumor (TIF) have been studied in some tumor types, but nothing has been described in terms of KC. **Objectives:** This thesis has two main objectives: 1) Epidemiological and risk factors study of BCC in Catalonia (Chapter I), and 2) Characterization of the proteomic profile of TIF in KC and the implications in their physiopathology (Chapters II and III). **Results and conclusions:** In the epidemiological study, it has been revealed that, among those <60 years, BCC is already a tumor that has a higher incidence in women than in men. Independent risk factors for BCC in young people are skin phototype, family history of KC, and the presence of ≥ 4 sunburns in childhood. In addition, the presence of repeated sunburns in childhood is higher among BCC cases in young people in covered areas than among those in photo-exposed areas. Of all the risk factors, among the general population, the use of tanning beds is the only one that is more common among women than among men; therefore, the popularization of their use could be the crucial factor for the trend towards the female predominance of BCC. In the second part of the thesis, the TIF isolation method has been first developed. Centrifugation at 10 000 g allows obtaining a higher amount of extracellular proteins, greater sensitivity, and faster and easier handling of the samples, without increasing cell lysis when compared to other methods. For these reasons, we propose it as the method of choice in samples of skin tumors. The proteomic analysis shows that BCC, SCC, and healthy skin each have a specific profile of secreted proteins in their TIF, and suggests the existence of a different immune response of the organism against BCC and SCC. We have determined that the secretion of PNP, FABP5, SFN, and LAD1 proteins is a specific SCC profile, and that they are related to tumor aggressiveness and could be therapeutic targets for its treatment. Furthermore, the expression pattern of FABP5 makes it possible to distinguish differentiated from invasive areas in SCC. There is also a different cellular location of SFN and LAD1 expression in healthy skin vs. SCC, which could be related to tumor development. Finally, cornulin secretion is a BCC marker and tends to associate with the most aggressive subtypes.

Introducció

Introducció

Carcinomes de queratinòcits

Els carcinomes de queratinòcits (CQ), englobats dins del grup del càncer cutani no melanoma (CCNM), són la neoplàsia maligna més freqüent a nivell mundial en poblacions caucàsiques. Agrupa el carcinoma basocel·lular (CBC) i el carcinoma escatós (CEC), originats tots dos en els queratinòcits de la pell. El CBC rarament metastatitza (0.03-0.55 %)¹, però quan creix localment sovint destrueix els teixits circumdants causant importants seqüeles funcionals i estètiques, sobretot d'àrees fotoexposades com la cara. El CEC és moderadament invasiu i es pot associar a un risc substancial de recurrències locals, metàstasis i mort (1.5-4 %)². En conjunt, suposen un enorme problema de salut a nivell mundial, tant en termes de morbiditat com de despesa sanitària.

Carcinoma basocel·lular

El CBC és el càncer més freqüent de l'ésser humà. Representa un 80 % dels CQ³ i el 50 % del total de neoplàsies diagnosticades als Estats Units⁴⁻⁵. Globalment, les incidències més altes del CBC corresponen a àrees geogràfiques amb latituds baixes i on predominen poblacions caucàsiques, com Austràlia o Arizona. A Austràlia⁶⁻⁷ tenen una incidència de 884/100 000 habitants/any, i a Arizona⁸ de 935.9 entre els homes i 497.1 entre les dones (a partir d'ara sempre ens referirem a valors d'incidència per cada 100 000 habitants/any). A Anglaterra⁹ en canvi, la incidència l'any 2006 s'estimava en 76.2. Si ens centrem en les dades publicades sobre Catalunya, al barcelonès nord¹⁰, la incidència l'any 2007 era de 128, i a Girona¹¹, el 2012, era de 73.2. Fins al moment actual, no tenim dades publicades sobre la província de Lleida.

De totes maneres, la incidència del CBC està augmentant de manera significativa a nivell mundial, en tots els rangs d'edat, i independentment de la latitud o àrea geogràfica. A Dinamarca¹², la incidència del CBC ha augmentat entre les dones de 27.1 a 96.6, i entre els homes de 34.2 a 91.2, de l'any 1978 al 2007. A Islàndia¹³, on tenen l'índex de radiació ultraviolada (UV) més baixa d'Europa, la incidència l'any 1981 era de 25.7 en homes i de 22.2 en dones, i ha augmentat 2.33 vegades en els homes i 3.74 vegades en les dones per l'any 2017. En menors de 30 anys, al Regne Unit, la incidència el 2006 era de 1.79 (el 1989 era de 0.73, el que representa un augment anual del 8.53 %)¹⁴.

L'aspecte clínic i histològic del CBC és molt variat i les classificacions són múltiples. Per classificar-lo s'han de tenir en compte tant les característiques clíniques com les histològiques, entre les quals existeix una certa correlació amb implicacions pronòstiques.

Classificació clínic: Per descriure'n de mode simple els diferents subtipus, els dividirem en les cinc formes més utilitzades a la pràctica dermatològica diària; aquestes són nodular, superficial, *ulcus rodens*, esclerodermiforme i pigmentat.

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

- **Ulcus rodens:** És aquell CBC que està ulcerat des del principi, amb tendència al sagnat i crosta adherida. Les vores són llises, i el fons està infiltrat. Sol ser de mal pronòstic per la capacitat invasiva que té i la resistència als tractaments locals.
- **Superficial:** Es localitzen, sobretot, al tronc. Gairebé són asimptomàtics i de creixement molt lent. Es poden confondre amb èczemes i es divideixen en 2 subtipus:
 - **Eritematós:** Placa eritematosa i infiltrada, amb vores elevades i brillants.
 - **Pagetoide:** Placa plana de color vermell-grisós amb escata adherida.
- **Esclerodermiforme/morfeiforme:** Placa de color ivori, dura al tacte i engruixida, que simula una cicatriu o una placa de morfea. Les vores no es poden delimitar fàcilment i té un creixement agressiu, el que implica que es consideri el de pitjor pronòstic.
- **Pigmentat:** Qualsevol de les formes anteriors pot presentar focus de pigmentació clínica per augment dels melanòcits i presència de melanòfags. És més habitual a les formes nodulars i superficials i es pot confondre clínicament amb un melanoma.

Classificació histològica¹⁵: L'arquitectura histològica del CBC és clau per establir-ne el comportament, i per tant, el pronòstic. Per aquest motiu, la classificació segons la histologia es considera més important que la clínica i és la que més freqüentment s'utilitza. Aquí es divideixen en formes de creixement indolent (nodular i superficial) i formes de creixement agressiu (micronodular, esclerodermiforme, basoescatós i infiltrant).

De creixement indolent

- **Nodular** (o nòdulo-quístic) (60 %): És la forma més freqüent. Està format per níus de cèl·lules basaloides de diferent mida tant a la dermis papil·lar com a la reticular, amb palissada perifèrica. Es pot trobar melanina a dins el tumor i histiòcits a l'estroma.
- **Superficial** (representa aproximadament un 25 %): Es caracteritza per una proliferació de cèl·lules basaloides atípiques que es col·loquen de forma paral·lela a la superfície epidèrmica, formant fenèdures entre les cèl·lules de la palissada i l'estroma, de marges ben delimitats. Pot tenir pigment en algunes ocasions.

De creixement agressiu

- **Esclerodermiforme/morfeiforme** (1-5 %): Són columnes de cèl·lules basaloides que s'endinsen en un estroma molt dens de col·lagen i fibroblasts fins al teixit subcutani, sense palissada perifèrica. Les cèl·lules presenten abundants mitosis i necrosi. Aquí les fenèdures entre epiteli i estroma són poc freqüents.
- **Infiltratiu:** Els níus de cèl·lules tumorals tenen mides irregulars, angulacions agudes a la perifèria i molta activitat mitòtica. Pot infiltrar el teixit subcutani i el múscul subjacent. L'estroma és fibrós.
- **Micronodular:** Es manifesta com a níus tumorals amb una forma similar al nodular, però més petits i molt dispersats amb una distribució asimètrica que s'estén per tota la dermis i la hipodermis, associat a un alt risc de recurrència¹⁶.
- **Basoescatós/Metatípic:** És un CBC amb diferenciació escatosa. Aquí es veuen grans llengües dentades infiltrants de cèl·lules tumorals, amb morfologia basaloide i característiques eosinofíliques variables. Amb molta activitat mitòtica i cèl·lules apoptòtiques. És un dels subtipus de CBC més agressius.

Carcinoma escatós

El CEC representa el 20 % dels CQ, però el seu risc de metàstasi és molt més elevat que el del CBC, per aquest motiu, el CEC és la causa més comú de mortalitat per CQ¹⁷. La seva incidència, igual que la del CBC, ha augmentat entre el 50 i el 200 % en les últimes tres dècades, i a nivell mundial varia segons la latitud de cada àrea geogràfica, de 5 a 499/100 000 habitants/any^{7,18-20}. Cada any es diagnostiquen als Estats Units 1 milió de casos nous de CEC, causant 9000 morts anuals²¹, i s'espera que continuï augmentant degut, entre d'altres factors, a l'envelliment de la població i a l'augment dels hàbits d'exposició solar. A Anglaterra²², la incidència del CEC l'any 2015 va ser de 55.7, mentre que per l'any 2000 era de 18.4. A Girona¹¹, la incidència l'any 2012 era de 28.8. No tenim dades publicades pel que fa a la província de Lleida.

Es presenta clínicament com una placa o un nòdul solitari, eritematós i queratòsic, localitzat típicament en àrees fotoexposades. Histològicament, la diferenciació del CEC pot variar des de ben diferenciat (millor pronòstic) fins a pobrament diferenciat (pitjor pronòstic). Els CECs ben diferenciats es mostren com proliferacions d'epiteli escamós amb mínim pleomorfisme nuclear, prominents ponts intercel·lulars i focus de queratinització, amb escasses o absents mitosis. En els casos pobrament diferenciats és difícil determinar el llinatge queratinocític del tumor i presenten cèl·lules aïllades infiltrants en profunditat.

Existeixen variants histològiques amb diferents pronòstics que val la pena mencionar²³⁻²⁴:

Lesions precursors de CEC o CEC *in situ*:

- Queratosi actínica: Queratinòcits atípics confinats a la capa basal de l'epidermis.
- Malaltia de Bowen o CEC *in situ* : Queratinòcits atípics a totes les capes de l'epidermis.

Variants histològiques de baix o moderat risc:

- Queratoacantoma: Proliferació escatosa ben diferenciada d'aparença crateriforme.
- Carcinoma verrucós: CEC ben diferenciat i amb poca atípia, però amb hiperqueratosi exofítica prominent i llengües de creixement intradèrmiques (papil·lomatosis), amb canvis similars als coilòcits. Relacionat amb el virus del papil·loma humà.
- CEC de cèl·lules clares: Més del 25 % de les cèl·lules epitelials escamoses contenen vacuolització citoplasmàtica PAS+ (*Periodic acid-schiff*).

Variants histològiques d'alt risc:

- CEC acantolític: CEC ben diferenciat amb marcada acantòlisi.
- CEC de cèl·lules fusiformes: Es tracta d'una variant de CEC pobrament diferenciada amb fascicles de cèl·lules fusiformes pleomòrfiques amb una gran activitat mitòtica.
- Carcinoma adenoescatós: Diferenciació mixta escatosa i glandular originada a l'epidermis amb niús interconnectats de cèl·lules escatoses anaplàstiques i estroma desmoplàsic amb una diferenciació glandular d'entre el 5 i el 80 % (que tenyeixen immunohistoquímicament amb CEA i CK7).

Variants poc freqüents:

- CEC amb diferenciació sarcomatoide.

- Carcinoma limfoepitelioma-*like*.
- CEC pseudovascolar.
- CEC amb cèl·lules gegants osteoclàstiques-*like*.
- Epitelioma *cuniculatum* (variant rara de CEC de les plantes dels peus).

Factors de risc per als carcinomes de queratinòcits

En general, els factors de risc (FR)^{23,25} són els mateixos (excepte algunes peculiaritats que després comentarem) per al CBC i per al CEC. Els FR relacionats amb els CQ de manera més significativa són l'exposició UV (solar o de cabines de bronzejat), pells clares (fototipus Fitzpatrick I-III, Taula 1), l'edat avançada i la immunosupressió (s'ha descrit que els pacients receptors de trasplantaments tenen entre 65 i 250 vegades més risc de CQ que la població general)²⁶⁻²⁸.

Taula 1. Fototipus de la pell humana segons la classificació de Fitzpatrick.

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

Altres factors de risc que s'hi han relacionat són la latitud i el fet de treballar a l'aire lliure (estarien associats amb l'exposició UV), el sexe masculí (almenys fins fa pocs anys), l'exposició ambiental a l'arsènic, hidrocarburs aromàtics policíclics, agents alquilants i nitrosamines, i l'exposició a radiacions ionitzants. Els CQ poden sorgir sobre cicatrius, cremades, fistules, úlceres cròniques, i altres focus d'inflamació crònica, motiu pel qual aquestes lesions també es consideren factors de risc. A més, múltiples síndromes genètiques incrementen el risc de patir CQ, com la xerodèrma pigmentada, l'albinisme, la síndrome Rothmund-Thomson, de Bloom i de Rasmussen.

De manera particular, l'epidermòlisi ampul·lar, l'epidermòlisi verruciforme i l'epitelioma de Ferguson Smith s'han descrit com a genodermatosis que augmenten el risc de patir CEC, i les síndromes de Gorlin-Goltz, de Rombo i de Bazex-Christol-Dupré com a genodermatosis que augmenten el risc de patir CBC. A més a més, els virus del papil·loma humà 16 i 18 s'han descrit com a FR per al CEC, sobretot periungual i anogenital.

Factors associats a pitjor pronòstic en els carcinomes de queratinòcits

Dins de cada grup, CBC i CEC, trobem diferents característiques o factors que confereixen al tumor un pitjor pronòstic (més risc de recidiva, metastasis i/o mort). Entre els CBC¹⁶ trobem com a factors de pitjor pronòstic: la localització (pitjor pels localitzats a l'àrea H*), mida superior a 20 mm a l'àrea L** i 10 mm a l'àrea M***, marges tumorals mal definits, recurrència del tumor en ocasions prèvies, presència d'immunosupressió, invasió perineural, i els subtipus histològics esclerodermiforme, infiltratiu i micronodular.

Entre els CEC²³, trobem com a factors de pitjor pronòstic: la localització (àrea H*), mida superior a 20 mm a l'àrea L** i 10 mm a l'àrea M***, marges mal definits, tumor recidivant, presència d'immunosupressió, aparició sobre una zona sotmesa prèviament a radioteràpia o aparició sobre ferides cròniques o úlceres, el ràpid creixement del tumor i algunes característiques histològiques com la invasió perineural (sobretot de troncs nerviosos més grans de 0.1 mm), la invasió vascular o limfàtica, la profunditat o Clark igual o superior a 2 mm, ésser tumors poc diferenciats, i els subtipus adenoide, adenoescatós, desmoplàsic i metaplàsic.

* Àrea H: "Mask areas" de la cara: (cara central, celles, parpelles, òrbites, nas, llavis, temples, mandíbules, pell pre i retroauricular, orella), genitals, mans i peus
*** Àrea M: Galtes, front, cuir cabellut, coll i pretibial
** Àrea L: Tronc i extremitats (excloent les localitzades a les àrees H i M)

Importància dels carcinomes de queratinòcits

Com a conseqüència de les xifres epidemiològiques que hem comentat anteriorment, podem deduir que els CQ suposen una despesa important pels sistemes de salut. El seu diagnòstic, tractament i seguiment suposa una despesa sanitària d'aproximadament 8.1 bilions de dòlars anuals als Estats Units²⁹. A Austràlia, el cost és de 365 milions de dòlars australians/any (uns 2495 per cada cas particular), suposant un 68 % de la despesa sanitària que una persona realitzarà al llarg de la seva vida³⁰. L'any 2008, a Anglaterra, la despesa pels CQ es va estimar entre 106-112 milions de £ (889-1226 £ per cada cas individual)³¹. Pel que fa a la qualitat de vida d'aquests pacients, segons les últimes dades publicades de DALYs³² (*disability-adjusted life years*), els CQ ocasionen una rati de 12.9 anys de discapacitat/100 000 habitants. En el nostre Hospital (HUAV Lleida), cada visita d'un pacient amb CQ suposa una despesa de 120 euros i el seu tractament quirúrgic de 1000 euros, a part dels tractaments adjuvants que puguin requerir. Segons la incidència que hem calculat al nostre territori, implica una despesa d'aproximadament 1.5 milions d'euros a l'any dedicada al maneig dels CQ només a la província de Lleida. Aquestes dades ens ajuden a reflexionar sobre la gran importància d'aquests càncers i l'enorme despesa econòmica que comporta el seu maneig. Malgrat això, el progrés realitzat en la recerca dels CQ és limitat, i el coneixement pel que fa als mecanismes d'invasió i disseminació d'aquests tumors és escàs.

Estudi proteòmic del fluid intersticial tumoral

La senyalització en la interfase tumor-hoste és un element clau a l'hora d'explicar la inducció i el desenvolupament de les metàstasis tumorals³³. Sembla que queda clar que els senyals extracel·lulars de les cèl·lules tumorals estan involucrats en la majoria dels passos desencadenants de metàstasi, com la invasió de l'estroma. Aquesta senyalització pro metastàtica està mitjançada per metabòlits i proteïnes secretats per part de les cèl·lules canceroses. El secretoma d'una cèl·lula engloba tots aquests components secretats (incloent metabòlits, proteïnes i exosomes). El secretoma tumoral es pot obtenir a partir del fluid intersticial tumoral (de l'anglès, TIF). Aquest fluid es troba banyant el tumor i les cèl·lules estromals i representa el microambient tumoral³⁴. La composició del TIF depèn tant de la filtració de substàncies per part dels capil·lars, sanguinis i limfàtics, com de la secreció per part de les cèl·lules tumorals i estromals. Per tant, l'estudi proteòmic del TIF és un abordatge d'especial interès que pot ajudar a revelar molècules clau involucrades en la capacitat infiltrativa o metastàtica d'un tumor i podria tenir conseqüències potencials per a desenvolupar biomarcadors o dianes terapèutiques³⁵.

Un altre avantatge del TIF és que suposa un progrés important en l'estudi de les cèl·lules tumorals *in vivo*³⁶, respecte el seu estudi a través de cultius cel·lulars. El principal avantatge dels models *in vivo* és que faciliten l'estudi de la gènesi tumoral en un organisme complet i complex. Permeten monitoritzar i avaluar diferents elements claus en el desenvolupament del càncer, com són l'angiogènesi, la intravasació i extravasació i la colonització metastàtica³⁶. A més a més, l'estudi proteòmic del TIF és molt més útil per descobrir proteïnes específiques del tumor, no detectables en plasma o altres fluids distants al tumor per la seva baixa concentració i inespecificitat³⁷.

Les principals aplicacions de la proteòmica del TIF es divideixen en quatre àrees. Mitjançant proteòmica funcional es poden caracteritzar les xarxes de senyalització implicades en la progressió tumoral i es poden mesurar els canvis en els nivells d'expressió de les proteïnes associades al tumor³³. A través de la farmacoproteòmica, s'identifiquen proteïnes d'unió i dianes terapèutiques en els estudis funcionals per a desenvolupar fàrmacs antineoplàstics. També permet mapar els epítops per a determinar les regions de les proteïnes que s'uneixen a anticossos específics. La proteòmica clínica ens permet descobrir i desenvolupar marcadors tumorals específics i permet caracteritzar els diferents subtipus tumorals i determinar-ne el pronòstic i l'evolució. Per últim, la fosfoproteòmica quantitativa permet identificar possibles substrats de les quinases i les fosfatases i resulta útil per entendre com es manifesten els seus efectes en les cèl·lules tumorals. La importància adquirida recentment per aquesta darrera és deguda a la possibilitat d'usar les proteïnes quinases com a dianes terapèutiques del càncer³⁸.

En l'àmbit de la dermatologia, la proteòmica s'ha utilitzat per a detectar les proteïnes relacionades amb la immunitat cutània local que es troben en el secretoma. L'objectiu era determinar una major susceptibilitat a infeccions i colonitzacions cutànies, usant com a casos els pacients amb displàsia ectodèrmica³⁹. Pel que fa al càncer cutani, l'estudi de les proteïnes secretades pel tumor s'ha utilitzat per a intentar entendre la seva capacitat metastàtica i angiogènica, usant únicament línies cel·lulars *in vitro*⁴⁰. Per tant, cal destacar que fins al moment actual, no hi ha publicacions que tractin sobre el TIF en tumors primaris cutanis.

Gràcies als estudis que s'han fet sobre el TIF en d'altres tumors⁴¹⁻⁴⁵ sabem que s'aïllen grans quantitats de proteïnes per a cada mostra, i que cada tipus tumoral té un TIF específic i que són poc coincidents entre ells. Tot i que el TIF conté proteïnes del sèrum, la seva composició general en difereix significativament, de la mateixa manera que difereix de la dels lisats cel·lulars dels mateixos tumors. En d'altres tumors ja s'han publicat biomarcadors aïllats a partir de mostres de TIF, com per exemple la proteïna S100A6 aïllada a partir del TIF de colangiocarcinoma⁴⁵.

El coneixement de les alteracions moleculars dels tumors és clau per a entendre el seu comportament, agressivitat o resistència als tractaments. Pel que fa als CQ encara hi ha molts interrogants per resoldre, sobretot en l'estudi de la seva eficiència invasiva. L'ús de tècniques innovadores com l'anàlisi proteòmica del TIF aplicades a l'estudi dels CQ és un camí encara per explorar que ens pot conduir a identificar biomarcadors tumorals d'invasió.

Hipòtesis

Hipòtesis

El treball d'aquesta tesi està dividit en una part clínica, d'epidemiologia, i una part de recerca bàsica, totes dues aplicades als carcinomes de queratinòcits. El plantejament d'aquestes dues parts té com a base diferents hipòtesis d'inici:

1. El CBC és el tumor més freqüent en poblacions caucàsiques i clàssicament ha predominat entre el sexe masculí. En els darrers anys s'ha detectat un canvi en aquesta tendència a favor del sexe femení, sobretot entre els pacients d'edats més joves. La nostra hipòtesi és que aquest canvi també es manifesta entre la població de Lleida.
2. Aquesta predominança del sexe femení, és més marcada entre els pacients joves. Creiem que es podria explicar pels canvis en la moda estètica, que promouen la recerca del bronzejat sobretot entre les dones joves. Això augmentaria l'exposició a certs factors de risc en aquest subgrup, com podria ser un major ús de les cabines de bronzejat o un augment de les cremades solars.
3. Si la tendència a l'alça en la incidència del CBC i el CEC que s'ha vist a nivell mundial es manté en un futur, seria important poder conèixer la distribució actual dels factors de risc per al càncer de pell entre la població general. Creiem que hi ha canvis en la distribució dels factors de risc entre pacients joves i grans, i entre homes i dones, que poden explicar aquest augment de la incidència.
4. Creiem que la capacitat invasiva dels carcinomes de queratinòcits està mitjançada, entre d'altres, per la senyalització paracrina de les cèl·lules tumorals, i que es pot estudiar identificant les proteïnes presents al TIF.
 - a. Els CBCs i els CECs tenen en comú proteïnes en el TIF que influencien en la invasió de la dermis i difereixen en marcadors de metàstasis/agressivitat tumoral.
 - b. Els CECs de baix risc i els CECs d'alt risc expressen de manera diferent marcadors en el TIF relacionats amb un risc més alt de recidiva i metàstasi.
 - c. Els diferents subtipus histològics de CBC, associats a diferents pronòstics, expressen de manera diferencial proteïnes del TIF relacionades amb l'agressivitat tumoral.

Objectius

Objectius

En relació a les hipòtesis plantejades, els nostres objectius són:

1. Descriure l'epidemiologia del CBC a la regió sanitària de Lleida l'any 2017. Veure si existeixen diferències entre els CBCs diagnosticats en gent jove i els diagnosticats en gent gran.
2. Realitzar un estudi de casos i controls per tal d'esbrinar quins són els factors de risc per al CBC entre els pacients més joves (≤ 45 anys).
3. Estudiar la distribució dels factors de risc per al càncer de pell entre la població general. Veure si existeixen diferències entre els homes i les dones que puguin justificar la predominança femenina. Veure si hi ha diferències entre ≤ 45 anys i > 45 anys pel que fa a la distribució dels factors de risc per conèixer-ne la seva tendència.
4. Determinar quin és el millor mètode per a aïllar el TIF en les mostres de carcinomes de queratinòcits d'entre tots els que hi ha descrits a la literatura.
5. Aplicar el mètode seleccionat per a aïllar TIF a les mostres de CBC, CEC de baix i alt risc, i pell sana, i identificar el seu perfil proteòmic mitjançant "*label-free mass spectrometry quantification*".
6. Comparar el perfil proteòmic de les mostres i, mitjançant anàlisi informàtica i estadística, identificar quines proteïnes s'expressen de manera diferent entre elles. Tractar les dades analitzant funcionalment les proteïnes segons grups d'interès (participació en els diferents processos biològics, component cel·lular al qual pertanyen, etc.).
7. Seleccionar els candidats relacionats amb l'agressivitat tumoral a partir de les dades proteòmiques i validar-los. Finalment, explicar la rellevància funcional d'aquests nous marcadors *in vivo*.

Resultats i discussió

Capítol I

Epidemiologia, tendències epidemiològiques
i factors de risc del CBC

Capítol I: Epidemiologia, tendències i factors de risc del CBC

Introducció

El carcinoma basocel·lular és mundialment el càncer més freqüent⁴⁶, i la seva incidència està augmentant almenys un 10 % any rere any⁴⁷. És considerat un tumor d'aparició en persones d'edat avançada, sobretot homes, i en localitzacions fotoexposades⁴⁸. Però en els treballs més recents s'ha vist que han augmentat dramàticament els casos de CBC entre la gent jove, sobretot dones⁴⁹⁻⁵⁰. Estudis realitzats prèviament⁵¹⁻⁵⁴ destaquen diversos factors de risc entre els pacients joves, com ara fumar tabac, història personal de múltiples cremades de segon grau durant la infància i l'ús de cabines de bronzejat. Tanmateix, aquesta predominança femenina entre els pacients joves i les seves causes s'han de revisar exhaustivament, per tal de poder adreçar les campanyes preventives convenientment.

L'objectiu d'aquesta part de la tesi és estudiar aquestes tendències i clarificar-ne les causes. Primer, s'analitzen les característiques (demogràfiques, localització dels tumors i histologia) dels CBCs diagnosticats a la regió Sanitària de Lleida durant l'any 2017, comparant-les segons les edats dels pacients (gent jove vs. gent gran). Després, s'investiga quins són els principals factors de risc per als CBCs esporàdics entre els pacients joves de Lleida mitjançant un estudi de casos i controls. Finalment, a través d'un qüestionari *on-line*, es recull la distribució d'aquests factors de risc entre la població general de Catalunya, comparant entre homes i dones i també entre els grups d'edat.

Material i mètodes

Consideracions ètiques

Aquest treball s'ha dut a terme amb la pertinent aprovació per part del comitè ètic de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida (CEIC-1958), i seguint els principis de la Declaració de Hèlsinki. La participació ha sigut voluntària i tots els subjectes han donat el seu consentiment informat. La decisió de participar o no en l'estudi no ha afectat la relació amb el metge ni el tractament o seguiment dels pacients. El tractament de les dades personals s'ha dut a terme de manera anònima i confidencial.

Recollida de dades dels CBCs

El llistat del total de CBCs diagnosticats de nou durant l'any 2017 a la regió Sanitària de Lleida va ser obtingut del registre d'Anatomia Patològica de la regió sanitària. Es va completar revisant les històries clíniques dels pacients. Les dades recollides van ser les següents: edat, gènere, característiques del tumor (subtipus histològic, localització), història personal d'altres tumors cutanis i història personal d'altra patologia o tractaments rebuts.

Estudi de casos i controls sobre els factors de risc pel CBC en pacients joves

Es van recollir els casos de CBC diagnosticats en pacients amb edats ≤ 45 anys durant el període 2013-2017. El període d'estudi es va estendre a 5 anys (2013-2017) per tal de poder disposar de suficients

casos de CBC diagnosticats en pacients joves. Els criteris d'exclusió van ser: història de radioteràpia prèvia, síndromes genètiques que es caracteritzin per presentar-se amb múltiples CBCs i receptors d'òrgans trasplantats (Taula 2). El qüestionari es va adaptar dels utilitzats en estudis epidemiològics recents⁵¹⁻⁵³, per tal de poder facilitar comparacions. A través d'entrevistes telefòniques, es va recollir la següent informació: fototipus cutani de Fitzpatrick, color de cabell i color d'ulls, nombre de cremades durant la infància (0, 1-3 i ≥ 4), ús de protector solar (no, sí < 50 , sí ≥ 50), història de treballar a l'aire lliure (sí/no), nombre d'hores laborals treballant a l'aire lliure (0/2/4/6/8 hores), història d'haver sigut o ser fumador (sí/no), paquets/dia i anys de fumador, història familiar de càncer de pell (sí/no) i tipus (si es coneix), història d'haver usat cabines de bronzejat alguna vegada (sí/no), nombre de sessions en cabines de bronzejat i edat al primer ús de les cabines.

Taula 2. Criteris d'inclusió i d'exclusió dels casos.

Criteris d'inclusió	Criteris d'exclusió
- Pacients ≤ 45 anys que acceptin participar	- Història de radioteràpia prèvia
- Diagnosticats de CBC durant el període 2013-2017	- Síndromes genètiques caracteritzades per presentar-se amb múltiples CBCs
- CBC confirmats histològicament	- Receptors d'òrgans trasplantats

Els controls, aparellats per edat i sexe, es van seleccionar d'entre els pacients que acudien a les consultes de dermatologia per altres motius no relacionats amb el càncer de pell (com per exemple, patologia benigna: berrugues víriques, quists epidèrmics, nevus intradèrmics aïllats, etc.). Els controls completaven el mateix qüestionari que els casos.

La selecció de l'edat de tall a ≤ 45 anys es va fer després d'una anàlisi de les dades prèvies disponibles de la nostra regió: CBCs diagnosticats durant l'any 2017 en homes i en dones per cada grup d'edat. Per tal d'augmentar el nombre de casos de CBC entre els menors de 45 anys (escassos per l'any 2017 aïllat) es van usar les dades disponibles no només del 2017 sinó del període 2013-2017. Creiem que això no altera les conclusions resultants ja que les diferències que busquem no són en nombre absolut de casos sinó en la proporció entre homes i dones. Tal com veiem en el gràfic de la Figura 1, fins als 45 anys (o inclòs fins als 50 anys) els casos de CBC entre les dones són molt més elevats que entre els homes, canviant aquesta tendència a partir d'aquesta edat de tall. Això indueix a pensar que hi ha quelcom de comú en els pacients de ≤ 45 anys.

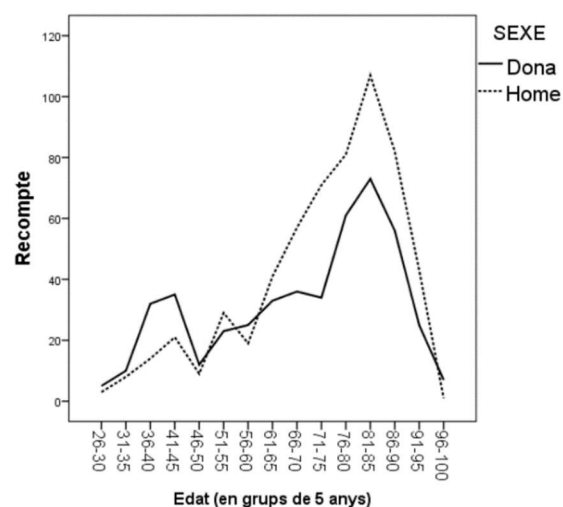


Figura 1. Gràfic de línies representant el nombre de casos de CBC diagnosticats per cada grup d'edat (de cinc anys) en homes i dones. Destacar que fins als 45 anys s'han usat dades del període 2013-2017 i a partir dels 45 anys només de l'any 2017.

Com que es van utilitzar tots els casos de CBC en gent jove (≤ 45 anys) disponibles pel període 2013-2017 no es va realitzar prèviament cap càlcul de la mida mostral. Tanmateix, amb la mostra final de l'estudi (69 casos i 69 controls), tenim una potència estadística del 95 % per a detectar una diferència mínima del 30 % entre casos i controls per la presència de ≥ 4 cremades durant la infància, estimant que el percentatge mínim entre els casos és del 55 % i el percentatge màxim entre els controls és del 25 %.

Distribució dels factors de risc per al càncer de pell entre la població general

Un qüestionari *on-line*, d'iguals característiques que l'utilitzat en l'estudi de casos i controls, va ser distribuït a través de serveis de missatgeria instantània i xarxes socials (WhatsApp®, Instagram® i Facebook®), durant els mesos d'agost i setembre del 2019. L'objectiu era ésser completat per tanta gent com fos possible d'entre la població general de Catalunya, de qualsevol edat. Les dades es van recollir mitjançant un formulari de Google® i es van analitzar també estratificades per edat i sexe.

Anàlisi estadística

Les bases de dades anònimes van ser introduïdes i analitzades a través del programa SPSS v20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EE. UU.). Les variables categòriques es van descriure mitjançant les freqüències absolutes i relatives, i les variables contínues mitjançant la mitjana i la desviació estàndard (DE). Les variables es van comparar mitjançant el test de χ^2 , o el test exacte de Fisher, quan les observacions esperades eren < 5 , i amb el test d'ANOVA quan era necessari. Es van realitzar estratificacions per sexe i per edat. Les *Odds Ratios* (OR) i els intervals de confiança del 95 % (IC) van servir per a comparar la presència de cada un dels factors de risc en l'estudi de casos i controls, mitjançant regressió logística multivariant. Per aquelles variables que entre algunes de les seves condicions no tenien cap cas, es va assignar arbitràriament un cas per tal de poder calcular la OR. El valor de p escollit per a considerar les diferències com a estadísticament significatives en totes les anàlisis va ser $p < 0.05$.

Resultats

Epidemiologia descriptiva dels CBCs diagnosticats l'any 2017 a Lleida

Es van diagnosticar de nou 962 CBCs en 774 pacients a la regió sanitària de Lleida. La incidència global del CBC per l'any 2017 va ser de 194.2/100 000 habitants. Dels 774 pacients, 337 (43.5 %) eren dones i 437 (56.5 %) eren homes. Considerant totes les edats, la incidència entre les dones (171.4/100 000) era inferior que entre els homes (216.4/100 000). Però si es tenen en compte només als pacients amb edats < 60 anys, la incidència entre les dones era superior que entre els homes, 281.7 vs. 176.5/100 000 habitants, respectivament. La mediana d'edat al diagnòstic era de 78.0 anys, amb un rang de [18-99], i la mitjana de 74.5 (DE 13.7). Si es classifiquen en intervals de 10 anys "l'edat al diagnòstic" (1-10, 11-20, ..., 81-90, ≥ 91 anys), el grup amb el màxim nombre de CBCs era el de "81-90 anys" (249 CBCs) (Figura 2.A), i el grup de màxima incidència el de " ≥ 91 anys" (1414.5/100 000 habitants) (Figura 3).

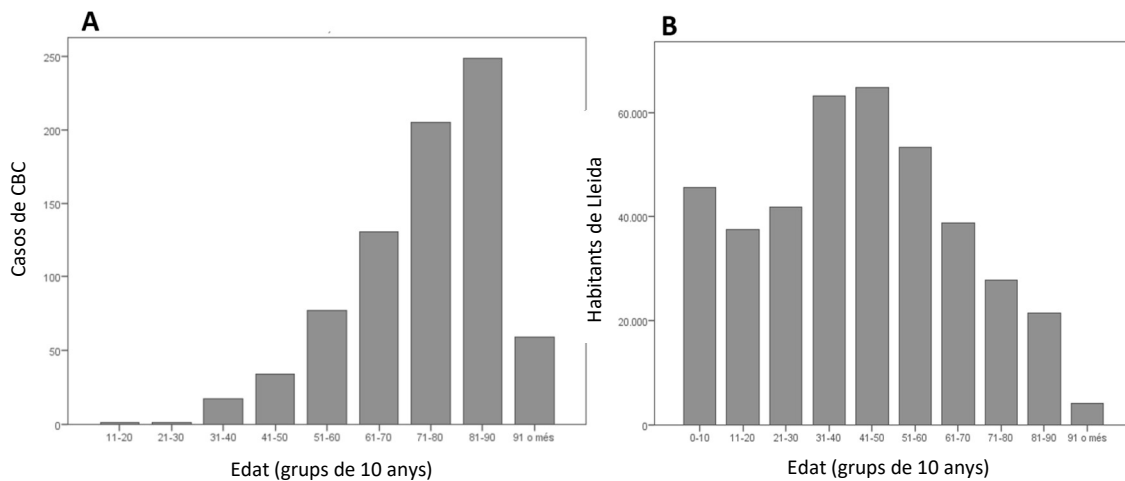


Figura 2. A) Distribució del recompte de CBCs entre els diferents grups d'edat de la població de Lleida l'any 2017. B) Distribució de la població de Lleida entre els diferents grups d'edat l'any 2017.

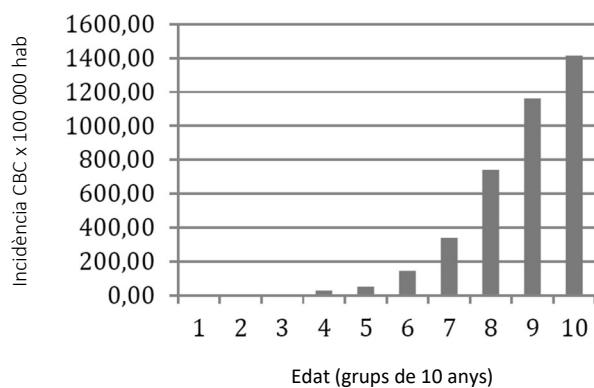


Figura 3. Incidència del CBC x 100 000 habitants per cada grup de 10 anys d'edat, l'any 2017.

Pel que fa a la localització dels CBCs, 76.2 % es trobaven en àrees fotoexposades com el “cap i coll” (20.5 % al nas), 15.2 % al tronc, 6.4 % a les extremitats, 0.4 % a les mans i 0.3 % als genitals. Del total de 338 CBCs amb informació disponible del subtipus histològic, el 57.1 % (193) eren nodulars, el 19.2% (65) eren pigmentats, el 10.7 % (36) superficials, el 7.4 % (25) ulcerats i el 5.6 % (19) morfeïformes. Del total dels 774 pacients, 31 (4 %) eren immunosuprimits. Es va estudiar si els pacients amb múltiples CBCs estaven predisposats a un major risc de recurrències, i es va veure que dels pacients amb només un CBC es registraven recurrències en 41 d'ells (8.1 %), mentre que en els pacients amb 2 o més CBCs, se'n registraven en 68 (25.3 %) ($p < 0.05$).

Del registre de tumors de l'hospital (on no es tenen en compte els CBCs) sabem que la neoplàsia més freqüent en la regió Sanitària de Lleida és el càncer colorectal (amb 329 casos), seguit del càncer de mama (241 casos) i del càncer de pròstata (197 casos). El CBC és per tant, 2.92 vegades més freqüent que el càncer més freqüent de la mateixa regió Sanitària (Figura 4).

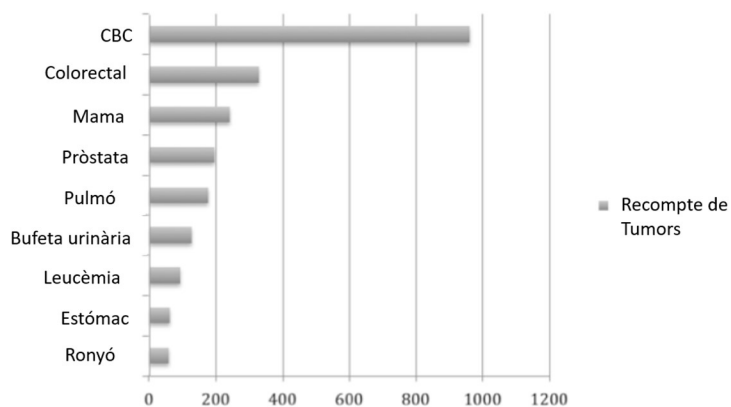


Figura 4. Recompte del nombre de tumors diagnosticats a la regió Sanitària de Lleida l'any 2017.

Diferències entre els CBCs diagnosticats en pacients ≤ 45 vs. ≥ 75 anys a Lleida

Es van dur a terme comparacions entre els CBCs classificats en dos grups d'edat, ≤ 45 anys o ≥ 75 anys, sense incloure les edats intermitges, per tal de ressaltar les diferències entre els tumors de la gent jove i els de la gent gran. Es van analitzar dades de 689 CBCs, 133 de pacients ≤ 45 anys (del període 2013-2017) i 556 de pacients ≥ 75 anys (any 2017).

El grup de gent jove tenia una mitjana d'edat al diagnòstic de 39.0 anys (DE 4.6) amb un rang entre [26-45] anys, i eren predominantment dones (64 %) (Figura 5.A). En aquest grup, només el 59 % dels CBCs es localitzaven en àrees fotoexposades com la zona del "cap i coll", i el 37 % es localitzaven al tronc (Figura 5.B). Per altra banda, en el grup de la gent gran, la mitjana d'edat al diagnòstic era de 84.1 anys (DE 5.3) amb un rang entre [75-99] anys, i eren predominantment homes (59 %) (Figura 5.A). En aquest grup, fins a un 81 % dels CBCs estaven localitzats en la regió del cap i el coll, i només un 8.1 % al tronc (Figura 5.B). Aquestes diferències (gènere i localització del tumor) entre els dos grups eren estadísticament significatives ($p < 0.001$). A més a més, pel que fa al subtipus histològic, malgrat que el CBC nodular era el subtipus més freqüent en els dos grups, 40.5 % entre els joves i 58.1 % entre la gent gran, val la pena destacar que el subtipus superficial es presentava en el 32.5 % en el grup de ≤ 45 anys, però només en el 6.4 % en el grup de ≥ 75 anys ($p < 0.05$).

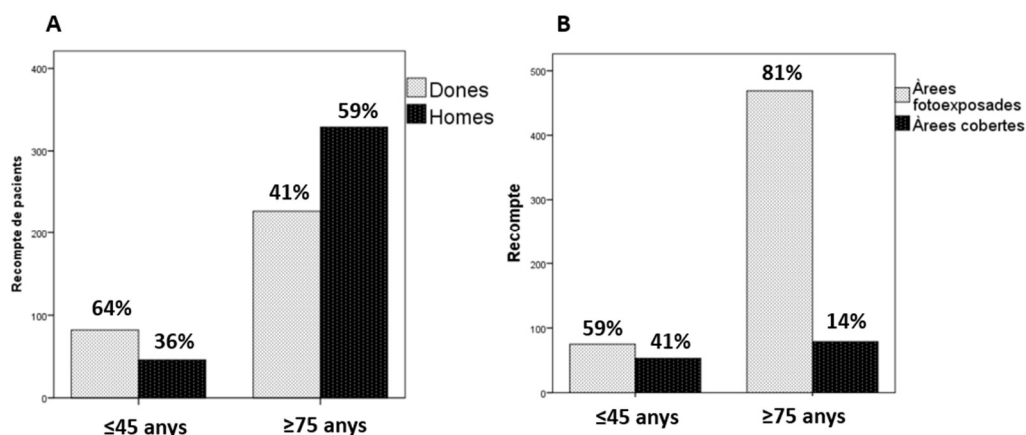


Figura 5. A) Distribució entre homes i dones segons l'edat al diagnòstic (≤ 45 anys o ≥ 75 anys) B) Distribució entre àrees fotoexposades (cara, coll, escot de les dones, dors de les mans, cuir dels homes sense cabell) o àrees cobertes (tronc, braços i cames) segons edat al diagnòstic (≤ 45 anys o ≥ 75 anys).

Estudi de casos i controls sobre els factors de risc en pacients joves de Lleida

Un total de 133 CBCs es van diagnosticar en 111 pacients de ≤ 45 anys entre el 2013 i el 2017 a la província de Lleida. Deu pacients (9 %) presentaven múltiples CBCs. Dels 111 pacients, 3 es van excloure de l'estudi final perquè complien criteris d'exclusió (història d'irradiació holocorporal, CBC sobre un nevus sebaci de Jadassohn, receptor d'òrgan trasplantat). Dels 108 potencials participants, 38 no van ser inclosos en l'estudi: per no tenir un número de telèfon funcional o no respondre a la trucada després de tres intents. Finalment, 69 pacients amb CBC van ser inclosos i entrevistats, de la mateixa manera que 69 controls (aparellats per edat i gènere) (Figura 6).

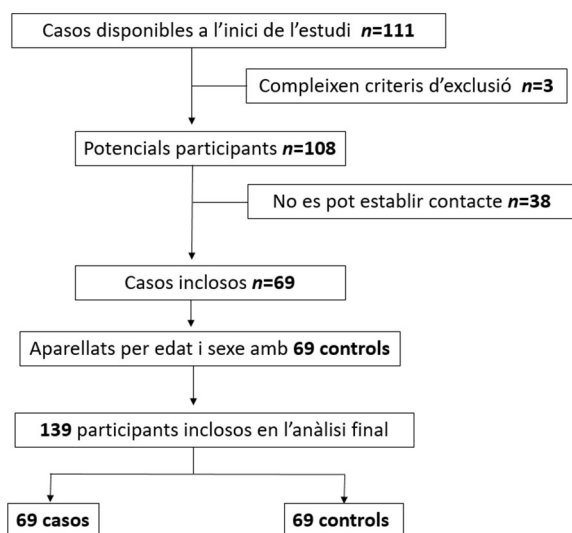


Figura 6. Diagrama de flux dels participants a l'estudi.

Dels 138 participants (69 casos i 69 controls), el 63.8 % eren dones. Les diferències en les característiques clíniques entre els casos i els controls estan resumides a la Taula 3. Amb l'anàlisi estadística bivariant inicial vam trobar múltiples FR pel CBC en gent jove amb diferències significatives entre casos i controls (Taula 3, columna 4). Posteriorment, mitjançant regressió logística multivariant vam identificar quins eren els FR independents (Taula 3, columna 5): el fototipus cutani (usant el tipus IV com a referència), la història familiar de carcinomes de queratinòcits i la presència de ≥ 4 cremades de segon grau durant la infància.

Taula 3. Característiques clíniques dels casos i controls i resultats de l'estudi estadístic bivariant i multivariant.

CARACTERÍSTIQUES	CASOS (n=69) n (%)	CONTROLS (n=69) n (%)	ANÀLISI BIVARIANT P; OR (IC 95 %)	ANÀLISI MULTIVARIANT P; OR ajustada (IC 95 %)
Mitjana d'edat, anys	39.1 (DE 4.5)	39.1 (DE 4.5)	P = 1.00	
Dones	44 (63.8)	44 (63.8)	P = 1.00	
Color de cabell			P = 0.29	
Negre/Marró fosc	23 (33.3)	30 (43.5)		
Marró clar	31 (44.9)	31 (44.9)		
Ros	14 (20.3)	8 (11.6)		
Pèl-roig	1 (1.45)	0 (0.0)		

Color d'ulls			P = 0.20	
Negre/Marró fosc	29 (42.0)	38 (55.1)		
Marró clar/Avellana	12 (17.4)	9 (13.0)		
Verd	21 (30.4)	12 (17.4)		
Blau/Blau-gris	7 (10.1)	10 (14.5)		
Fototipus cutani			P < 0.0001	P = 0.004
I	8 (11.6)	0 (0.0)	58.0 (5.7-594.3)	24.4 (2.2-270.7)
II	40 (58.0)	18 (26.1)	16.1 (4.9-52.7)	9.2 (2.6-32.9)
III	17 (24.6)	22 (31.9)	5.6 (1.7-19.0)	4.8 (1.3-17.4)
IV	4 (5.8)	29 (42.0)	Categoria de referència	Categoria de referència
Cremades a la infància			P < 0.0001	P = 0.003
< 4	29 (42.0)	55 (80.0)	Categoria de referència	Categoria de referència
≥ 4	40 (58.0)	14 (20.0)	5.4 (2.5-11.6)	3.9 (1.6-9.4)
Ús cabines de bronzejat			P = 0.90	
Mai/No	37 (53.6)	36 (52.2)		
Alguna vegada/Sí	32 (46.4)	33 (47.8)		
Sessions de bronzejat			P = 0.63	
0	37 (53.6)	37 (53.6)		
1-10	23 (33.3)	19 (27.5)		
11-25	4 (5.8)	8 (11.6)		
≥ 26	5 (7.2)	5 (7.2)		
Edat al 1r ús (cabines)			P = 0.50	
< 20 anys	4 (12.5)	1 (3.0)		
20-25 anys	18 (56.2)	21 (63.6)		
≥ 26 anys	10 (31.2)	11 (33.3)		
Treball aire lliure > 4 h			P = 0.002	P = 0.136
Sí	20 (29.0)	6 (8.7)	4.3 (1.6-11.5)	
No	49 (71.0)	63 (91.3)		
Història personal de CQ			P = 0.01	
Sí	7 (10.1)	0 (0.0)		
No	62 (89.9)	69 (100.0)		
Història personal MM			P = 0.20	
Sí	3 (4.3)	0 (0.0)		
No	66 (95.7)	69 (100.0)		
AP altres neoplàsies			P = 0.10	
Sí	4 (5.8)	0 (0.0)		
No	65 (94.2)	69 (100.0)		
Història familiar CQ			P = 0.007	P = 0.042
Sí	18 (26.1)	6 (8.7)	3.7 (1.4-10.0)	3.4 (1.1-11.1)
No	51 (73.9)	63 (91.3)		
Història familiar MM			P = 0.06	
Sí	7 (10.1)	1 (1.4)		
No	62 (89.9)	68 (98.6)		
Història de fumador			P = 0.027	P = 0.115
Sí/Alguna vegada	42 (60.9)	29 (42.0)	2.2 (1.1-4.2)	
No/Mai	27 (39.1)	40 (58.0)		

CQ=Carcinoma de queratinòcits, MM=Melanoma, AP=Antecedents personals.

En negreta estan ressaltades les variables amb diferències estadísticament significatives (p < 0.05)

En nombres, pel que fa al fototipus cutani, usant el tipus IV com a referència, vam trobar un major risc de CBC pel tipus I (OR = 24.4; IC 95 % = 2.2-270.7), pel tipus II (OR = 9.2; IC 95 % = 2.6-32.9) i pel tipus III (OR = 4.8; IC 95 % = 1.3-17.4) (Figura 7.A). També, els participants amb presència de ≥ 4 cremades

durant la infància estaven més predisposats a tenir CBC que aquells amb < 4 cremades (o cap) ($p = 0.003$), amb una OR = 3.9 (IC 95 % = 1.6-9.4) (Figura 7.B).

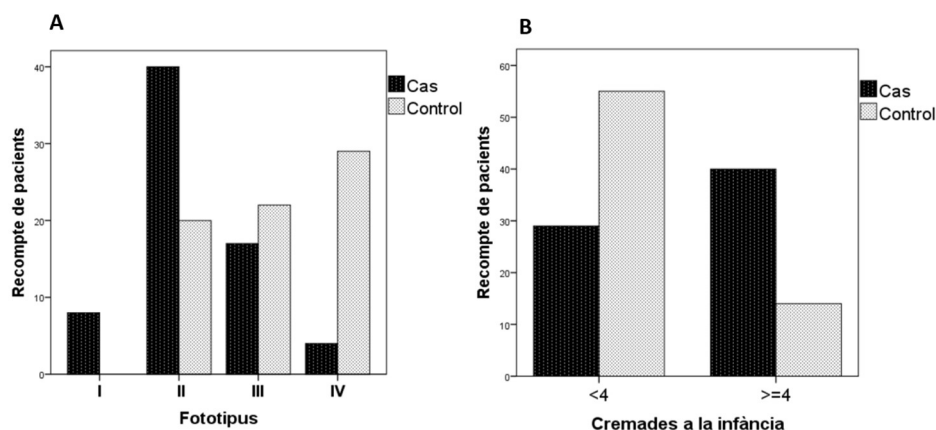


Figura 7. A) Distribució dels fototipus cutanis entre els casos i els controls. **B)** Distribució de la presència de cremades de segon grau durant la infància entre els casos i els controls.

Si ens centrem en l'ús de les cabines de bronzejat no trobem diferències, 32 casos vs. 33 controls les havien utilitzat almenys una vegada. Tampoc en trobem si separem entre homes i dones (Figura 8). Quan analitzem el nombre de sessions (1-10, 11-25, ≥ 26 sessions), tampoc trobem diferències entre els casos i els controls, ni dividint entre homes i dones (Figura 9). Sobre "l'edat al primer ús", es revela una tendència (tot i que no significativa, $p = 0.12$), 10/15 participants que l'havien usat ≤ 20 anys eren casos (Figura 10). Quan estudiem l'ús de les cabines de bronzejat segons el fototipus cutani, entre els casos, els que usen cabines són més freqüentment tipus I-II, i entre els controls, tipus IV (Figura 11).

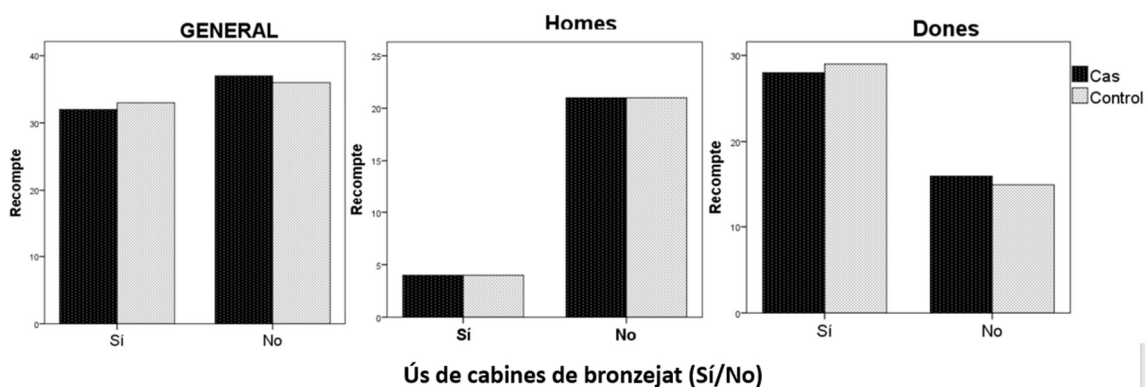


Figura 8. Distribució entre casos i controls pel que fa a l'ús de les cabines de bronzejat, en general i separat entre homes i dones.

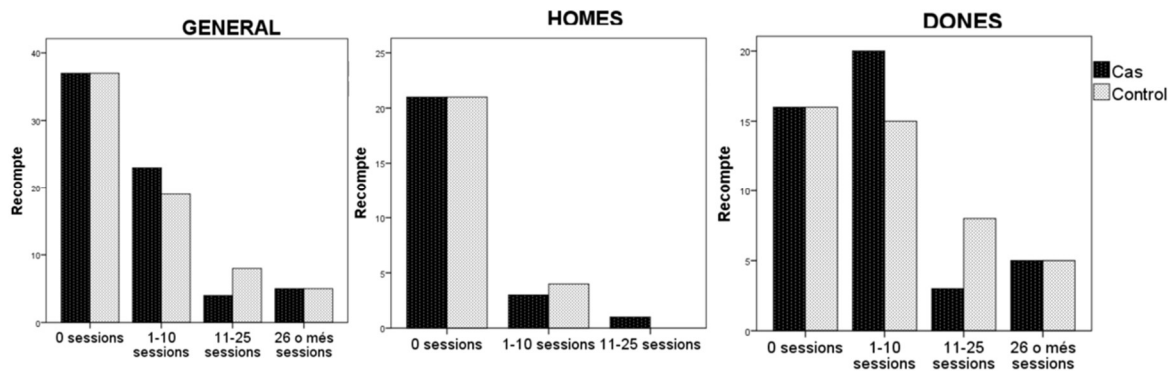


Figura 9. Distribució entre casos i controls pel que fa al nombre de sessions a les cabines de bronzejat, en general i separat entre homes i dones.

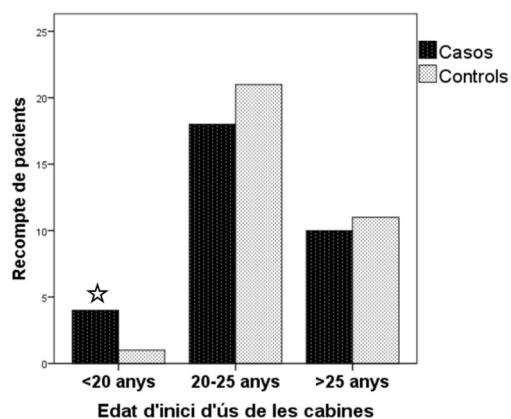


Figura 10. Distribució de l'edat al primer ús de les cabines de bronzejat entre casos i controls.

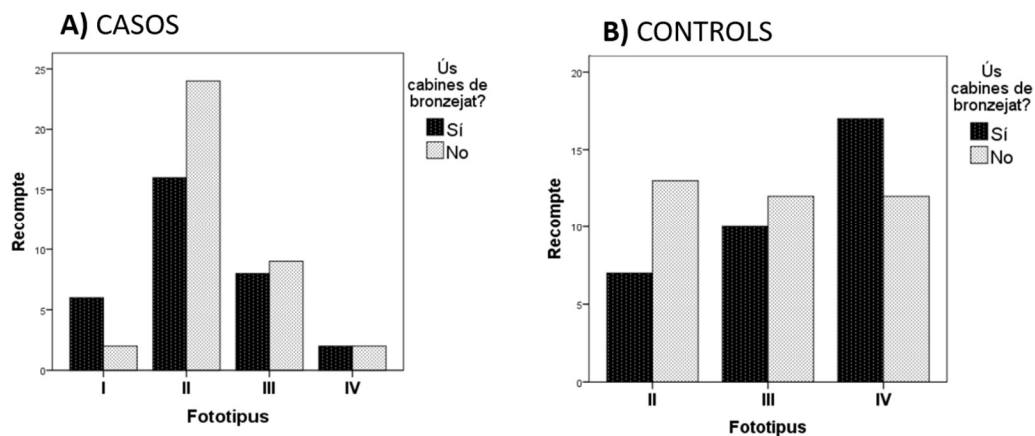


Figura 11. Distribució de l'ús de les cabines de bronzejat segons el fototipus entre els casos (A) i els controls (B).

Malgrat que en l'anàlisi multivariant el fet de treballar a l'aire lliure perd la significació estadística, el que sí que es pot destacar és que els casos treballen més a l'aire lliure que els controls, i que aquesta tendència és molt més marcada entre els homes que entre les dones (Figura 12).

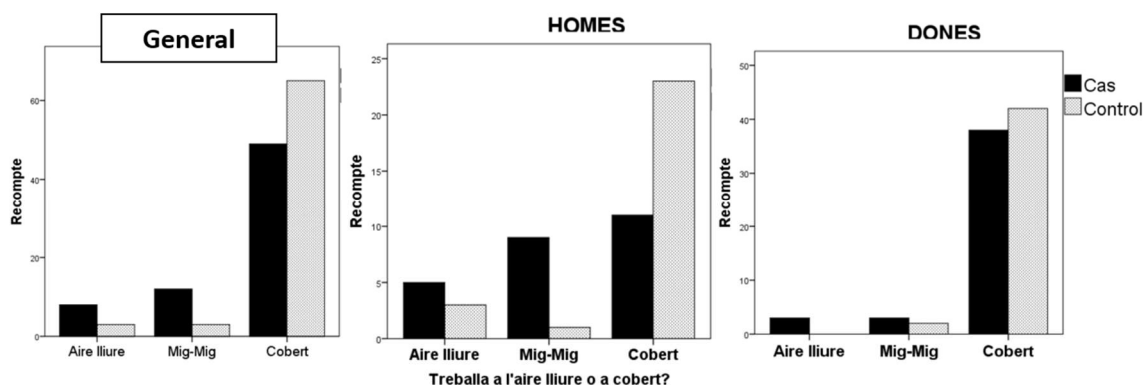


Figura 12. Proporción de treballadors a l'aire lliure entre casos i controls, en general i separat per gèneres.

Pel que fa als antecedents personals i familiars d'altres càncers, l'única variable que presenta diferències significatives entre casos i controls en l'anàlisi multivariant són els antecedents familiars de CQ (OR = 3.4; IC 95 % = 1.1-11.1). Malgrat això, les altres variables també mostren una tendència a ser més freqüents entre casos que entre controls (casos/controls): antecedents personals d'altres CQ (7/0), antecedents personals de MM (3/0), antecedents personals d'altres neoplàsies sistèmiques (neoplàsies de mama) (4/0), antecedents familiars de MM (7/1). És probable que, donada la baixa freqüència d'aquestes característiques entre la població jove, la mostra de l'estudi sigui insuficient per a revelar diferències estadísticament significatives en aquestes variables.

A continuació, es van analitzar les diferències que existien entre els CBCs de la gent jove localitzats en àrees fotoexposades (cap i coll, escot de les dones, dors de les mans, cuir dels homes sense cabell) vs. els localitzats en àrees cobertes (tronc, part proximal de braços i cames). No es van trobar diferències significatives pel que fa a l'ús de les cabines de bronzejat: l'ús de cabines entre els pacients amb CBCs fotoexposats era del 46.2 %, i entre els pacients amb CBC coberts era del 42.9 %. Tampoc es van trobar diferències per les hores treballades a l'aire lliure, el 23.7 % dels pacients amb CBC fotoexposats vs. el 37.1 % dels pacients amb CBC coberts treballaven almenys 4 hores a l'aire lliure. Finalment, la història de repetides cremades a la infància (≥ 4) apareixia en el 60 % de CBCs localitzats en àrees fotoexposades, i fins a un 85.7 % dels CBCs en àrees cobertes, essent aquesta diferència sí estadísticament significativa ($p = 0.029$) (Figura 13).

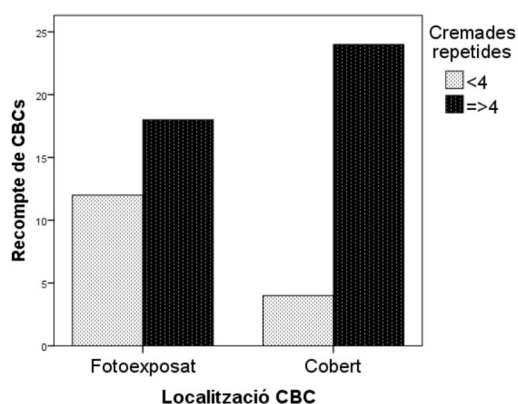


Figura 13. Distribució de les cremades a la infància segons la localització del CBC en la gent jove (àrea fotoexposada vs. àrea coberta) ($p = 0.029$).

Distribució dels FR per al càncer de pell entre la població general de Catalunya

El qüestionari *on-line* de FR va ser completat per 1078 participants, 28 % homes i 72 % dones. La meitat d'ells (51.6 %) tenien edats compreses entre els 30 i els 50 anys (Figura 14.B). Només 26 dels participants van reconèixer una història personal de CQ. Les dades recollides estan resumides a la Taula 4. La distribució dels participants entre les diferents províncies i la proporció d'homes i dones en cada una de les províncies estan representats a la Figura 15. Destaca que la proporció de dones entre els participants és lleugerament més alta a Lleida.

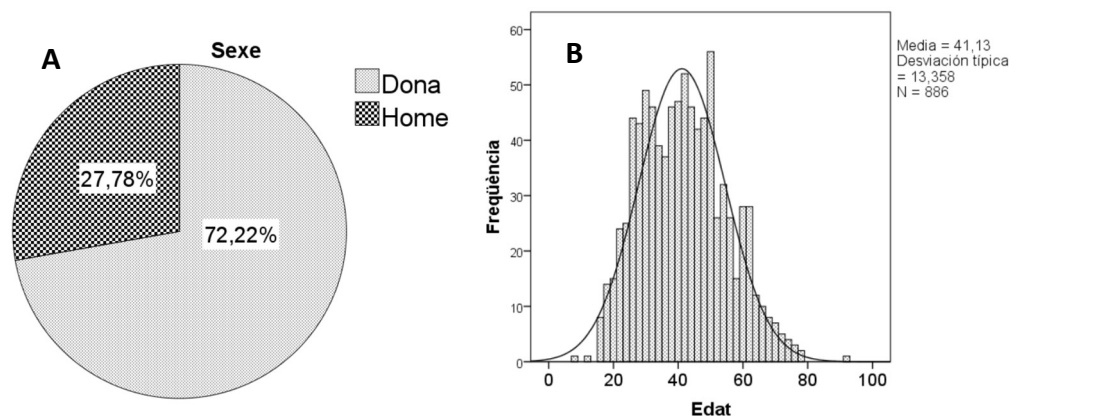


Figura 14. Distribució dels participants segons gèneres (A) i edats (B).

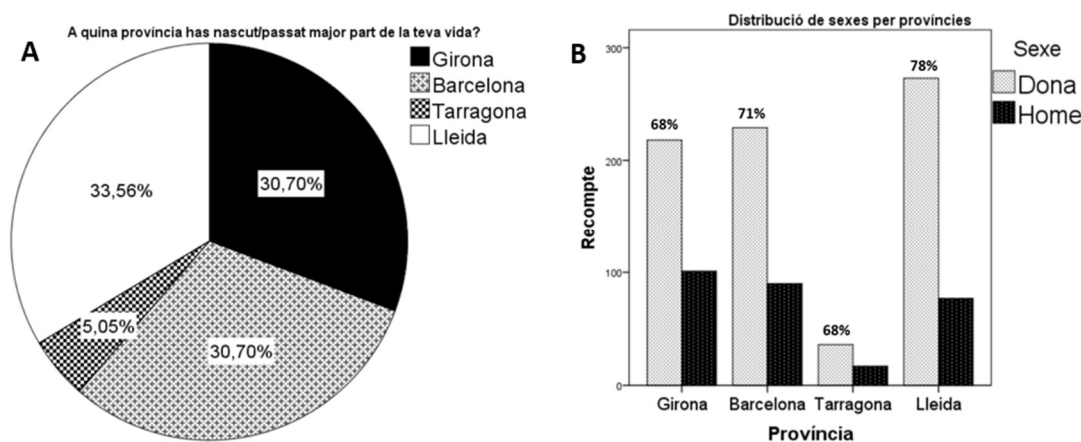


Figura 15. Distribució dels participants entre les diferents províncies (A) i distribució de gèneres entre les diferents províncies (B).

Entre la població general de Catalunya, un 12 % de la gent treballa almenys la meitat del seu temps a l'aire lliure (fins al 20 % dels homes, però només el 10 % de les dones). La proporció es manté força estable entre les diferents províncies (14 % a Girona, 12 % a Barcelona, 8 % a Tarragona i 11 % a Lleida). Gairebé la meitat dels participants (46.1 %) reconeixen ser o haver sigut fumadors (49.5 % entre els homes, 44.8 % entre les dones), amb una mitjana d'anys de fumador de 15.5 anys (DE 9.7).

Taula 4. Distribució dels FR per al càncer de pell entre la població general de Catalunya, i separat per gèneres.

CARACTERÍSTIQUES		GENERAL	DONES	HOMES
Participants	n (%)	1078 (100.0)	767 (72.2)	295 (27.8)
Mitjana d'edat, anys		41.1 (DS 13.4)	41.0 (DS 13.0)	40.8 (DS 13.7)
Color de cabell	n (%)			
	Negre/Marró fosc	395 (37.3)	249 (32.5)	146 (49.5)
	Marró clar	525 (49.5)	409 (53.3)	116 (39.3)
	Ros	121 (11.4)	93 (12.1)	27 (9.2)
	Pèl-roig	19 (1.8)	15 (2.0)	4 (1.4)
Color d'ulls	n (%)			
	Negre/Marró fosc	485 (45.7)	342 (44.6)	143 (48.5)
	Marró clar/avellana	279 (26.3)	199 (25.9)	80 (27.1)
	Verd	207 (19.5)	163 (21.3)	44 (14.9)
	Blau/Blau-gris	90 (8.5)	62 (8.1)	27 (9.2)
Fototipus cutani	n (%)			
	I	21 (2.0)	18 (2.3)	3 (1.0)
	II	191 (18.0)	133 (17.3)	57 (19.3)
	III	418 (39.5)	304 (39.6)	114 (38.6)
	IV	429 (40.5)	310 (40.4)	119 (40.3)
Cremades infància	n (%)			
	< 4	927 (87.3)	669 (87.2)	257 (87.5)
	≥ 4	135 (12.7)	98 (12.8)	37 (12.5)
Ús del protector solar	n (%)			
	No	124 (11.7)	57 (7.4)	67 (22.7)
	Sí, FPS < 50	363 (34.3)	277 (36.1)	85 (28.8)
	Sí, FPS 50 o més	573 (54.0)	432 (56.9)	141 (47.8)
Ús de cabines de bronzejat	n (%)			
	Mai/No	644 (60.9)	382 (50.1)	261 (89.1)
	Alguna vegada/Sí	413 (39.1)	381 (49.9)	32 (10.9)
Sessions de bronzejat	n (%)			
	Mitja (DS)	19.4 (DS 32.7)	20.2 (DS 33.9)	10.9 (DS 10.9)
	1-10	249 (61.6)	224 (60.5)	25 (73.5)
	11-25	85 (21.0)	79 (21.4)	6 (17.6)
	≥26	70 (17.3)	67 (18.1)	3 (8.8)
Edat al primer ús (cabines)	n (%)			
	< 20 anys	34 (8.2)	32 (8.4)	2 (5.9)
	20-29 anys	240 (58.1)	225 (59.4)	15 (44.1)
	≥ 30 anys	139 (33.7)	122 (32.2)	17 (50.0)
Mitjana d'edat al 1r ús, anys		26.9 (DS 7.7)	26.8 (DS 7.5)	29.3 (DS 8.6)
Treballa a l'aire lliure > 4 hores	n (%)			
	Sí	130 (12.3)	70 (9.2)	60 (20.5)
	No	927 (87.7)	693 (90.8)	233 (79.5)
Història familiar de CQ	n (%)			
	Sí	48 (5.7)	38 (6.1)	10 (4.9)
	No	791 (94.3)	588 (93.9)	193 (95.1)
Història familiar de MM	n (%)			
	Sí	28 (3.4)	20 (3.2)	8 (3.9)
	No	806 (96.6)	601 (96.8)	195 (96.1)
Història de fumador	n (%)			
	Sí	488 (46.1)	342 (44.8)	145 (49.5)
	No	570 (53.9)	422 (55.2)	148 (50.5)
Mitjana d'anys de fumador		15.5 (DS 9.7)	15.2 (DS 9.5)	16.3 (DS 10.3)

CQ = Carcinoma de queratinòcits, MM = Melanoma

Del total de participants, independentment de l'edat i el sexe, el 39.1 % reconeixen haver usat les cabines de bronzejat almenys una vegada (50.1 % entre les dones, 10.9 % entre els homes) (Figura 16). La proporció entre les diferents províncies de l'ús de les cabines es manté força estable, excepte pel que fa a Lleida, on es veu un ús més elevat, de fins al 49 % (Figura 17). Aquesta diferència es podria explicar parcialment perquè, tal i com ja hem vist, la proporció de dones entre els participants de Lleida és superior que a la resta de províncies (Figura 15.B), i hem comprovat que les dones són més usuàries de les cabines (Figura 16). Perquè això fos veritat, la proporció de dones que realitzen ús de les cabines en les diferents províncies s'hauria de mantenir estable, però aquest ús és del 49.93 % de mitjana i en canvi del 59.8 % a Lleida (41.3 % a Girona, 46.9 % a Barcelona, 47.2 % a Tarragona i 59.8 % a Lleida). Això significa que la major freqüència de dones no justifica aquest major ús, ja que com veiem la proporció de dones que usen les cabines a Lleida és superior que la de les dones de la resta de províncies. Una altra explicació seria la presència de platja en totes les províncies excepte a Lleida, el que faria que el desig de bronzejar-se es solucionés de diferent manera. Curiosament, pel que fa als homes, aquest augment d'ús a Lleida respecte a la resta de províncies no es manté. Tenim un 13.6 % d'ús de les cabines entre els homes a Girona, 8.9 % a Barcelona, 17.6 % a Tarragona i 11.8 % a Lleida.

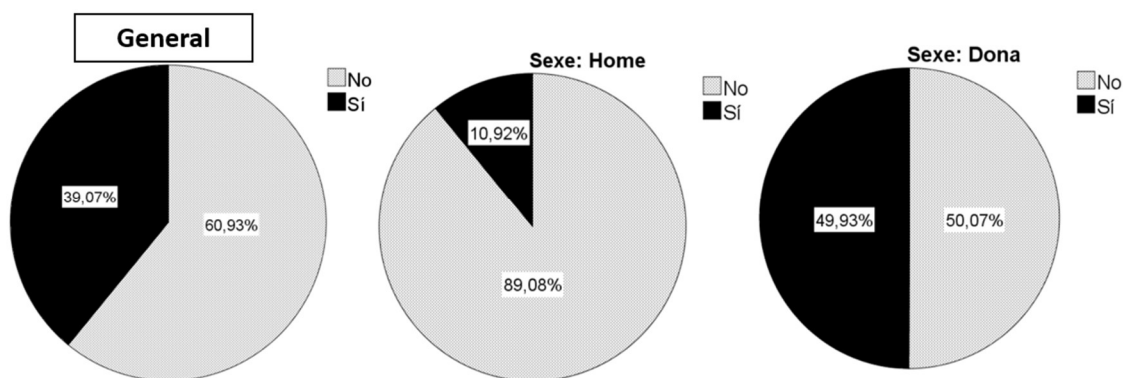


Figura 16. Proporción d'ús de les cabines de bronzejat (sí, almenys una vegada vs. no/mai), entre la població general de Catalunya i dividit per gèneres.

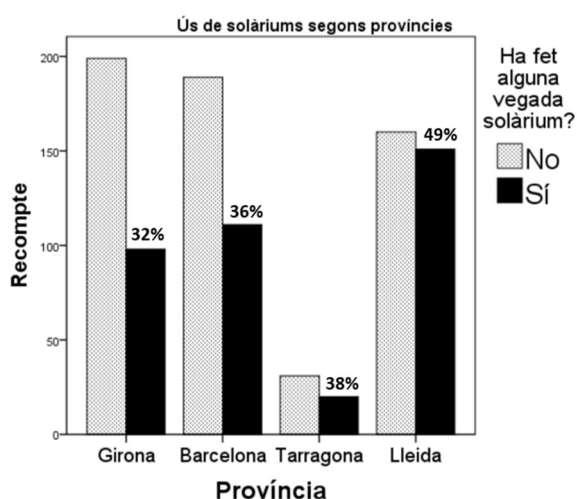


Figura 17. Recompte d'ús de les cabines de bronzejat segons províncies.

Entre la població de Catalunya, el grup d'edat on l'ús de les cabines era més popular va ser entre els 40-49 anys (59 % del general, 71.4 % entre les dones i 21.5 % entre els homes) i entre els 50-59 anys (51 % del general, 63.8 % entre les dones i 14.3 % entre els homes) (Figures 18.A i 19). La distribució de l'ús de les cabines segons el fototipus està representat a la Figura 18.B.

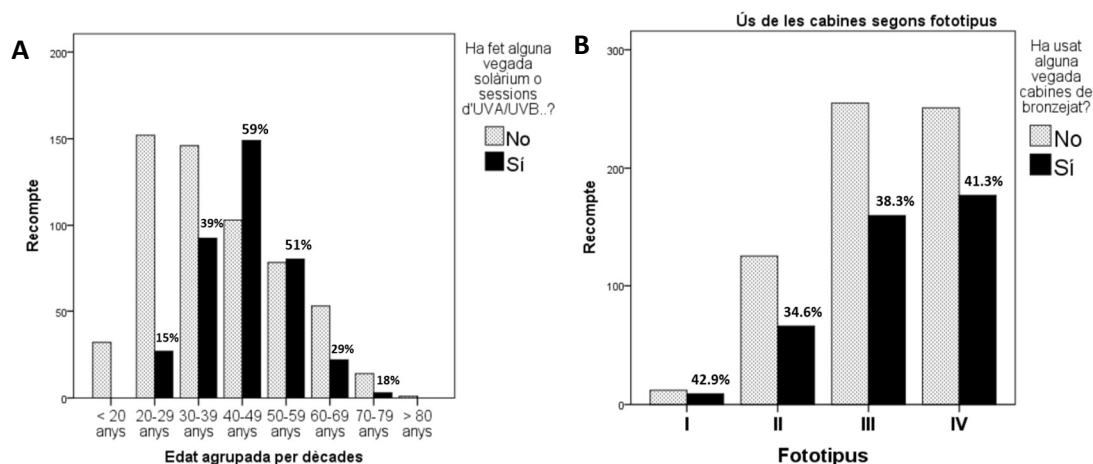


Figura 18. A) Recompte d'ús de les cabines de bronzejat entre la població general de Catalunya classificat segons els grups d'edats en dècades. B) Recompte de l'ús de les cabines de bronzejat entre la població general de Catalunya segons el fototipus.

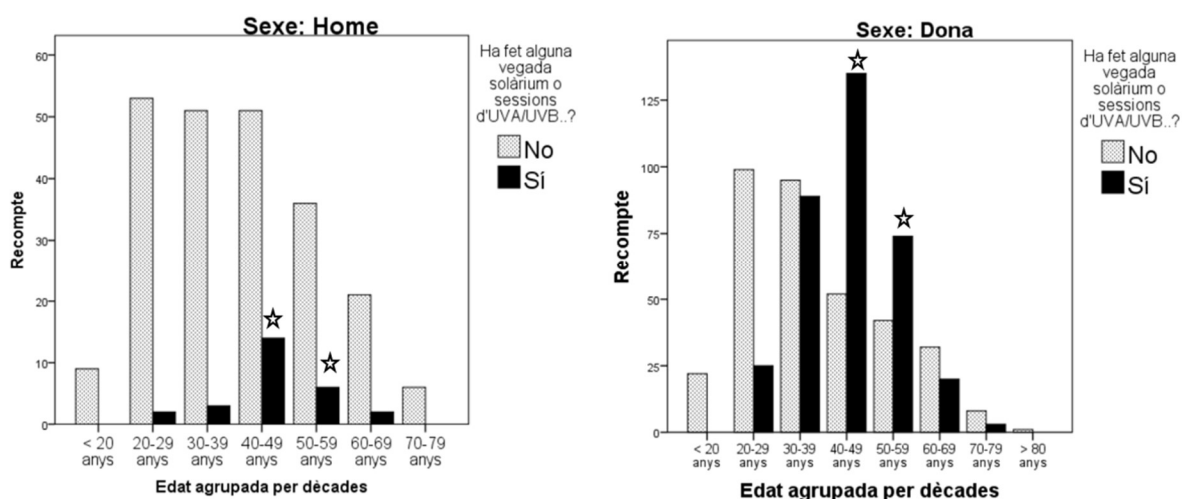


Figura 19. Recompte d'ús de les cabines de bronzejat entre la població general de Catalunya classificat segons els grups d'edats en dècades, en homes i en dones.

L'edat més freqüent al primer ús de les cabines de bronzejat va ser entre els 20-29 anys (58.1 %), amb una mitjana d'edat de 26.9 anys (DE 7.7). Fins a un 8.2 % dels participants l'han usat abans dels 20 anys. Quan classifiquem els participants entre ≤ 45 anys i > 45 anys, en els dos grups es manté l'edat més freqüent al primer ús entre els 20-29 anys (81 % i 60.6 %, respectivament). Del total, 61.6 % dels participants han usat les cabines entre 1-10 sessions, el 21 % entre 11-25 sessions, i fins a un 17.3 % per ≥ 26 sessions.

Per tal d'estudiar les tendències dels factors de risc, vam dividir els participants entre ≤ 45 anys i > 45 anys. Vam trobar diferències significatives positives pel tabaquisme (41.5 % de fumadors entre els ≤ 45 anys i 53.4 % entre els > 45 anys, $p < 0.001$), l'ús del protector solar (9.9 % de participants ≤ 45 anys no

l'utilitzen i 15.6 % dels > 45 anys no ho fan, $p = 0.009$) i l'ús de cabines de bronzejat (34.5 % d'usuaris entre els ≤ 45 anys i 47.2 % entre els > 45, $p < 0.001$) (Figura 20). Per altra banda, no hi havia diferències significatives pel que fa a les cremades repetides durant la infància (referides per 11.7 % dels participants del grup ≤ 45 anys i per un 12.7 % del grup de > 45 anys), ni tampoc per les feines a l'aire lliure (realitzades per un 12.8 % dels ≤ 45 anys i per un 11.3 % dels > 45 anys). El percentatge de dones és pràcticament el mateix en els dos grups d'edat (72.9 % vs. 73.7 %) (Figura 20).

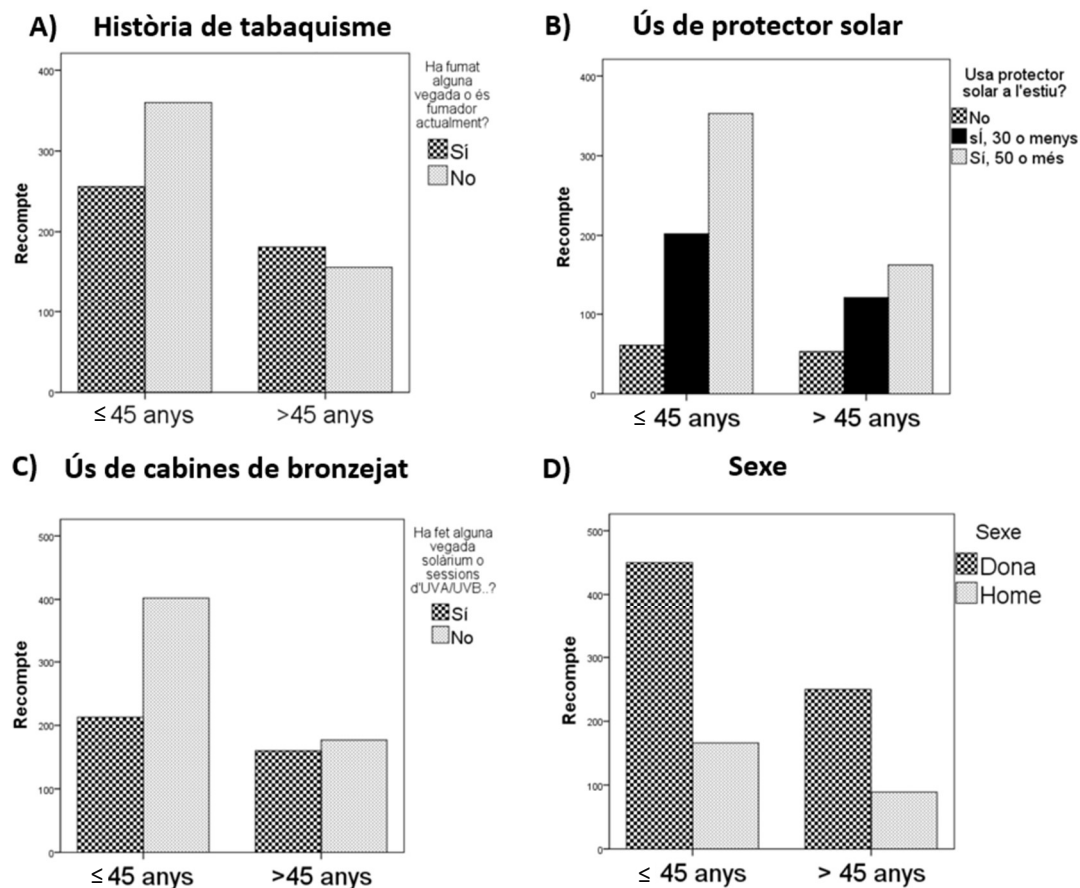


Figura 20. Recompte de tabaquisme (A), ús del protector solar (B), ús de les cabines de bronzejat (C), i sexe (D), classificat segons edat (menors o majors de 45 anys).

Per tant, segons aquestes dades, trobem una tendència significativa entre els pacients ≤ 45 anys cap a un major ús del protector solar, però el mateix percentatge de cremades durant la infància. En la nostra àrea mediterrània, l'ús del protector solar no va esdevenir regular fins a la dècada dels anys 90. Aquest fet deixaria un gran nombre de participants de la cohort " ≤ 45 anys" fora de l'època òptima per a beneficiar-se de l'ús del protector solar durant la seva infància, concretament el grup de 30 a 45 anys. Per tal d'estudiar més a fons aquesta dada, vam comparar la cohort ≤ 30 anys (que teòricament s'hauria beneficiat de l'ús del protector solar durant la infància) vs. els > 30 anys. D'aquesta manera, sí que trobem diferències estadísticament significatives entre els dos grups pel que fa a les cremades repetides durant la infància (8.5 % presentaven cremades entre els ≤ 30 anys i 13.2 % entre els > 30 anys, $p = 0.003$). Aquesta troballa és un reforç positiu per a insistir amb l'ús del protector solar entre els infants i la gent jove, per tal d'evitar cremades solars a una edat més sensible.

Discussió

Treballs previs assenyalen que els diferents subtipus histològics de CBC tenen diferents comportaments biològics i també diferent etiologia⁵⁵⁻⁵⁷. Les nostres dades demostren, consistent amb el que trobem publicat⁵⁰⁻⁵², que els CBCs diagnosticats en gent jove es presenten més freqüentment al tronc i són del subtipus superficial. Això suggereix, tal com ja s'ha descrit pel melanoma⁵⁸, que l'etiologia dels CBCs entre els pacients d'edats avançades és atribuïble sobretot a l'exposició acumulada als raigs UV en àrees fotoexposades, mentre que entre pacients joves es deuria més aviat a una exposició intermitent als raigs UV en àrees habitualment cobertes, com el tronc. Recolzant aquesta idea, hem trobat que la història de repetides cremades durant la infància era més freqüent entre els casos que entre els controls ($p = 0.003$), i a més a més, que era més freqüent entre els CBCs de pacients joves localitzats en zones cobertes que entre els que es localitzaven en zones exposades al sol ($p = 0.029$). Tanmateix, fins a un 59 % dels CBCs diagnosticats en gent jove del període 2013-2017 estaven localitzats en àrees exposades al sol, suggerint també un paper pel dany UV acumulat. De totes maneres, la distribució de pacients que realitzen un treball a l'aire lliure (que es podria considerar un tipus de dany solar crònic⁵⁹) és superior entre els pacient que tenen un CBC en una àrea coberta (37.1 %) que en una àrea fotoexposada (23.7 %). Una limitació d'aquesta dada és que no es va interrogar als participants que treballaven a l'aire lliure sobre si ho feien amb el tronc exposat al sol la major part del temps o no. Per tant, caldrà realitzar més estudis en aquest subgrup de pacients, gent jove amb CBC en àrees fotoexposades, per veure quina és la rellevància dels factors de risc entre ells.

Una de les limitacions del nostre estudi de casos i controls és la taxa de resposta del 64 %. Es van realitzar tres trucades telefòniques abans de classificar a un cas com a no responedor. Alguns dels participants van respondre a la primera trucada telefònica, d'altres a la segona o inclòs a la tercera, sense haver-hi diferències entre ells relacionades amb els FR. No reconèixer el número telefònic de procedència va ser la raó principal per la qual els participants no responien a la primera trucada. Aquest problema estava relacionat amb el fet que alguns participants eren contraris a respondre a trucades de números desconeguts, ja que normalment consisteixen en publicitat o estafes. Podriem assumir doncs, que els factors de no-resposta no estan relacionats amb els factors de risc i que per tant no afecten les conclusions de l'estudi. Per altra banda, les històries clíniques dels pacients no responedors es van revisar per descartar defuncions relacionades amb els FR, i tots els pacients estaven vius.

Vam trobar diversos factors de risc significatius pel CBC en gent jove (Taula 3), però a diferència del que estava publicat prèviament⁵¹⁻⁵³, l'ús de les cabines de bronzejat no sembla estar entre ells. No hi havia diferències entre els casos i els controls, ni pel que fa al seu ús (sí vs. no) ni pel que fa al nombre de sessions. Malgrat això, val la pena destacar que entre els casos, els que usaven les cabines de bronzejat eren més freqüentment fototipus I-II, i entre els controls, fototipus III-IV (Figura 7). Això suggereix, tal com sembla lògic, que en una població entre la qual és molt popular l'ús de les cabines de bronzejat (ús general a Catalunya del 39.1 %, i a Lleida del 49 %) els que tinguin un fototipus clar són els que tenen un risc més alt de desenvolupar un CBC a edats més joves.

Tanmateix, tal com havien demostrat prèviament Zhang *et al*⁶⁰ a partir de dades d'una gran cohort d'infermeres dels Estats Units, l'ús de les cabines de bronzejat està associat a un major risc de desenvolupar un CBC (tot i que no específicament a edats precoces) per a tots els tipus de pell i per a

qualsevol dispositiu (UVA, UVB). En la nostra cohort del 2017, tot i que si considerem tots els casos de CBC la incidència entre els homes encara és més gran que entre les dones (de fet, els homes segueixen treballant a l'aire lliure el doble que les dones, Taula 4), la tendència entre els < 60 anys és que la incidència entre les dones esdevé gairebé el doble que la dels homes, 281.7 vs. 176.5/100 000, respectivament. Pel període 2014-2016 (dades que no es mostren en els resultats) trobem una tendència creixent, tant pel que fa al nombre de casos absoluts de CBC com pel que fa al percentatge de dones (2014: 831 CBCs i 39.8 % de dones; 2015: 874 CBCs i 41.2 % de dones; 2016: 885 CBCs i 44.3 % de dones). Aquestes dades donen suport a treballs realitzats prèviament a nivell mundial, on s'observa una tendència creixent de la proporció de dones amb CBC⁴⁹⁻⁵⁰, tanmateix, la informació sobre FR o sobre l'ús de les cabines de bronzejat en aquelles poblacions no està disponible per a ser contrastada pel mateix període⁶¹⁻⁶². L'ús de les cabines de bronzejat en la nostra població és del 50.1 % entre les dones i de fins al 71.4 % entre les dones de 40-49 anys, però només del 10.9 % entre els homes i del 21.5 % entre els homes de 40-49 anys. Per tant, les dones són més usuàries de les cabines, i tal com podem veure a la Taula 4, ho fan a edats més joves i amb més sessions que no pas els homes. A més a més, l'ús de les cabines de bronzejat és l'únic FR més freqüent entre les dones que entre els homes en la població general (Taula 4).

Per tant, sembla que una exposició precoç a les cabines de bronzejat en persones de pell clara predisposaria a un augment del risc de patir un CBC a edats més joves, però que amb el lapse de temps suficient, les cabines de bronzejat predisposen a un augment del risc de patir CBC a llarg termini per a qualsevol tipus de pell, essent un factor decisiu en el canvi de la clàssica predominança masculina del CBC cap a una predominança femenina en els darrers anys. Recolzant aquesta idea, un treball publicat recentment⁶³ sobre la població Islandesa, descriu per primera vegada una incidència del CBC més gran entre les dones que entre els homes per a qualsevol grup d'edat, explicada principalment per l'augment de l'ús de les cabines de bronzejat. Es d'esperar, que en una àrea geogràfica amb tan baixa radiació solar (Islàndia), les diferències degudes a l'ús de les cabines de bronzejat es manifestin abans i de manera més clara, que no pas en les poblacions mediterrànies, on la incidència del CBC és molt més gran (i l'augment per l'ús de les cabines queda diluït).

La prevalença de l'ús de les cabines de bronzejat de 30 països Europeus també ha sigut publicada⁶⁴. Els autors troben una prevalença global a Europa del 10.6 %, i a Espanya del 19.3 %, molt més baixa que la del 39.1 % amb les nostres dades de Catalunya. Es podria explicar parcialment perquè en el seu treball hi havia una participació femenina del 65.2 %, mentre que la nostra és del 72 %. De totes maneres, el possible biaix de selecció en el seu estudi, els participants eren reclutats a través d'una campanya de cribratge del càncer de pell (Campanya Euromelanoma), podria justificar també part de la diferència. Això pot significar que l'ús de les cabines de bronzejat podria ser encara superior al que indiquen les dades dels treballs publicats.

La fototeràpia té un paper fonamental en el tractament de múltiples patologies dermatològiques. Les dades dels estudis realitzats fins ara pel que fa a la hipotètica relació entre aquests tractaments i els carcinomes de queratinòcits (CQ) és inconsistent. Raoene *et al.*⁶⁵ descriuen un major risc de CQ entre els seus pacients tractats amb fototeràpia, especialment de CBCs superficials localitzats al tronc, com a resultat de l'exposició holocorporal intermitent. Segons les seves troballes, i les dades que ens ocupen, creiem que la fototeràpia hauria de ser limitada en pacients amb un major risc de desenvolupar CQ, és a dir, gent jove (< 20 anys), amb fototipus clars (I-II) i història personal/familiar de CQ o de melanoma⁶⁶.

Pel que fa a la distribució dels FR entre la població general, trobem una tendència significativa entre la gent jove (≤ 45 anys) cap a un menor ús de les cabines de bronzejat i cap a un major ús del protector solar. A més a més, si tenim en compte la cohort que s'ha beneficiat més de l'ús del protector solar durant la infància des de que aquest va esdevenir regular a la dècada dels anys 90, trobem també una tendència significativa a patir menys cremades durant la infància. Aquest darrer és un dels principals FR pel CBC (i pel CBC en gent jove) que es pot abordar en les campanyes de prevenció. Creiem que aquesta dada és un reforç positiu important de cara a formular futures campanyes de prevenció del càncer de pell. Caldrà veure però en un futur si aquesta reducció de les cremades a la infància es tradueix després amb una reducció de la incidència del CBC.

Cal destacar però, que la informació recollida a través d'enquestes *on-line* podria comportar certs biaixos, que serien una limitació d'aquest tipus d'estudi, i per tant, també del nostre. El primer problema seria el biaix de selecció. Els participants són voluntaris, fet que podria seleccionar un tipus de població en particular, més compromesa o preocupada, i podria ser la causa, per exemple, de l'alta proporció de dones (que també trobaven a l'estudi de la campanya euromelanoma⁶⁴). Un altre problema seria el biaix d'informació. El fototipus cutani, al ser autoinformat, implica la subjectivitat de l'autopercepció. En una població amb un ús tan elevat de les cabines de bronzejat podria passar que aquests usuaris tinguin una percepció d'ells mateixos de més bronzejats i menys sensibles al sol, informant de fototipus cutanis més alts (biaix de desitjabilitat social). Els factors de risc s'esperaria que fossin infrainformats, també pel biaix de desitjabilitat social, al ser "mals hàbits", però l'alta proporció d'usuaris reconeguts de cabines de bronzejat o de fumadors fa que aquest biaix sembli, almenys, improbable.

Fins on arriba el nostre coneixement actual, aquesta és la primera vegada que la incidència del CBC en la població general (i les diferències entre els pacients joves i els grans), els FR en gent jove, i la distribució dels FR entre la població general, comparant homes i dones, s'estudien per un mateix període i població, permetent contrastar totes les dades alhora. Això ens permet desvelar de manera més fiable les possibles causes dels canvis que està experimentant la incidència del CBC en homes i en dones en els darrers anys. Degut a l'augment de la seva incidència, hauríem de conèixer les causes de la nova predominança femenina, els FR més rellevants per a patir un CBC a edats més joves, i la distribució d'aquests FR entre la població general, per tal de dur a terme campanyes de prevenció més dirigides. Aquestes dades que presentem aquí tenen rellevància per a la salut pública de cara a les futures intervencions que serviran per a poder reduir l'impacte del CBC en la salut dels nostres pacients.

Capítol II

Comparació dels diferents mètodes d'extracció de TIF per a l'anàlisi proteòmica en mostres de càncer cutani no melanoma

Capítol II: Comparació dels diferents mètodes d'extracció de TIF per a l'anàlisi proteòmica en mostres de càncer cutani no melanoma

Introducció

L'anàlisi proteòmica és una metodologia ben establerta en oncologia molecular⁶⁷. Malgrat això, els mètodes per a l'estudi de la proteòmica requereixen un esforç considerable a l'hora de configurar-ne cadascun dels passos, per tal de minimitzar la variabilitat analítica i pre-analítica. L'objectiu principal és realitzar experiments reproduïbles i obtenir llistes fiables de proteïnes candidates. El primer pas de tot aquest procés és l'obtenció de la mostra. Definitivament, la qualitat del material inicial és un pre-requisit determinant de cara a la validesa dels resultats finals. A més a més, és important considerar que l'obtenció/preparació de la mostra no està automatitzada en la majoria dels experiments⁶⁸. Per tant, aquest pas inicial és una de les principals fonts de variabilitat experimental⁶⁹.

Disponibles a la bibliografia publicada en llengua anglesa trobem descrites diferents tècniques per a aïllar el fluid intersticial tumoral (de l'anglès, TIF), aplicades a diferents tumors⁷⁰. Això és perquè no és feina fàcil triar el mètode més adequat, ja que depèn de moltes variables⁷¹. Per exemple, és important considerar paràmetres tan diversos com quin és el propòsit analític de l'experiment, la quantitat de trencament cel·lular, o el volum de TIF que es pretén recuperar. No existeix en l'actualitat un mètode definit com el més adequat per a obtenir mostres de TIF de tumors primaris, i els mètodes disponibles tampoc han sigut mai comparats entre ells en un mateix tumor. En aquesta part del treball hem aplicat els diferents mètodes que s'han descrit en la literatura per aïllar el TIF en mostres de CEC. L'objectiu és comparar-los entre ells en iguals condicions i mostra tumoral per a poder definir quin és el més adequat, almenys per les mostres de tumors cutanis.

Material i mètodes

Obtenció de les mostres

Les mostres de CEC utilitzades en aquest apartat del treball provenen de l'excedent de mostra que s'obté després de l'exèresi quirúrgica dels tumors en la secció de Dermatologia de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, amb la pertinent aprovació per part del comitè ètic de l'hospital (CEIC-1958). Es tracta, doncs, de CECs primaris de mida $\geq 1.5\text{-}2$ cm (per tal d'assegurar que hi haurà suficient mostra excedent) que provenen de pacients que han donat el seu consentiment informat per escrit.

Després de l'exèresi quirúrgica, el tumor és irrigat amb abundant sèrum fisiològic estèril per tal d'eliminar els coàguls de sang. Les mostres per a l'estudi provenen de la superfície tumoral, concretament d'una àrea sense necrosi intensa o inflamació. S'obtenen mitjançant curetatge (amb curetes d'un sol ús). De seguida, la mostra és recollida amb unes pinces estèrils i es col·loca en una placa de 6 pous que contenen 1 ml de buffer fosfat salí (PBS). Amb les pinces es sacseja la mostra

curosament i es repeteix el bany 3 vegades. Finalment el teixit de cada mostra es fragmenta en diferents parts, iguals en volum i característiques, per tal de ser processades per a obtenir el TIF a través dels diferents mètodes.

Mètodes per a obtenir TIF descrits a la literatura i comparats en aquest treball

1. Mètode per elució (Mètode A)

Per a obtenir el TIF amb el mètode d'elució vam seguir el protocol publicat per Celis *et al*⁷², amb petites adaptacions. En aquest mètode, la composició de proteïnes del TIF depèn essencialment de la difusió d'aquestes proteïnes des de l'interstici del teixit tumoral cap al PBS. Ja que l'interstici de la pell és ric en col·lagen, i per tant és més dens que el d'altres teixits⁷³, vam incubar les mostres durant dues hores, en comptes d'una, per tal d'estendre el temps de difusió de les proteïnes cap al PBS.

La mostra és fragmentada en peces de 0.1 gr, evitant tant com sigui possible el trencament cel·lular amb les mínimes manipulacions. La fragmentació del teixit és realitzada a l'interior d'una placa amb PBS, per a evitar l'evaporació del TIF. Posteriorment es fa l'elució en una placa que conté 750 µl de PBS amb inhibidors de proteases i fosfatases (PBSi), durant dues hores a 37 °C i 5 % de CO₂. Finalment es recuperen 500 µl del PBSi (que conté el TIF que s'hi ha difós) i es filtra (0.45 µm) per a evitar la contaminació amb cèl·lules. La concentració de proteïnes varia de 3 a 10 mg/ml, segons el volum de la mostra tumoral inicial. Aquesta mostra final de TIF es manté a -80 °C fins al moment de l'anàlisi proteòmica.

2. Mètode per centrifugació (Mètode B)

La mostra s'eixuga curosament amb paper secant per tal de retirar l'excés de PBS i es col·loca en *ependorfs* de 2 ml amb filtre per tal de ser centrifugat. Aquests dos passos són duts a terme ràpidament per a evitar l'evaporació del TIF del teixit. Immediatament les mostres es centrifuguen a 10 000 g durant 20 minuts a 4 °C. Es recuperen uns 5-15 µl de TIF acumulats al fons de l'*ependorf*, segons la mida del tumor. S'afegeix PBSi fins a aconseguir homogeneïtzar totes les mostres amb un volum final de 50 µl. La concentració de proteïnes varia de 5 a 30 mg/ml, segons el volum de la mostra tumoral inicial. Aquesta mostra final es manté a -80 °C fins al moment de l'anàlisi proteòmica.

Abans de procedir a l'anàlisi proteòmica mitjançant espectrometria de masses, vam comprovar la qualitat de les mostres mitjançant *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (SDS-PAGE) i tinció amb blau de coomassie (Figura 21). En el gel podem veure que el perfil proteòmic de la mostra de CEC difereix de manera substancial del perfil del plasma, i que està enriquit sobretot amb proteïnes de baix pes molecular (menors que l'albumina) independentment del mètode usat.

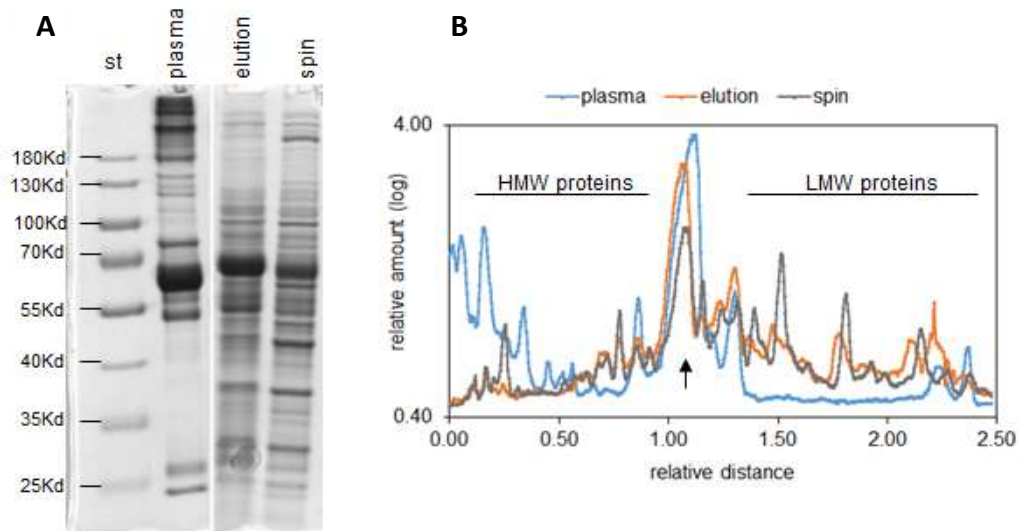


Figura 21. Processament de les mostres de CEC mitjançant els diferents mètodes. A) Gel de poliacrilamida al 10 % on s'analitzen les mostres de TIF obtingudes d'una mateixa biòpsia SCC6 per elució (7.5 μ l) i per centrifugació a 10 000 g (5 μ l). Es mostra la foto del gel tenyit amb blau de Coomassie. **B)** Perfil de proteïnes obtingut del gel de l'apartat A amb el programa *Image J*. Elució = *elution*, Centrifugació = *spin*. Una mostra de pes molecular estàndard (st) i de plasma també es mostren a mode de control. Les regions d'alt i baix pes molecular s'indiquen com a HMW i LMW, respectivament. La fletxa indica la posició del pic d'albumina.

Posteriorment, per a assegurar-nos que les mostres que estàvem obtenint eren representatives del TIF, vam comprovar la presència de vinculina mitjançant *western-blot*, tal i com s'havia descrit prèviament en d'altres treballs realitzats amb TIF⁷⁴. Aquesta era positiva en les mostres de TIF i negativa en el sèrum (Figura 22).

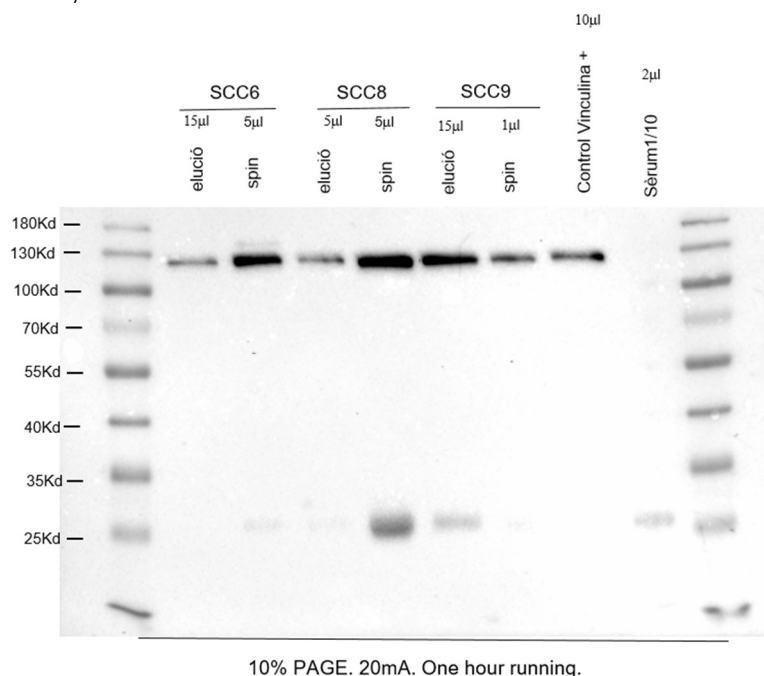


Figura 22. Estudi de l'expressió de vinculina mitjançant *Western-blot* en mostres de CEC obtingudes per elució i per centrifugació (SCC6, SCC8, SCC9; elució i *spin*), així com en un control + per vinculina i en el sèrum d'un pacient. Els nombres indiquen la quantitat de mostra carregada per cada condició.

Anàlisi proteòmica de les mostres de TIF

Extracció, quantificació i digestió de proteïnes

Es van barrejar les mostres de TIF amb Urea 6 M / 200 mM i Bicarbonat Amònic (ABC), per tal de facilitar la solubilització de les proteïnes. Seguidament es van quantificar amb el kit *RCDC Protein Assay* (Biorad, #5000-120). Deu µg de proteïna de cada mostra van ésser digerits mitjançant LysC i Tripsina. Posteriorment, les mostres es van reduir a la thermo-mixer amb 10 mM de dithiothreitol (DTT, en ABC 200 mM) durant 1 hora a 37 °C i 650 rpm, quelades amb 20 mM de iodoacetamida (IAA, en 200 mM ABC) a 650 rpm a la thermo-mixer, durant 30 minuts a temperatura ambient i a les fosques. Després es van dissoldre les mostres fins a una concentració final de 2 M Urea i la quantitat requerida de 1 µg/µl LysC (WAKO, #125-05061) es va afegir per a assolir una rati 1:10 d'enzim:proteïna (w:w). La digestió es va dur a terme *overnight* a la thermo-mixer a 650 rpm i 37 °C. Posteriorment les mostres es van dissoldre de nou fins a una concentració final de 1 M Urea, es va afegir la quantitat total de 1 µg/µl de tripsina (*sequencing-grade*, Promega, #V5280) per tenir una rati de 1:10 enzim:proteïna (w:w) i es van incubar durant 8 hores a la thermo-mixer a 37 °C i 650 rpm.

Dessalinització dels pèptids

Es va dessalinitzar la barreja de pèptids mitjançant les columnes comercials *Ultra Microspin C18, 300A silica* (The Nest Group, #SUM SS18V), seguint les instruccions del fabricant. Finalment les mostres es van assecar amb la *SpeedVac* i es van mantenir a -20 °C durant l'anàlisi proteòmica amb *liquid chromatography - tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS).

Anàlisi LC-MS/MS

Els pèptids es van resuspendre amb 45 µL d'acetonitrila 3 % / àcid fòrmic 1 % i una quantitat de 4.5 µL (2 µg) es va injectar a l'espectrometre de masses Orbitrap Fusion Lumos. La mostra es va carregar a 300 µm × 5 mm C18 PepMap100, 5mm, 100Å (Thermo Scientific) a una taxa de fluxe de 15 µL/min utilitzant el sistema cromatogràfic Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific). Els pèptids es van separar utilitzant una columna analítica C18 (nanoEase™ M/Z HSS C18 T3 (75 µm × 25 cm, 100Å, Waters) corrent durant 180 minuts, abastant tres passos consecutius amb gradients linears des del 3 % al 35 % B en 150 min, des del 35 % al 50 % B en 5 min, des del 50 % al 85 % B en 2 min, seguits d'una elució isocràtica al 85 % B en 5 min i estabilització a les condicions inicials (A = 0.1 % FA en aigua, B = 0.1 % FA en CH₃CN) a una taxa de flux de 250 nL/min. Les sortides de les columnes estaven directament connectades a un Advion TriVersa NanoMate (Advion) ajustat a l'espectròmetre de masses Orbitrap Fusion Lumos™ Tribrid (Thermo). L'espectròmetre de masses operava en mode d'adquisició dades dependent (DDA).

L'estudi d'exploració d'MS es va realitzar a l'Orbitrap amb la resolució establerta en 120 000 (definida a 200 m/z). La massa de bloqueig es va definir per 445.12 m/z per cada exploració Orbitrap. Els ions de velocitat màxima (més intensos) per exploració van ser fragmentats per CID. L'MSMS es va detectar a la presa d'ions (amb temps d'injecció màxima de 35 ms). El valor objectiu del recompte d'ions va ser de 400 000 per a l'escaneig de la mostra i de 10 000 (CID) per a l'exploració MS/MS. Els ions objectiu ja seleccionats per a MS/MS van ser exclosos dinàmicament durant 15 segons. La tensió de polvorització a la font NanoMate es va establir a 1.70 kV. Les lents RF es van ajustar al 30 %. El senyal mínim necessari per a activar el commutador MS a MS/MS es va establir a 5000 i l'activació Q va ser de 0.250.

L'espectròmetre funcionava en mode de polaritat positiva i els precursors d'estat de càrrega única van ser rebutjats per fragmentació. Totes les dades es van obtenir amb el programari Xcalibur v4.0.27.10.

Anàlisi de dades proteòmiques

Processament de dades en brut i cerca de bases de dades

Per a la identificació i quantificació de pèptids es va fer servir el programari *Proteome Discoverer software suite* (v2.0, Thermo Fisher Scientific) i el *Mascot search engine* (v2.5, Matrix Science). Les mostres es van cercar a la base de dades *SwissProt* que contenia entrades corresponents a humans (versió de març de 2018), per a descartar el llistat de contaminants habituals i identificar totes les entrades corresponents a esquers. Es va triar la tripsina com a enzim i es van permetre un màxim de tres escissions. La carbamidometilació (C) es va establir com una modificació fixa, mentre que l'oxidació (M) i l'acetilació (N-terminal) es van utilitzar com a modificacions variables.

Les cerques es van realitzar mitjançant una tolerància de pèptids de 7 ppm i una tolerància de ions de 0.5 Da. Els fitxers de dades resultants es van filtrar per a FDR < 1 % (rati de falses descobertes, de l'anglès, FDR). De forma alternativa, l'anàlisi de dades de les mostres de triplicats es va realitzar amb el programari *MaxQuant* (versió 1.6.7.0) buscant a la base de dades *Swissprot* humana (versió octubre 2019).

La llista final de pèptids va ser obtinguda després d'aplicar un 1 % de rati de falses descobertes. D'aquestes, només es van considerar les proteïnes amb almenys un pèptid assignat després d'aplicar un 1 % de FDR. Els pèptids no únics es van assignar al grup proteic corresponent segons la regla de pèptids Razor implementada al programari (principi de parsimonia). Només es va permetre la pèrdua de dues escissions i es va definir la carbamidometilació en cisteïnes com a modificació fixa mentre que l'oxidació de metionina i l'acetilació N-terminal de proteïnes es van definir com a modificacions variables. L'opció "*match between runs*" també estava habilitada. Finalment, es van filtrar els pèptids i proteïnes identificats per a eliminar aquells etiquetats com a "inversos" (identificats significativament a la base de dades inversa), "contaminant potencial" (elements identificats com a contaminants al fitxer "contaminants.fasta") i "només identificats pel lloc" (proteïnes identificades només amb pèptids modificats). Les dades en brut i els fitxers processats es van penjar al dipòsit PRIDE amb el codi d'adhesió del projecte PXD016261.

Anàlisi bioinformàtic

El maneig de les llistes de proteïnes creades amb *Proteome Discoverer* i *MaxQuant*, així com la generació de diagrames de Venn i de gràfics de barres, es van realitzar amb R (3.5.2) i R Studio (1.1.419) amb l'ajuda del paquet "*Vennerable*". L'anàlisi de la vesiclepedia es va realitzar amb les proteïnes identificades tant en els mètodes d'elució (2767) com de centrifugació (2869). Amb aquesta finalitat, es va descarregar la base de dades (versió del novembre de 2019) i es va fer la recerca de les proteïnes descrites anteriorment.

Anàlisi d'enriquiment d'ontologia gènica

L'anàlisi d'enriquiment d'ontologia gènica (GO) es va realitzar amb l'eina *DAVID Bioinformatics*⁷⁵ (<https://david.ncifcrf.gov/>) mitjançant la funcionalitat "*Functional Annotation*". Per a aquesta anàlisi, es van seleccionar tots els nivells d'especificitat de l'ontologia "*Cellular Compartment*" (GOTERM_CC_ALL) i es va escollir l'opció "*Functional Annotation Clustering*" per a la visualització dels resultats. El llistat

d'enriquiment o importància estadística (puntuació EASE) es va establir en 0.001. Els termes de GO enriquits relacionats amb els diferents compartiments cel·lulars es van extreure amb R (3.5.2) i R Studio (1.1.419).

Resultats de les comparacions i discussió

TIF obtingut per centrifugació

El primer pas va ser configurar el mètode de centrifugació⁷⁶⁻⁷⁷. Un element clau en aquest mètode és establir els paràmetres, com la força de centrifugació (g) i el temps. Una força o un temps excessius podrien causar ruptura cel·lular i per tant contaminació del TIF amb proteïnes d'origen intracel·lular. Per altra banda, cal considerar les característiques particulars del teixit amb el qual es treballa (aquí, mostres de tumors cutanis, riques en col·lagen). Amb les mostres de CEC es requeria treballar a altes g per a obtenir suficient TIF. Per sota de 800 g, el volum recuperat era pràcticament inexistent (< 1 µl). A 800 g durant 20 minuts el volum era menor de 5 µl, depenent de la quantitat de la mostra. Obteníem volums suficients de TIF en totes les mostres (entre 5 i 15 µl) després de centrifugar-les a 10 000 g durant 20 minuts, ja que d'altra manera moltes de les mostres eren insuficients.

Posteriorment vam comparar mitjançant SDS-PAGE els perfils proteòmics obtinguts a 800 g i a 10 000 g d'una de les mostres analitzades (SCC19). L'objectiu era estudiar quin grau de lisi cel·lular observàvem en cada un i si augmentava significativament a 10 000 g respecte 800 g. Les dues velocitats presentaven perfils proteòmics similars, enriquits amb proteïnes de baix pes molecular quan eren comparades amb el plasma (Figura 23).

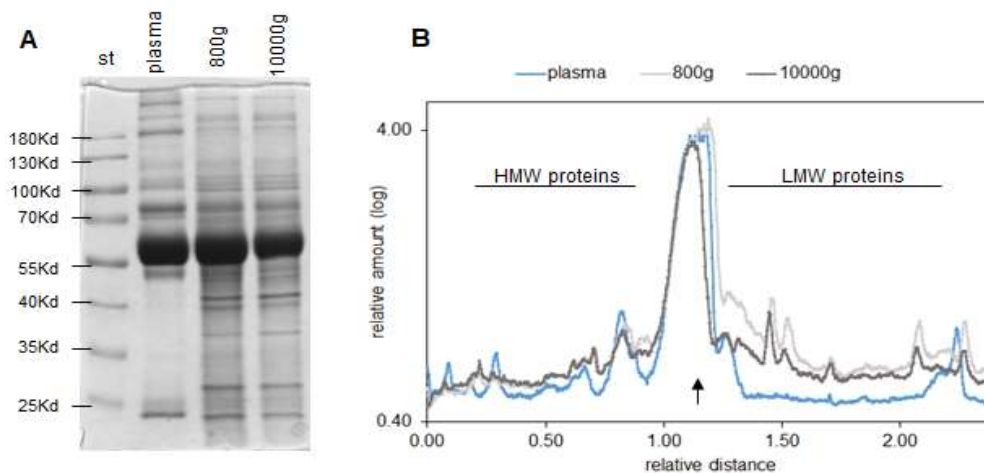


Figura 23. Processament de la mostra de CEC (SCC19) mitjançant les diferents forces de centrifugació. A) Gel de poliacrilamida al 10% on s'analitzen les mostres de TIF obtingudes d'una mateixa biòpsia SCC19 per centrifugació a 800 g (5 µl) i a 10 000 g (2.5 µl). Es mostra la foto del gel tenyit amb blau de Coomassie. **B)** Perfil de proteïnes obtingut del gel de l'apartat A amb el programa *Image J*. Una mostra de pes molecular estàndard (st) i de plasma també es mostren a mode de control. Les regions d'alt i baix pes molecular s'indiquen com a HMW i LMW, respectivament. La fletxa indica la posició del pic d'albumina.

Després, per tal de visualitzar la influència que tenia la força de centrifugació en la composició del proteoma del TIF, vam estudiar mitjançant espectrometria de masses dues mostres de CEC (SCC18 i SCC19), cada una d'elles dividida en dues parts iguals, per ser centrifugades a baixes i altes revolucions

(quatre mostres en total). El diagrama de Venn de la Figura 24 mostra la superposició de les proteïnes identificades en cada una de les dues condicions de centrifugació (800 vs. 10 000 g). El 90 % de les proteïnes identificades a 800 g també es troba a les mostres de 10 000 g, per tant, centrifugar a altes g no implica una pèrdua d'informació.

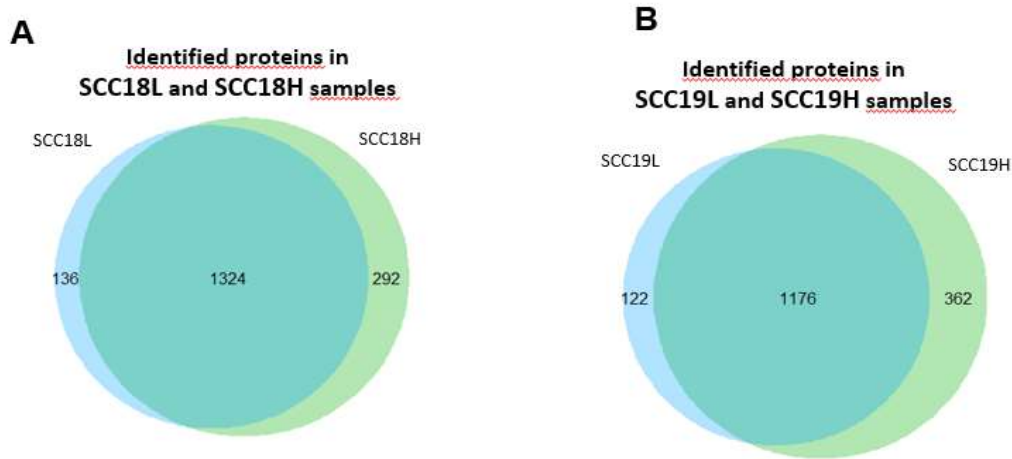


Figura 24. Superposició del proteoma de dues mostres de CEC (SCC18 i SCC19) processades a diferents velocitats de centrifugació (L i H). **A i B)** Diagrames de Venn on es mostra la superposició entre les proteïnes del TIF detectades mitjançant centrifugació a 800 g (L) i a 10 000 g (H) per a la mostra SCC18 (A) i SCC19 (B). Els números indiquen el total de proteïnes identificades en cada condició.

Per a estudiar la variabilitat entre els mètodes i les mostres, vam utilitzar el coeficient de correlació de Pearson (CCP) dels resultats de l'espectrometria de masses. El mapa del CCP mostra com el TIF que prové de les diferents mostres té més variabilitat que el provinent de les diferents condicions de centrifugació (800 vs. 10 000 g) (Figura 25.A), per tant, la variabilitat biològica és clarament superior a la variabilitat tècnica.

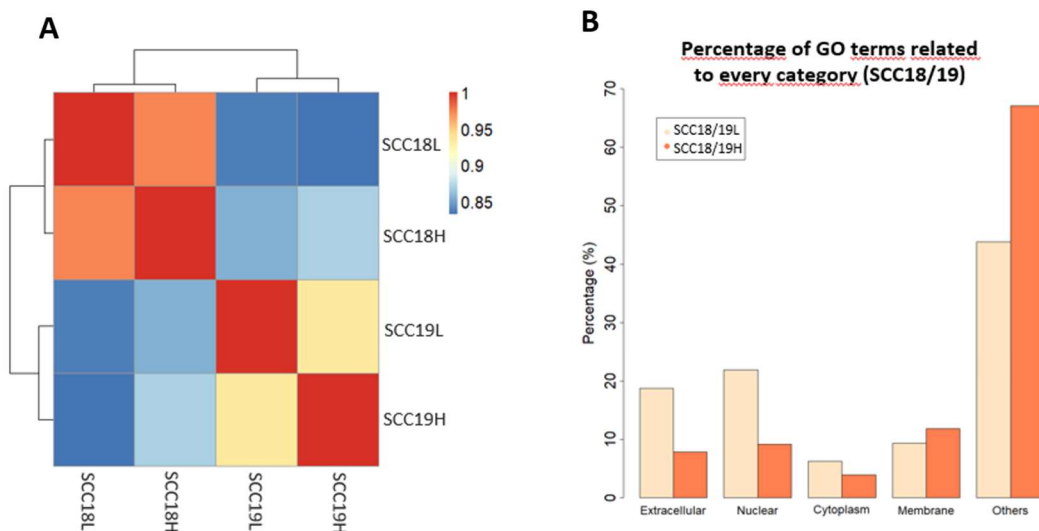


Figura 25. Característiques de les mostres de TIF obtingudes amb les dues forces de centrifugació. **A)** Mapa del coeficient de correlació de Pearson comparant mostres tumorals vs. mètodes (centrifugació a 800 g (L) i a 10 000 g (H)). **B)** Distribució del percentatge de termes "GO" relacionat amb cada categoria subcel·lular. El gràfic compara les proteïnes no superposades obtingudes per centrifugació a 800 g (L) i a 10 000 g (H) de les dues mostres de CEC.

Finalment, vam considerar el risc d'una alta lisi cel·lular en les mostres centrifugades a 10 000 g. Les mostres SCC18 i SCC19 centrifugades a 800 g tenien 136 i 122 proteïnes, respectivament, que no s'observaven a 10 000 g. Mentre que les mostres de 10 000 g tenien 292 i 362 proteïnes específiques, respectivament (Figura 24). Vam determinar la proporció de "GO terms" relacionats amb la localització subcel·lular d'aquestes proteïnes que no eren comunes (Figura 25.B). No s'objectiva cap biaix significatiu a nivell de proteïnes definides com a nuclears i de membrana en les mostres de 10 000 g que indiqui que centrifugar a altes g impliqui un augment del trencament cel·lular.

Les proteïnes ribosomals presents en el secretoma han sigut usades prèviament com a mètode per a estudiar la presència de lisi cel·lular excessiva en una mostra⁷⁸. En aquest sentit, vam dur a terme una anàlisi semi-quantitativa de les proteïnes ribosomals (basada en el senyal de 78 proteïnes ribosomals) usant la monitorització de síntesi de proteïnes (de l'anglès, PSMs) detectada en els dos mètodes d'extracció (elució i centrifugació a 10 000 g). Aquesta anàlisi tampoc va mostrar diferències estadísticament significatives (Taula 5), demostrant així que el trencament cel·lular és similar independentment del mètode que s'usi. La llista de les proteïnes ribosomals incloses en l'anàlisi està disponible a la Taula suplementària S1 dels annexes. Per tant, el mètode de centrifugació a 10 000 g no comporta un augment significatiu de la lisi cel·lular ni respecte centrifugar a 800 g ni respecte al mètode d'elució.

Taula 5. Anàlisi semi-quantitativa de les proteïnes ribosomals detectades en ambdós mètodes d'extracció (elució = A i centrifugació a 10 000 g = B). Es mostren els valors de *p* del test T-Student aplicat per a comprovar la significació estadística.

	METHOD A			METHOD B			t test - p value (Method A vs Method B)
	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	
Ribosomal Proteins PSMs	261	229	289	222	316	368	0.434480967

Finalment, per tal de descartar que les diferències que observàvem en el proteoma no es devien simplement a la pròpia variabilitat intrínseca del mètode centrifugació o a la de l'anàlisi per espectrometria de masses (LC-MS/MS), vam dur a terme replicats tècnics. Un mateix tumor va ser dividit en dues meitats d'equivalents característiques (SPIN1 i SPIN2) i cada una d'elles va ésser processada per a aïllar TIF amb el mateix protocol de centrifugació (10 000 g; 20 minuts). A més a més, el proteoma obtingut de la mostra SPIN2 va ser injectada tres vegades per a fer-ne triplicats de l'anàlisi LC-MS/MS.

Tal com es mostra en la Figura 26, els triplicats del LC-MS/MS presentaven un 96-97 % de superposició, demostrant una molt bona reproductibilitat. Per altra banda, també trobem una alta superposició (superior al 95 %) entre la mostra SPIN1 i cada un dels triplicats de la mostra SPIN2 (Figura 27).

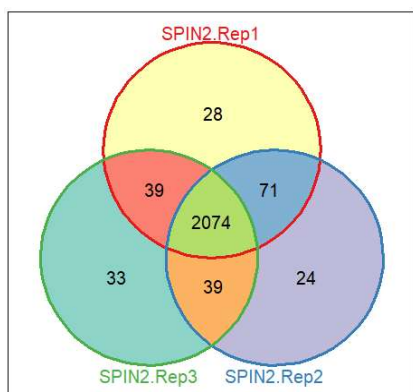


Figura 26. El proteoma obtingut de la mostra SPIN2 va ser injectada 3 vegades per a l'anàlisi LC-MS/MS. El diagrama de Venn representa la superposició del proteoma del triplicat, essent del 96-97 % en global, suggerint doncs una molt bona reproductibilitat entre els triplicats de LC-MS/MS.

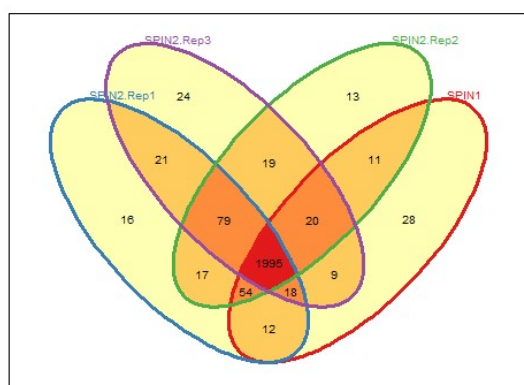


Figura 27. Comparació de la reproductibilitat del mètode centrifugació en dues mostres del mateix tumor (SPIN1 i SPIN2). Diagrama de Venn on es mostra l'alta superposició (superior al 95 %) entre el replicat tècnic SPIN1 i cada un dels tres replicats de SPIN2.

Podem concloure doncs, amb tota aquesta informació en mà, que l'increment en la força de centrifugació necessari per a obtenir TIF de les mostres de CEC comporta la identificació d'un major nombre de proteïnes, però no desencadena un augment significatiu del trencament cel·lular, ni comparat amb el mètode d'elució ni tampoc amb la centrifugació a 800 g. El fet que per obtenir TIF de les mostres de CEC es requereixi una major força de centrifugació respecte a d'altres tumors descrits en la literatura podria ser degut a les característiques particulars del teixit cutani humà. Es tracta d'un teixit ric en col·lagen, de fet, el col·lagen sol constitueix el 75 % del pes sec de la pell⁷³, fet que la proveeix d'una gran força tensiva que no trobem en altres teixits.

Comparacions entre els proteomes generats per elució i per centrifugació

Per a comparar els mètodes d'elució i centrifugació (a 10 000 g), tres mostres de CEC (SCC6, SCC8, SCC9) van ser analitzades amb espectrometria de masses, cada una d'elles dividida en dues parts equivalents i processada amb cada un dels dos mètodes (elució i centrifugació), sis mostres en total. El nombre total de proteïnes identificades va ser 2767 amb el mètode d'elució i 2869 amb la centrifugació. El 88-89 % de les proteïnes identificades en els dos mètodes es troben descrites en les vesícules extracel·lulars (base de dades de la vesiclepedia⁷⁹, segons l'última versió disponible⁸⁰), donant suport a la qualitat de les mostres de TIF (Figura 28). La vesiclepedia és un compendi d'ARN, proteïnes, lípids i metabòlits que s'han trobat en vesícules extracel·lulars⁷⁹⁻⁸⁰.

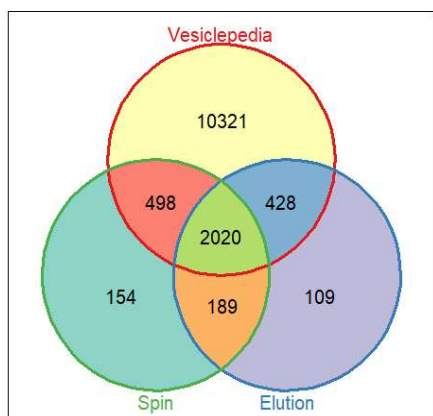


Figura 28. Diagrama de Venn on es mostra que el 88-89 % de les proteïnes identificades mitjançant elució i centrifugació es troben també descrites en vesícules extracel·lulars, troballa que dona suport a la qualitat de les mostres de TIF.

La mitjana de les intensitats de les proteïnes que observem en les mostres centrifugades és significativament major que la que observem en les mostres obtingudes per elució (Figura 29).

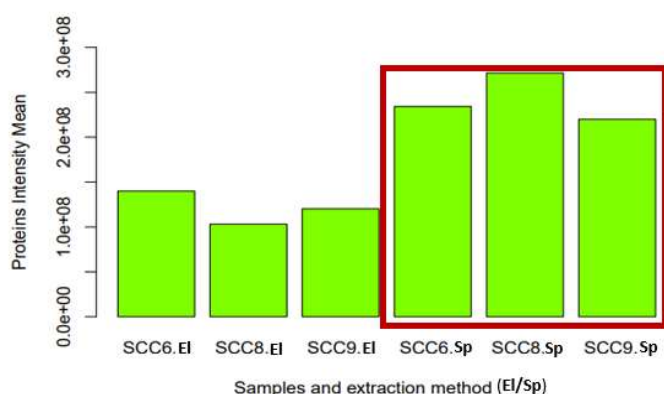


Figura 29. Comparacions entre el TIF obtingut per elució i centrifugació. En el gràfic de barres es representen les intensitats mitjanes de les proteïnes obtingudes en cada mostra per cada mètode, elució (EI) i centrifugació (Sp).

Cal, però, descartar que les diferències que observem en les intensitats de les proteïnes secretades pel tumor en cada mètode no estan emmascarades o es puguin explicar per la presència de diferents nivells de proteïnes procedents del plasma. En aquest sentit, i com a control de càrrega, hem comparat les PSMs trobades de les proteïnes més abundants del plasma (Taula 6).

Taula 6. Comparacions de les PSMs trobades en els dos mètodes (elució a l'esquerra i centrifugació 10 000 g a la dreta), per *Albumin*, *Serotransferrin*, *fibrinogen α chain precursor* and *fibrinogen β chain precursor*. Es mostren els valors de *p* del test T-Student aplicat per a comprovar la significació estadística.

	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	Replicate 1	Replicate 2	Replicate 3	t test - p value (Method A vs Method B)
Mean Intensities	140028406	103131901	120162934	234155739	271482513	219936386	0.004377336
Albumin (P02768) PSMs	256	196	270	240	317	291	0.260096781
Serotransferrin (P02787) PSMs	50	39	73	56	60	69	0.534109047
Fibrinogen α chain (P02671) PSMs	36	33	36	30	42	38	0.688493788
Fibrinogen β chain (P02675) PSMs	27	32	33	33	41	33	0.207024705

Com es pot veure (Taula 6), cap de les comparacions entre PSMs dona diferències estadísticament significatives (Files 2 a 5). Per tant, es comprova que les quantitats de les proteïnes més abundants del plasma detectades en cada un dels mètodes són indistingibles. Tanmateix, la comparació de les intensitats mitjanes (Fila 1) dels dos mètodes sí que mostra diferències estadísticament significatives ($p < 0.005$). Això implica que, malgrat la quantitat de proteïnes/pèptids analitzades en cada mostra és similar, el mètode de centrifugació (mètode B) millora la detecció de proteïnes.

Si ens fixem en la variabilitat de les mostres, només al voltant d'un 50 % de les proteïnes (52.7 % i 52.6 %, en el mètode d'elució i centrifugació, respectivament) eren identificades en les tres mostres estudiades amb un mateix mètode (Figura 30.A-B). Múltiples estudis previs presenten resultats similars. Quan s'estudiaven diferents mostres biològiques d'un mateix tipus tumoral es trobaven també un 50 % de proteïnes comunes entre les mostres⁸¹⁻⁸². Aquesta variabilitat entre mostres biològiques podria explicar-se per múltiples raons, sobretot per l'heterogeneïtat tumoral i per les característiques dels diferents pacients d'on prové la mostra. Els nostres tres pacients estaven diagnosticats de CECs primaris d'alt risc, amb característiques clíniques i histopatològiques similars, però cada tumor podria diferir en la seva genètica individual i per tant, també en el seu perfil proteòmic. Tots els tumors provenien de pacients masculins i d'àrees crònicament fotoexposades, però no exactament de la mateixa àrea: la cara (SCC6), el canell (SCC8) i el cuir cabellut (SCC9) (Taula 7).

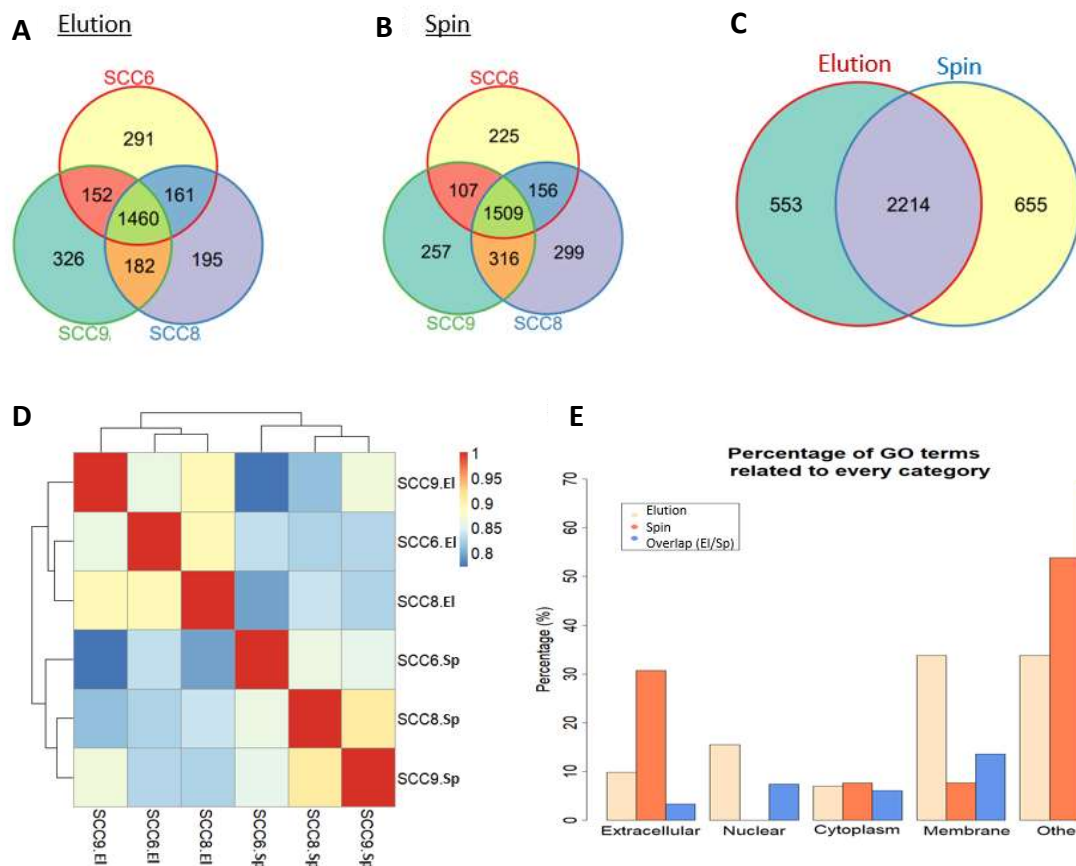


Figura 30. Comparacions entre el proteoma obtingut per elució i centrifugació. A) i B) Diagrama de Venn on es representa la superposició del proteoma de les 3 mostres tumorals obtingudes per elució (A) i centrifugació (B). **C)** Diagrama de Venn on es representa la superposició entre les proteïnes del TIF obtingut per elució i per centrifugació. Els números indiquen la quantitat de proteïnes identificades. **D)** Mapa del coeficient de correlació de Pearson comparant mostres tumorals vs. mètodes. **E)** Distribució del percentatge de termes "GO" relacionat amb cada categoria subcel·lular. El gràfic compara les proteïnes no superposades obtingudes per elució i centrifugació i les proteïnes comunes obtingudes en els dos mètodes.

Taula 7. Característiques dels pacients i dels tumors de les 5 mostres analitzades.

Mostra	Sexe	Edat	Localització del tumor	Mida del tumor	Característiques del tumor
SCC6	Home	90	Canell	3 cm	Tumor primari
SCC8	Home	84	Cuir cabellut	2 cm	Tumor primari
SCC9	Home	80	Cara (galta dreta)	3.5 cm	Tumor primari
SCC18	Home	80	Cara (galta esquerra)	4 cm	Tumor primari
SCC19	Dona	64	Peu	3 cm	Tumor primari

Pel que fa als mètodes, la superposició entre el total de proteïnes obtingudes de les tres mostres en cada mètode era del 80.01 % per l'elució i del 77.17 % per la centrifugació (Figura 30.C). El coeficient de correlació de Pearson indica que els proteomes de les diferents mostres tenen més variabilitat que els proteomes dels diferents mètodes (Figura 30.D). Aquest resultat suggereix que el mètode usat per a aïllar TIF, elució vs. centrifugació, no influeix de manera rellevant en el perfil proteòmic de les biòpsies de CEC quan comparem una mateixa mostra (mateix tumor i pacient).

Tanmateix, un nombre relativament important de proteïnes (553 de les obtingudes per elució i 655 de les obtingudes per centrifugació) són específiques de cada mètode. Per aquest motiu, vam analitzar la localització subcel·lular d'aquestes proteïnes que són mètode-específiques, usant la classificació del *GO ontology* (Figura 30.E). Els termes *GO* relacionats amb les localitzacions "nuclear" i "membrana" estaven considerablement més intensificats (més de 10 vegades i més de 6 vegades, respectivament) en el mètode elució, mentre que la localització "extracel·lular" estava més enriquida en el mètode centrifugació (augment del voltant de 3 vegades). Aquest últim resultat suggereix que la centrifugació és el mètode més adequat per aïllar el TIF en mostres de CEC.

Fins on arriba el nostre coneixement actual, aquest és el primer estudi on es comparen els diversos mètodes descrits per a obtenir TIF en mostres d'un mateix tumor i pacient. Hem revisat la literatura buscant bases de dades de TIF del mateix tumor processat per ambdós mètodes, tot i que no en les mateixes mostres ni grups de treball. Hem trobat, per exemple, l'anàlisi proteòmica del TIF de carcinoma d'ovari publicat per part de Hoskins *et al.*⁸² usant el mètode d'elució i per part de Haslene-Hox *et al.*⁷⁷ usant el mètode de centrifugació. En aquests estudis, es van obtenir 569 proteïnes mitjançant elució i 769 mitjançant centrifugació, de les quals 284 eren comunes en els dos mètodes. Això significa una superposició del 50 % per l'elució i del 37 % per la centrifugació. Malgrat que aquests estudis no són directament comparables amb els nostres resultats, el nombre de proteïnes obtingudes mitjançant la centrifugació de les mostres de carcinoma d'ovari també és superior. Tanmateix, considerant les diferències entre pacients, tumors i configuració de l'espectrometria de masses, la superposició aconseguida en el TIF del carcinoma d'ovari en aquests estudis independents es mostra rellevant.

En aquesta part del treball, suggerim un sistema per a establir quin és el millor mètode per a aïllar TIF en cada teixit tumoral, que inclou comparar els diferents mètodes disponibles en mostres d'un mateix tumor i pacient. Les característiques de cada protocol haurien de ser configurades segons les característiques del tumor a estudiar. L'elecció d'un mètode depèn més de la consistència i el maneig del teixit que de la qualitat del mètode en si. Nosaltres proposem que la centrifugació és el mètode d'elecció per a obtenir TIF de mostres de CEC. S'obté una quantitat superior de proteïnes extracel·lulars, major sensibilitat i un maneig més ràpid i fàcil de les mostres. A més a més, el mètode de centrifugació

s'ajusta al volum mig de les mostres disponibles de CEC. La principal preocupació associada a l'ús del mètode per centrifugació és el trencament cel·lular durant el processament de les biòpsies a altes g⁷⁶⁻⁷⁷. Tanmateix, els resultats presentats aquí indiquen que el nivell d'integritat cel·lular després de la centrifugació (10 000 g) o de l'elució és força similar, perquè el perfil proteòmic es conserva. A més a més, les mostres centrifugades mostren un menor contingut de proteïnes nuclears o de membrana i un enriquiment en proteïnes extracel·lulars. Per tant, aquestes dades suggereixen que durant la centrifugació a 10 000, la lisi cel·lular no està augmentada (ni respecte a l'elució ni a la centrifugació a 800 g).

Capítol III

Caracterització del TIF dels Carcinomes de Queratinòcits

Capítol III: Caracterització del TIF dels Carcinomes de Queratinòcits

Introducció

Conèixer les alteracions moleculars dels tumors és clau per a entendre el seu comportament, agressivitat o resistència als tractaments. En els carcinomes de queratinòcits encara queden molts interrogants per a resoldre, sobretot pel que fa a la seva eficàcia invasiva.

Fisiopatologia del CBC

Si ens centrem en el CBC, la seva formació s'ha associat de manera clara a l'activació constitutiva de la via *Sonic hedgehog* (Shh). Entre un 50 % i un 80 % dels CBCs esporàdics es deuen a alteracions en aquesta via. Sobretot s'han atribuït a mutacions del gen PTCH1 (30-60 %) i SMO (10-20 %). Les alteracions del gen PTCH2, la proteïna Sonic i els factors GLI són molt més rares⁸³⁻⁸⁴. Independentment de l'alteració de la via Shh, també cal destacar que les mutacions de p53 són presents, aproximadament, en la meitat dels CBCs esporàdics.

Shh és el lligand específic dels receptors transmembrana *patched 1* (PTCH1) i *patched 2* (PTCH2). PTCH1 és la forma majoritària a l'ésser humà. En absència de lligand, la funció de PTCH és inhibir l'activitat de la proteïna *smoothened* (SMO). Quan el lligand Shh s'uneix a PTCH, s'inicien una sèrie d'esdeveniments que provoquen la fosforilació d'SMO i per tant, la seva activació i acumulació a la membrana citoplasmàtica. L'activació de SMO condueix a la modulació del complex de proteïnes format pels factors de transcripció GLI (GLI1, GLI2 i GLI3), i proteïnes conegudes com *fused* (hFu) i supressores d'aquestes (SuFu). L'activació de SMO fosforila la família GLI i permet la translocació d'aquests al nucli (en absència de lligand estan ancorades al citoesquelet), on regulen l'activitat dels seus gens diana, com WNT, BMP, ciclines D i E, MYC, HIP, components del factor de creixement epidèrmic i del factor de creixement endotelial vascular, i el mateix PTCH1 i GLI, entre d'altres⁸³⁻⁸⁴ (Figura 31).

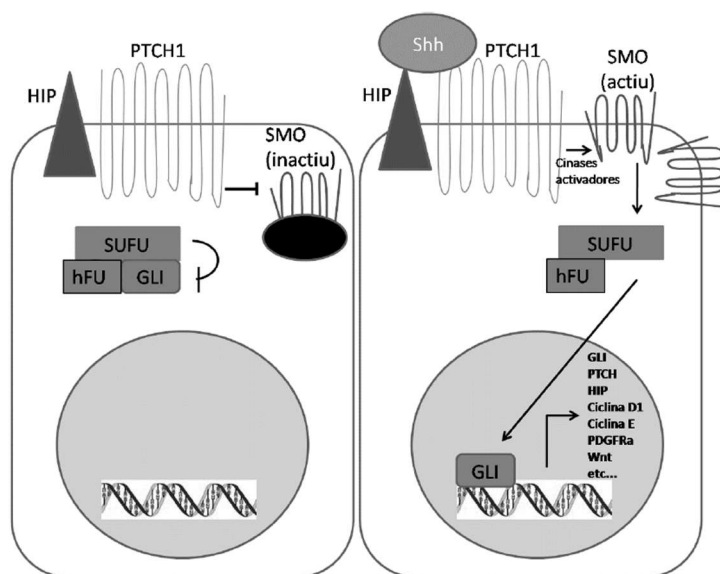


Figura 31. Esquematzació de la via *Sonic hedgehog*. Adaptat de la tesi doctoral del Dr. Aguayo (L.956-2013).

Via Shh i relació amb la pell: Durant l'embriogènesi, el senyal *hedgehog* és imprescindible per a la formació del fol·licle pilós (FP). A la vida adulta, la via Shh sembla tenir un doble efecte sobre la pell; d'una banda, és important pel manteniment del component cel·lular del FP i per l'altra, és el desencadenant del cicle del pèl (inicia la fase d'anagen mitjançant l'expressió de la via Wnt/ β -catenina)⁸⁴.

Malgrat que la sobreexpressió de la via Shh constitueix el paradigma de la fisiopatologia del CBC, sembla ser que la formació tumoral també depèn de la intensitat del senyal oncogènic, ja que una hiperactivació d'aquesta via per sota d'un determinat nivell comporta la formació d'altres hamartomes diferents al CBC⁸⁵.

Recentment, també s'ha descrit el paper de la β -catenina en el desenvolupament de diversos tumors d'estirp pilosa, entre ells el CBC, el càncer de pàncrees i el de pròstata⁸⁶. La β -catenina és una proteïna multifuncional que controla nombroses activitats, tant a la membrana citoplasmàtica com al nucli. A la membrana actua com a pont entre el citoesquelet i les cadherines, desenvolupant una funció estructural. Al nucli, fa de mitjancera entre el senyal Wnt/TCF⁸⁷. Aquesta via és extremadament complexa i encara està en estudi. La seva funció final sembla que seria induir la transcripció de gens que regulen el cicle cel·lular, com MYC, ciclina D1 i metal·loproteïnases de la matriu extracel·lular, implicades en la degradació de l'estroma⁸⁸⁻⁸⁹.

A més d'aquesta funció sobre la proliferació cel·lular, l'acumulació de β -catenina també promou la transició epiteli-mesènquima (TEM). Com ja hem dit, un dels múltiples papers de la β -catenina és l'estructural. El fet de deslocalitzar-se de la membrana provoca la pèrdua d'adhesió cel·lular mitjançada per l'E-Cadherina a les cèl·lules epitelials, induint així un canvi de fenotip cap a mesènquima. Aquest mecanisme és afavorit pel senyal *hedgehog* i l'expressió de factors de la família *Snail*. La conseqüència és una reorganització del citoesquelet i l'adquisició de motilitat cel·lular, que desencadenarien la migració i la invasió tumorals⁹⁰⁻⁹¹.

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

Fisiopatologia del CEC

La proteïna supressora de tumors més freqüentment (i precoçment) inactivada en el CEC és la p53, codificada pel gen TP53⁹². Fins a un 90 % dels CECs tenen mutacions en el seu gen, mentre que només entre un 7-48 % de les queratosis actíniques en tenen⁹³⁻⁹⁴. Aquesta proteïna respon a diversos estímuls d'estrès cel·lular regulant l'expressió de diferents gens diana. Indueix l'aturada del cicle cel·lular, l'apoptosi, la senescència, la reparació de l'ADN i provoca canvis en el metabolisme.

Altres alteracions en les vies de regulació del cicle cel·lular i l'apoptosi descrites en el CEC: El gen del retinoblastoma (RB1) és un altre gen supressor de tumors implicat en la regulació del cicle cel·lular, i se n'ha descrit una pèrdua d'expressió mitjançant estudis d'immunohistoquímica en el 16 % dels CECs⁹⁵. La sobreexpressió de la ciclina D1 (CCND1) s'ha implicat en les fases precoces del 60-71 % dels CECs⁹⁶⁻⁹⁷. Pel que fa als inhibidors de quinases dependents de ciclina, que també són inhibidors del cicle cel·lular, trobem alteracions en la CDKN2A en el 17-76 % dels CECs⁹⁸⁻⁹⁹. Finalment, el gen KNSTRN es

troba mutat en el 13 % de les queratosis actíniques i en el 19 % dels CECs¹⁰⁰, però cal destacar que no en tots els estudis el troben alterat⁹⁸⁻⁹⁹.

Altres vies en les quals s'han trobat alteracions en una proporció elevada de CECs: La via NOTCH, que regula la sortida del cicle cel·lular i la supervivència, com un factor de diferenciació terminal, en la qual trobem mutacions de NOTCH1 i NOTCH2 en el 75-82 % dels CECs¹⁰¹⁻¹⁰². L'adhesió cel·lular també s'ha trobat alterada en els CECs, concretament la E-Cadherina (CDH1) es troba infraexpressada fins en un 85 % dels casos (mitjançant hipermetilació del seu promotor), i aquest fet s'associa a un augment de la invasió tumoral i de les potencials metàstasis a distància¹⁰³⁻¹⁰⁴. Totes aquestes alteracions i vies es troben sintetitzades a la Figura 32 i a la Taula 8, juntament amb d'altres menys freqüents que també s'han descrit¹⁰⁵.

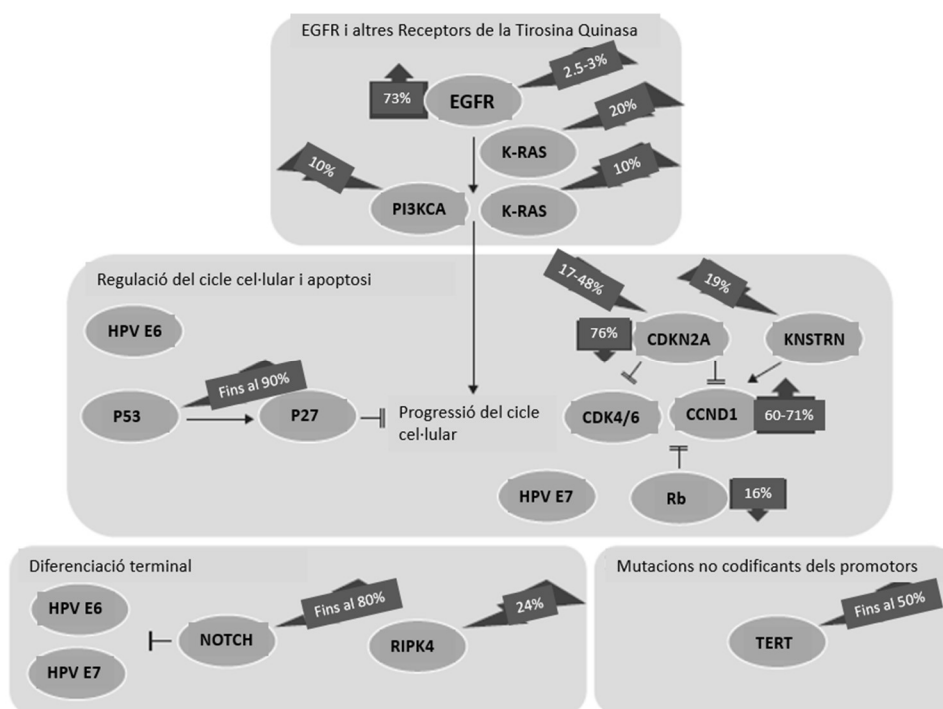


Figura 32. Representació esquemàtica de les principals vies oncogèniques involucrades en la carcinogènesi del CEC. Les fletxes que assenyalen amunt indiquen sobreexpressió, i les fletxes que assenyalen avall indiquen infraexpressió. Les icones triangulades indiquen la incidència de les mutacions descrites en els gens de les vies. Adaptat de Campos *et al.*¹⁰⁵

Taula 8. Alteracions moleculares descrites en el CEC. Adaptat de Campos *et al.*¹⁰⁵.

Via alterada	Mutacions	Sobreexpressió	Infraexpressió
Regulació del cicle cel·lular i l'apoptosi			
TP53	Fins al 90 %		
RB1			16 %
CCND1		60-71 %	
CDKN2A	17-48 % (Casos M1)		76 %
KNSTRN	19 %		
Mutacions no codificants dels promotors			
TERTp	Fins al 50 %		
Diferenciació terminal			
NOTCH1	Fins al 82 %		
FBXW7			
TP63			
RIPK4	24 % (casos M1)		

Família EGFR i altres TKRs	Mutacions	Sobreexpressió	Infraexpressió
EGFR	2.5-3 %		
PIK3CA	10 %		
HRAS	11-13 %		
KRAS	10 %		
RASA1	13 %		
Adhesió, invasió i microambient			
CDH1			85 %
FAT1	44 %		

M1 = Metàstasi.

Microambient tumoral en els CQ

Tal com hem vist en els apartats anteriors, la fisiopatologia dels CQ és dependent de l'alteració de diverses vies de transducció de senyals i de control de la proliferació. Un dels efectes d'aquestes alteracions és la secreció de noves proteïnes a l'espai extracel·lular, que caracteritzaran el microambient tumoral. Diferents treballs demostren que la senyalització paracrina entre el tumor i el seu entorn és necessària per a que el tumor es pugui expandir¹⁰⁶. Les proteïnes i metabòlits senyalitzadors presents en el fluid intersticial que envolta el tumor (TIF) s'han estudiat en alguns tipus tumorals, però no hi ha res descrit pel que fa als CQ.

Aquesta senyalització, segons la composició del TIF, influencia dos aspectes fonamentals en el desenvolupament tumoral:

1- L'expansió del tumor envaint l'estroma del teixit sà.

Com a exemple, les metal·loproteases secretades per les cèl·lules tumorals degraden la matriu extracel·lular i permeten el pas de les cèl·lules tumorals entre l'estroma¹⁰⁷. També són molt rellevants les senyalitzacions que alteren el citoesquelet de les cèl·lules tumorals, permetent que aquestes es desplacin per l'estroma¹⁰⁸. Si aquests processos de disseminació permeten a la cèl·lula tumoral arribar als capil·lars i travessar l'endoteli, el tumor farà metàstasi.

2- La inhibició de la resposta immunològica contra el tumor.

Com a exemple, la via PD1/PD-L1 (de l'anglès, *programmed death 1* i el seu lligand), fisiològicament actua inhibint la resposta inflamatòria per tal d'evitar danys innecessaris en el teixit sa. En el cas del melanoma, aquest mecanisme protector es troba distorsionat, aconseguint mitjançant una sobreexpressió de PD1 eludir la resposta immunològica antitumoral¹⁰⁹.

Basant-nos en la tècnica d'obtenció del TIF explicada en el capítol anterior de la tesi, en aquest nou capítol proposem estudiar la composició del TIF dels CQ. L'anàlisi proteòmica del TIF aplicada a l'estudi dels CQ és un camí encara per a explorar que ens pot conduir a identificar nous biomarcadors tumorals i ajudar-nos a entendre una mica més els mecanismes d'invasió d'aquests carcinomes. És interessant destacar que, entre els CQ, els CBCs rarament provoquen metàstasi, en canvi, els CECs que no es tracten a temps sí que poden metastatitzar. Per això, creiem que podem trobar proteïnes diferencials en els seus TIFs que ens poden ajudar a explicar aquestes diferències.

Estudi proteòmic del TIF de mostres de CBC, CEC i pell sana

Les mostres tumorals (CBC, CEC) utilitzades per a obtenir el TIF provenen de l'excedent de mostra que s'obté després de l'exèresi quirúrgica dels tumors en la secció de Dermatologia de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida. Les mostres de pell sana, utilitzades com a control, van ser extreïdes dels marges sans de les peces o de la pell restant de fer penjalls, de pacients intervinguts per altres causes (exèresis de nevus o quists epidèrmics, etc.). Totes les mostres provenen de pacients que han donat el seu consentiment informat per escrit i han sigut obtingudes amb la pertinent aprovació per part del comitè ètic de l'hospital (CEIC-1958). L'obtenció del TIF a partir del mètode centrifugació i la seva anàlisi proteòmica mitjançant "*label-free mass spectrometry quantification*" es van realitzar tal com està descrit exhaustivament en el capítol anterior de la tesi i publicat a la literatura (Article II Annexes).

Anàlisi bioinformàtica

El maneig de les llistes de proteïnes creades amb *Proteome Discoverer* i *MaxQuant*, així com la generació de diagrames de Venn i gràfics de barres, es van realitzar amb R (3.5.2) i R Studio (1.1.419) amb l'ajuda del paquet "*Vennerable*". Les dades en brut i els fitxers processats es van penjar al dipòsit PRIDE amb el codi d'adhesió del projecte PXD016261.

Immunohistoquímica

Els blocs de les mostres fixades en parafina van ser tallats amb un gruix de 3 µm i assecats durant 1 hora a 65 °C abans de realitzar el pre-tractament de desparafinització en xilè, rehidratació a través d'una sèrie de banys en etanol a diferents graus i rentats amb PBS (buffer fosfat salí). La recuperació d'epítops es realitzà al Mòdul de Pre-Tractament PT-LINK (Agilent Technologies-DAKO, Santa Clara, United States) a 95 °C durant 20 minuts en buffer 50x Tris/EDTA a pH de 9. Abans de la tinció dels talls, la peroxidasa endògena va ser bloquejada. Els anticossos usats foren: FABP5 (*rabbit polyclonal*, Abcam, Cambridge, UK, #ab37267), 14-3-3 sigma/SFN (*mouse monoclonal*, Abcam, Cambridge, UK), LAD1 (*rabbit polyclonal*, Sigma-Aldrich, Madrid, Espanya, #HPA028732), CRNN (*rabbit polyclonal*, Proteintech Europe, Manchester, UK, #11799-1-AP), PNP (*mouse monoclonal*, R&D Systems, Minnesota, United States, #MAB6486), Cromogranina A (*mouse monoclonal*, Agilent Technologies-DAKO, Santa Clara, United States, #M0869). Després de la incubació, la reacció va ser visualitzada amb l'EnVision FLEX Detection Kit (Agilent Technologies-DAKO, Santa Clara, United States), fent servir com a substrat el cromogen diaminobenzidina. Controls positius i negatius van ser també testats.

Es va obtenir una puntuació histològica (*histoscore*) de cada mostra, amb un rang de 0 (sense immunoreactivitat) fins a 300 (màxima immunoreactivitat). Es va recollir tant la intensitat (1-3) de la tinció com el percentatge de cèl·lules positives (x), segons l'aplicació de la següent fórmula: *Histoscore* = 1x (tinció lleugera) + 2x (tinció moderada) + 3x (tinció forta). L'*histoscore* va ésser determinat per dos investigadors independents. La mitjana dels *histoscores* es va utilitzar per a l'anàlisi estadística.

Per a calcular el mínim de mostres d'immunohistoquímica (IHQ) necessàries es va utilitzar la calculadora de grandària mostral GRANMO (versió 7.12 abril 2012). Es van agafar com a referència els treballs publicats prèviament sobre l'expressió de les proteïnes seleccionades en diversos tumors, quedant-nos amb les dades més conservadores. Acceptant un risc alfa de 0.05 i un risc beta inferior al 0.2 en un

contrast bilateral, calen 22 subjectes en el primer grup i 22 en el segon per a detectar com a estadísticament significativa la diferència entre dos proporcions, que pel grup 1 s'espera que sigui de 0.8 i pel grup 2 de 0.4. S'ha estimat una taxa de pèrdues de seguiment del 0 %. S'ha utilitzat l'aproximació de l'ARCSINUS. A més a més, per a estudiar l'expressió de les proteïnes en els teixits mitjançant l'*histoscore*, comparant les seves mitjanes, acceptant un risc alfa de 0.05 i un risc beta inferior al 0.2 en un contrast bilateral, calen 23 subjectes en el primer grup i 23 en el segon per a detectar una diferència igual o superior a 50 unitats d'*histoscore*. S'assumeix que la desviació estàndard comú és de 60. S'ha estimat una taxa de pèrdues de seguiment del 0 %.

Immunoblot

A les mostres de TIF obtingudes pel mètode de centrifugació utilitzades en aquest apartat se'ls afegeix 2x *Laemmli buffer* a parts iguals. La barreja va ser escalfada a 95 °C durant 2 minuts. Les proteïnes dels TIFs es van separar per electroforesi en gels de poliacrilamida (10 % SDS-PAGE). Posteriorment, les proteïnes es van transferir a membranes PVDF (Millipore, Billerica, MA) i analitzar per immunoblot. Els anticossos primaris foren els mateixos que per a l'apartat d'immunohistoquímica. Els anticossos secundaris corresponents es van detectar fent servir substrat quimioluminescent HRP (*Horseradish peroxidase substrate*) Immobilon Western (Millipore). La quimioluminescència emesa pels *westerns blots* va ser captada amb l'ajuda de la càmera CCD (Lumimager, Roche, Basel, Suïssa).

Anàlisi estadística

Les bases de dades anònimes van ser introduïdes i analitzades a través del programa SPSS v20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EE. UU.). Les variables categòriques es van descriure mitjançant les freqüències absolutes i relatives, i les variables contínues mitjançant la mitjana i la desviació estàndard (DE). Les variables categòriques es van analitzar mitjançant el test de χ^2 , o el test exacte de Fisher, quan les observacions esperades eren < 5 . La prova de Shapiro-Wilks es va utilitzar per a estudiar la normalitat de les variables. La comparació de dues mitjanes (una predictora binària i una resposta quantitativa) es va realitzar mitjançant la prova T de Student o la de U de Mann-Whitney si no es complia la normalitat. La comparació de múltiples mitjanes (> 2) es va realitzar mitjançant el test d'ANOVA o el test de Kruskal Wallis en aquelles variables que no seguien la distribució normal. Finalment, per a realitzar comparacions múltiples respecte a una categoria de referència, donat que les variables no seguien una distribució normal, es va utilitzar el test de Scheffé o el test de U de Mann Whitney i la W de Wilcoxon corregint posteriorment el valor de p amb el procediment de Holm. El valor de p escollit per a considerar les diferències com a estadísticament significatives en totes les anàlisis va ser $p < 0.05$.

Resultats

Comparació de les proteïnes obtingudes del TIF de CQ vs. pell sana

Es va realitzar l'anàlisi proteòmica del TIF obtingut mitjançant centrifugació de 27 mostres: 16 CEC, 7 CBC i 4 pells sanes (NS, de l'anglès *normal skin*) per usar com a controls. Les característiques clíniques dels pacients dels quals provenen les mostres estan resumides a la Taula 9. De mitjana es van obtenir unes 1100 proteïnes per mostra [300-1400]. Les mostres CEC23, CEC7 i NS14 no es van incloure a

l'anàlisi final per tal d'evitar un biaix pel seu baix nombre de proteïnes quantificades (Figura 33). Les mostres amb una quantitat mitjana més elevada de proteïnes eren les del CBC, seguides del CEC i finalment les de pell sana.

Taula 9. Característiques clíniques dels pacients donants de les mostres a partir de les quals s'ha obtingut el TIF per l'estudi proteòmic.

Mostra	Localització	H/D	Edat	Baix vs. alt risc	Primari vs. recidiva
CEC 7	Cama	H	79	Baix	Primari
CEC 16	Orella	H	86	Baix	Primari
CEC 23	Cama	H	80	Baix	Primari
CEC 24	Front	D	89	Baix	Primari
CEC 25	Braç	H	75	Baix	Primari
CEC 10	Turvell	D	90	Alt	Primari
CEC 11	Cuir	H	90	Alt	Primari
CEC 12	Cuir	H	88	Alt	Primari
CEC 14	Galta	D	95	Alt	Primari
CEC 15	Galta	D	90	Alt	Primari
CEC 18 A	Galta	H	80	Alt	Primari
CEC 18 B	Galta	H	80	Alt	Primari
CEC 19 A	Taló	D	64	Alt	Recidiva
CEC 19 B	Taló	D	64	Alt	Recidiva
CEC 20	Galta	D	96	Alt	Primari
CEC 21	Templa	D	96	Alt	Primari
CBC 21	Cama	D	87	Baix	Primari
CBC 22	Esquena	H	87	Baix	Primari
CBC 26	Galta	D	85	Alt	Primari
CBC 15	Cuir	D	82	Alt	Primari
CBC 18	Front	D	86	Alt	Primari
CBC 20	Orella	H	75	Alt	Primari
CBC 27	Retroauricular	H	57	Baix	Primari
NS 10	Glabel·la	D	66		
NS 11	Cama	D	87		
NS 13	Tòrax	H	55		
NS 14	Preauricular	D	67		

H = Home, D = Dona.

A = mostra centrifugada a 10 000 G i B = mostra centrifugada a 3000 G.

En negreta es ressalten els CECs que s'agrupen segons el seu perfil d'expressió de proteïnes del TIF.

Les mostres ratllades són les que no s'han inclòs a l'anàlisi final pel seu baix nombre de proteïnes quantificades.

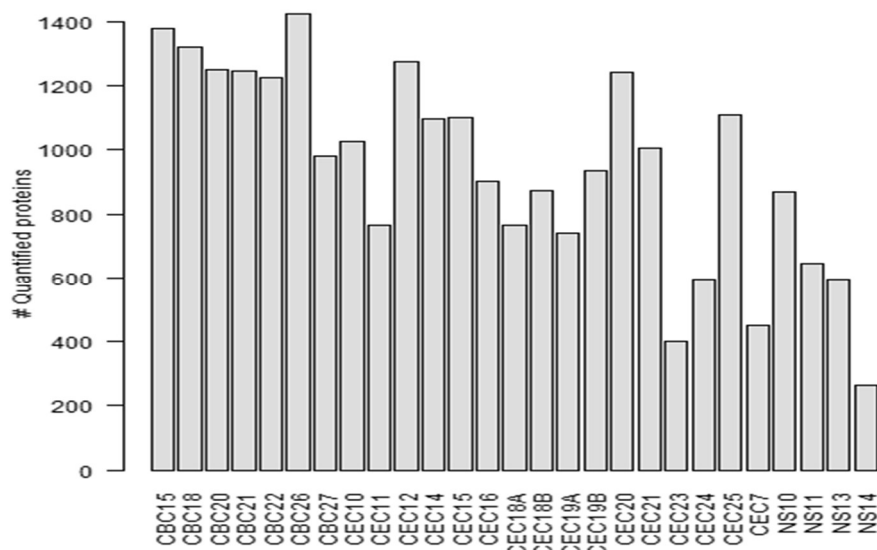


Figura 33. Diagrama de barres representant el nombre absolut de proteïnes quantificades en cada mostra.

Mitjançant *Principal Component Analysis* (PCA), incloent les proteïnes que havien sigut quantificades en almenys la meitat de les mostres, es pot veure com clarament s'agrupen en els tres diferents grups (CEC, CBC i pell sana o NS) (Figura 34.A), emfatitzant així el diferent comportament biològic dels tumor entre ells, malgrat ésser tots dos carcinomes de queratinòcits, i amb la pell sana. Les dades brutes de totes les proteïnes obtingudes en l'estudi estan disponibles al dipòsit PRIDE amb el codi d'adhesió del projecte PXD016261. A partir d'aquestes dades brutes s'obtenen les llistes de proteïnes dels TIFs: les que estan enriquides significativament ($p < 0.05$) o només s'expressen en el CBC (553 en total) o en el CEC (255 en total) i no en la pell sana. D'aquestes proteïnes, 196 són comunes entre el CBC i el CEC, mentre que 59 només s'expressen en el CEC i 357 només en el CBC (Figura 34.B). Això confirma que els CQ tenen un perfil específic de proteïnes secretades diferent al de la pell sana.

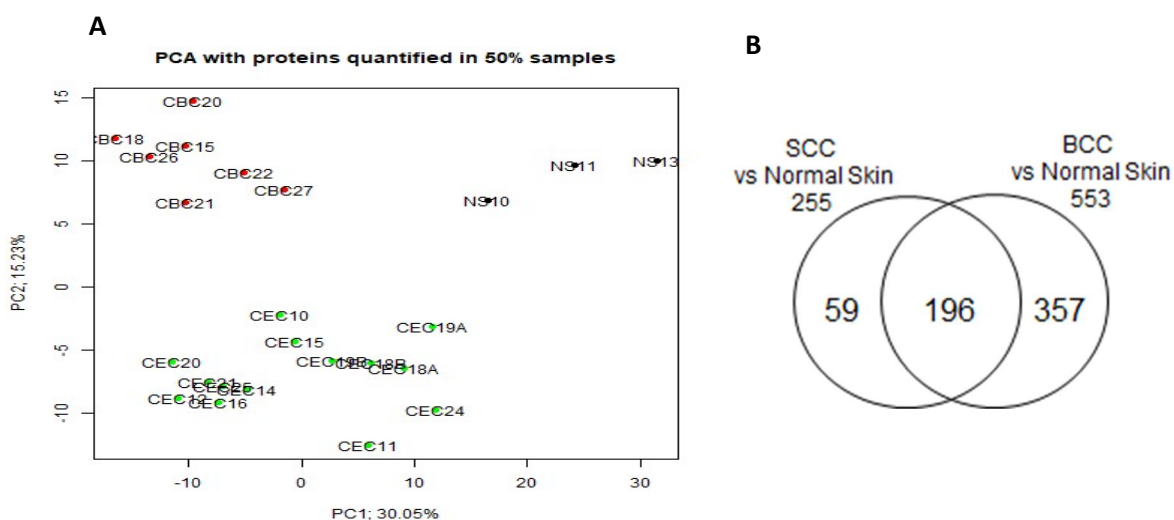


Figura 34. A) Representació del PCA on es veu l'agrupació entre els 3 grups de mostres. B) Nombre de proteïnes del TIF comunes i específiques dels CQ respecte a la pell sana. SCC = CEC, BCC = CBC, Normal skin = pell sana.

Les diferències entre els grups també s’observen clarament mitjançant els mapes de calor o “*heat maps*” quan es representen les proteïnes amb diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$), comparant NS vs. CBC (Figura 35) i NS vs. CEC (Figura 36). És interessant ressaltar que tant les dades del PCA (Figura 34.A) com les del *heat map* (Figura 36) mostren dues tipologies diferents de CEC segons el seu perfil de proteïnes del TIF. Els CEC 12, 14, 16, 20, 21 i 25 formen un grup molt coherent que no es pot explicar ni per ser tumors d’alt/baix risc, ni per histologia, ni per altres característiques com edat, gènere, localització del tumor, etc.

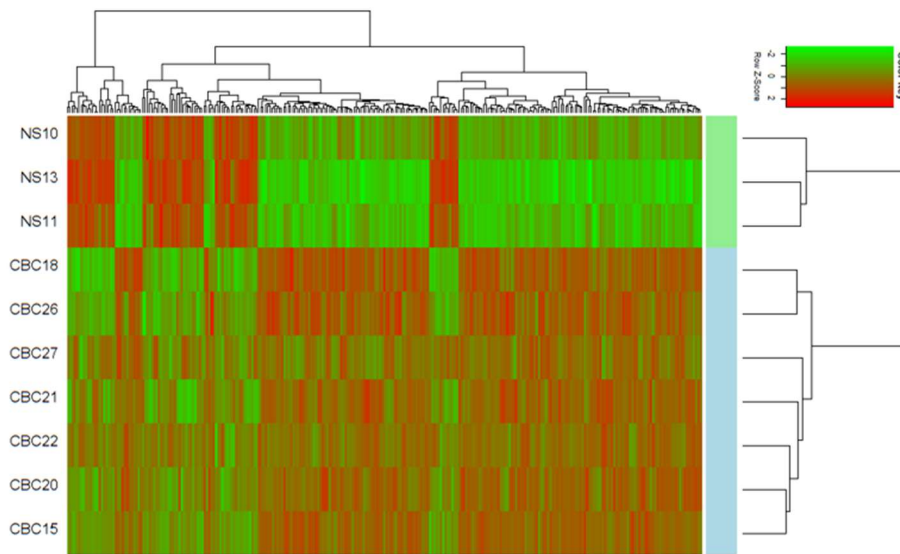


Figura 35. Representació mitjançant un mapa de calor de les proteïnes amb diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) que s’obtenen de les mostres de **NS vs. CBC**. Els nivells d’expressió de les proteïnes estan indicats pels canvis de color. En vermell està indicada l’expressió més alta, i en verd l’expressió més baixa.

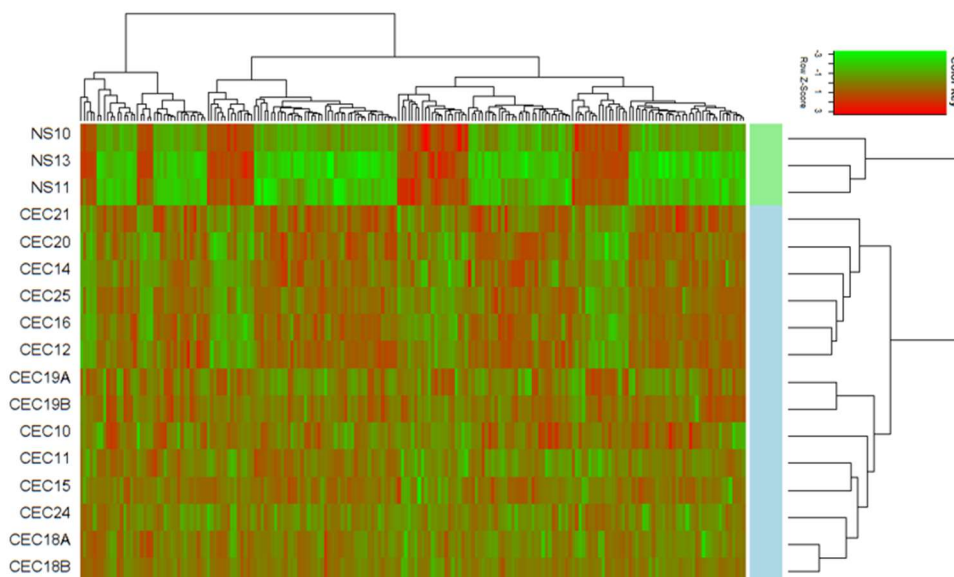


Figura 36. Representació mitjançant un mapa de calor de les proteïnes amb diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) que s’obtenen de les mostres de **NS vs. CEC**. Els nivells d’expressió de les proteïnes estan indicats pels canvis de color. En vermell està indicada l’expressió més alta, i en verd l’expressió més baixa. Es pot observar com els CEC 12, 14, 16, 20, 21 i 25 formen un grup molt coherent.

Comparació de les proteïnes obtingudes del TIF de CEC vs. CBC

L'objectiu principal és determinar l'existència d'un perfil diferent de secreció de proteïnes entre els TIFs dels CECs i els CBCs que permeti explicar les diferències fisiopatològiques entre ambdós tipus de CQ. Per tal de respondre aquesta qüestió, es realitza la comparació directa entre les 14 mostres de CEC i les 7 mostres de CBC. Els resultats indiquen un perfil diferencial molt clar entre CEC i CBC que es pot observar en el *heat map* de la Figura 37.

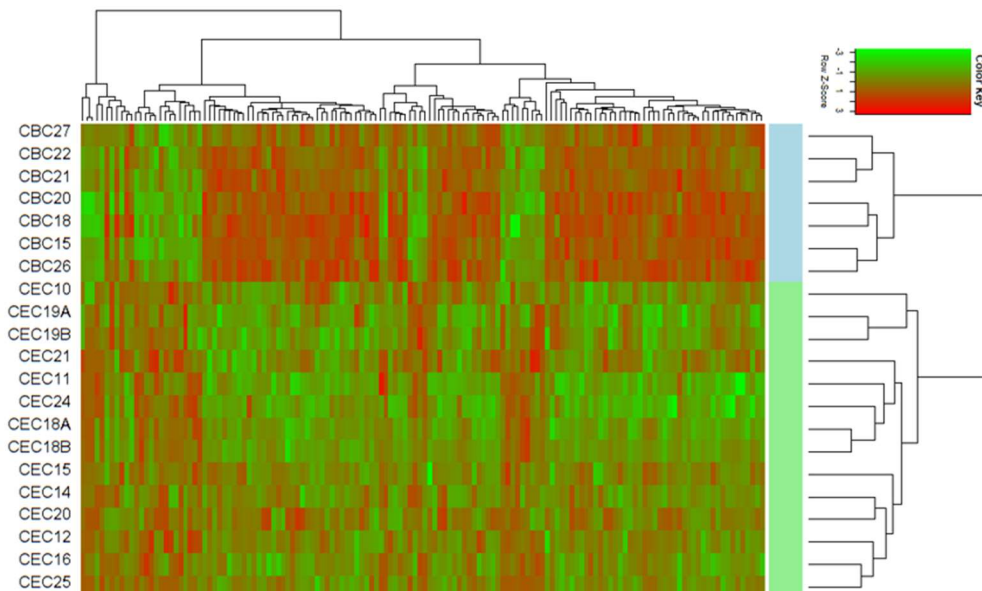


Figura 37. Representació mitjançant un mapa de calor o *heat map* de les proteïnes amb diferències estadísticament significatives ($p < 0.05$) que s'obtenen de les mostres de **CBC vs. CEC**. Els nivells d'expressió de les proteïnes estan indicats pels canvis de color. En vermell està indicada l'expressió més alta, i en verd l'expressió més baixa.

Com a resultat d'aquesta comparació, s'obtenen dues llistes de proteïnes presents en el TIF: la primera amb 39 proteïnes clarament enriquides en el CEC (Taula 10), i la segona amb 136 proteïnes enriquides en el CBC (Taula 11, inclou només les 39 primeres).

A partir d'aquestes llistes s'estudien els grups d'enriquiment del "Gene Ontology" mitjançant el programa *ShinyGO v0.61* (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go>). Les dades d'enriquiment dels processos biològics mostren que tant el CEC com el CBC presenten proteïnes relacionades amb la resposta immunològica, però clarament s'observa que els perfils d'aquestes proteïnes són diferents entre ambdós (Figura 38 i 39). La regulació de la resposta immunològica durant el creixement tumoral és un indicador de l'evolució del tumor. Per tant, sembla que la senyalització immunològica pot ser una diferència fonamental entre el desenvolupament del CEC o del CBC. Per altra banda, destaca en el TIF del CBC, i no en el del CEC, un enriquiment en proteïnes relacionades amb el metabolisme dels àcids orgànics (Figura 39).

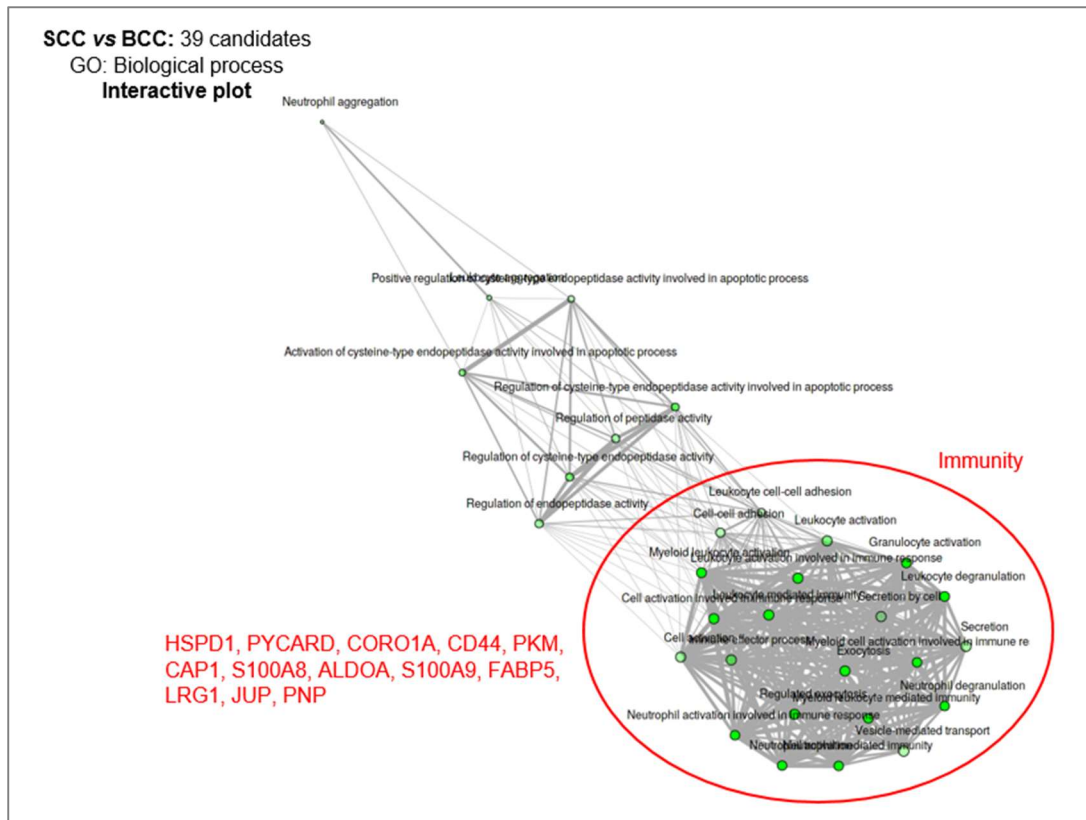
També s'ha analitzat l'enriquiment segons la localització de les proteïnes candidates (*GO: Cellular Component*). Com era d'esperar, en les mostres de TIF hi ha un enriquiment en proteïnes extracel·lulars tant en el CEC (Figura 40) com en el CBC (Figura 41). Com a diferència, només en el TIF del CEC es troben enriquides proteïnes reguladores del citoesquelet, principalment d'actina (Figura 40). Aquests darrers candidats podrien ajudar a explicar les diferències entre CEC i CBC pel que fa a la seva capacitat de disseminació.

Taula 10. Llista de les 39 proteïnes enriquides en el CEC amb un valor de FDR < 0.05. En vermell es troben ressaltades les proteïnes seleccionades per a l'estudi amb IHQ. FDR = Rati de falses descobertes.

Accession	Protein Names	Gene Names	log2(CBC/C EC)
O00515	Ladinin-1	LAD1	<
Q5K651	Sterile alpha motif domain-containing protein 9	SAMD9	<
Q81VF2	Protein AHNAK2	AHNAK2	<
P05109	Protein S100-A8;Protein S100-A8, N-terminally processed	S100A8	-3,31
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal	FABP5	-3,07
P06702	Protein S100-A9	S100A9	-2,96
P31947	14-3-3 protein sigma	SFN	-2,16
P19971	Thymidine phosphorylase	TYMP	-1,97
P00918	Carbonic anhydrase 2	CA2	-1,92
P14923	Junction plakoglobin	JUP	-1,91
P29373	Cellular retinoic acid-binding protein 2	CRABP2	-1,71
P00491	Purine nucleoside phosphorylase	PNP	-1,70
P31146	Coronin-1A	CORO1A	-1,42
P36952	Serpin B5	SERPINB5	-1,34
P01876	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1	-1,33
P23381	Tryptophan--tRNA ligase, cytoplasmic;T1-TrpRS;T2-TrpRS	WARS	-1,23
P33241	Lymphocyte-specific protein 1	LSP1	-1,10
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG1	-1,06
Q9ULZ3	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	PYCARD	-1,01
Q86VB7	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130;Soluble CD163	CD163	-1,01
P16070	CD44 antigen	CD44	-0,99
P13797	Plastin-3	PLS3	-0,98
P01834	Ig kappa chain C region	IGKC	-0,96
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	HSPD1	-0,93
P99999	Cytochrome c	CYCS	-0,91
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain	TUBA1C	-0,87
P10599	Thioredoxin	TXN	-0,80
P14618	Pyruvate kinase PKM	PKM	-0,79
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	-0,78
Q9BRA2	Thioredoxin domain-containing protein 17	TXNDC17	-0,74
P12830	Cadherin-1;E-Cad/CTF1;E-Cad/CTF2;E-Cad/CTF3	CDH1	-0,74
Q9UJ70	N-acetyl-D-glucosamine kinase	NAGK	-0,72
O76003	Glutaredoxin-3	GLRX3	-0,68
P06753	Tropomyosin alpha-3 chain	TPM3	-0,68
Q01518	Adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1	-0,63
P13693	Translationally-controlled tumor protein	TPT1	-0,62
P04899	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	GNAI2	-0,57
Q9NYL9	Tropomodulin-3	TMOD3	-0,57
P07954	Fumarate hydratase, mitochondrial	FH	-0,54

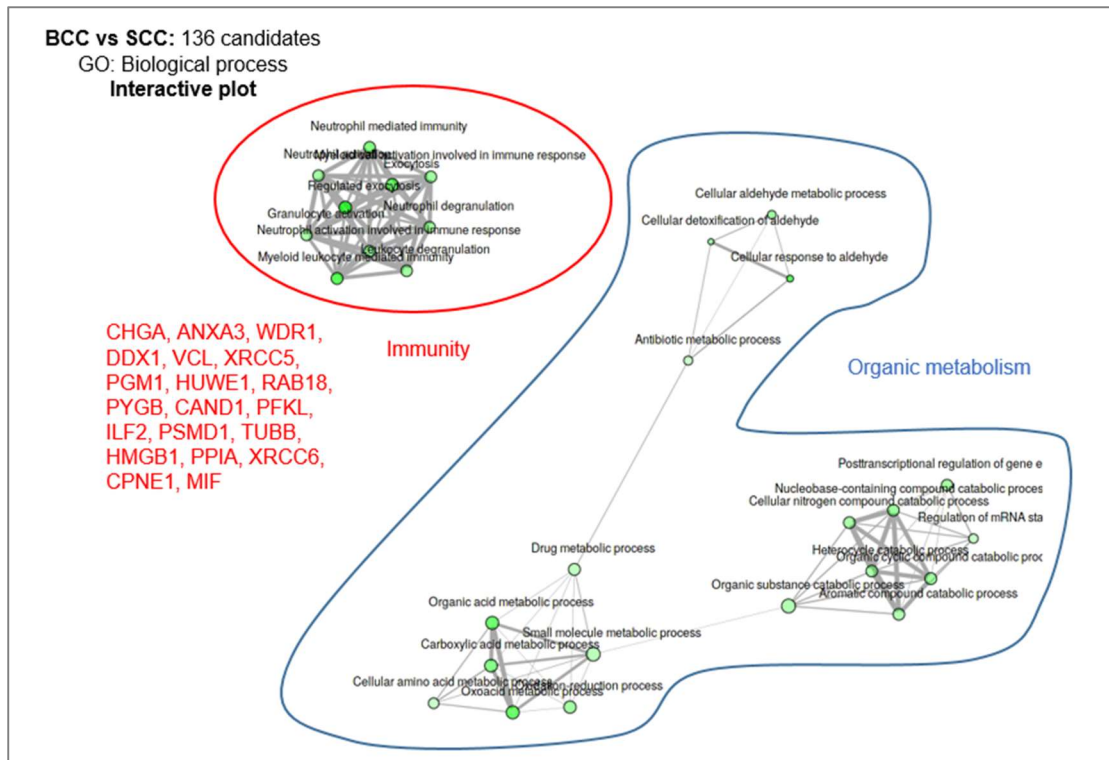
Taula 11. Llista de les primeres 39 proteïnes enriquides en els CBC amb un valor de FDR < 0.05. En vermell es troben ressaltades les proteïnes seleccionades per a l'estudi amb IHQ. *FDR = Rati de falses descobertes.*

Accession	Protein Names	Gene Names	log2(CBC/C EC)
O94760	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	DDAH1	>
O95302	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP9	FKBP9	>
P08294	Extracellular superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD3	>
P10645	Pancreastatin;SS-18;WA-8;WE-14;LF-19;Catestatin;AL-11;GV-19;GR-44;ER-3	CHGA	>
P13674	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1	P4HA1	>
P24844	Myosin regulatory light polypeptide 9	MYL9	>
P45973	Chromobox protein homolog 5	CBX5	>
P49888	Estrogen sulfotransferase	SULT1E1	>
P78347	General transcription factor II-I	GTF2I	>
P83916	Chromobox protein homolog 1	CBX1	>
P98179	RNA-binding protein 3	RBM3	>
Q01433	AMP deaminase 2	AMPD2	>
Q05193	Dynamin-1	DNM1	>
Q07666	4 domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein	KHDRBS1	>
Q13363	C-terminal-binding protein 1	CTBP1	>
Q13564	NEDD8-activating enzyme E1 regulatory subunit	NAE1	>
Q13572	Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase	ITPK1	>
Q14185	Dedicator of cytokinesis protein 1	DOCK1	>
Q55RE7	Phytanoyl-CoA dioxygenase domain-containing protein 1	PHYHD1	>
Q727G0	Target of Nesh-SH3	ABI3BP	>
Q8IXM2	Chromatin complexes subunit BAP18	BAP18	>
Q8NFU3	Thiosulfate sulfurtransferase/rhodanese-like domain-containing protein 1	TSTD1	>
Q96CN7	Isochorismatase domain-containing protein 1	ISOC1	>
Q96JP5	E3 ubiquitin-protein ligase ZFP91	ZFP91	>
Q99719	Septin-5	SEPT5	>
Q9BW83	Intraflagellar transport protein 27 homolog	IFT27	>
Q9H008	Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	LHPP	>
Q9H0D6	5-3 exoribonuclease 2	XRN2	>
Q9NP72	Ras-related protein Rab-18	RAB18	>
Q9UBG3	Cornulin	CRNN	>
Q9Y2S2	Lambda-crystallin homolog	CRYL1	>
Q9Y3C4	EKC/KEOPS complex subunit TPRKB	TPRKB	>
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	PHGDH	4,27
P11216	Glycogen phosphorylase, brain form	PYGB	3,53
O95865	N(G),N(G)-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	DDAH2	3,38
P36871	Phosphoglucomutase-1	PGM1	2,88
P49419	Alpha-aminoadipic semialdehyde dehydrogenase	ALDH7A1	2,69
P12429	Annexin A3	ANXA3	2,59
P48147	Prolyl endopeptidase	PREP	2,48



Biological process	Enrichment FDR	"Genes in list"	"Total genes"	"Functional Category"
"Cell activation involved in immune response "	1.46E-07	13	819	"Cell activation involved in immune response "
"Leukocyte activation involved in immune response "	1.46E-07	13	815	"Leukocyte activation involved in immune response "
"Leukocyte degranulation "	1.46E-07	12	632	"Leukocyte degranulation "
"Myeloid leukocyte activation "	2.91E-07	12	766	"Myeloid leukocyte activation "
"Neutrophil activation involved in immune response "	2.91E-07	11	583	"Neutrophil activation involved in immune response "
"Granulocyte activation "	2.91E-07	11	603	"Granulocyte activation "
"Neutrophil activation "	2.91E-07	11	594	"Neutrophil activation "
"Leukocyte mediated immunity "	2.91E-07	13	965	"Leukocyte mediated immunity "
"Neutrophil mediated immunity "	2.91E-07	11	591	"Neutrophil mediated immunity "
"Neutrophil degranulation "	2.91E-07	11	577	"Neutrophil degranulation "
"Regulated exocytosis "	2.91E-07	13	901	"Regulated exocytosis "
"Myeloid cell activation involved in immune response "	4.52E-07	11	640	"Myeloid cell activation involved in immune response "
"Exocytosis "	4.60E-07	13	1023	"Exocytosis "
"Myeloid leukocyte mediated immunity "	4.60E-07	11	647	"Myeloid leukocyte mediated immunity "
"Regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process "	5.96E-06	7	228	"Regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process "
"Regulation of cysteine-type endopeptidase activity "	1.40E-05	7	261	"Regulation of cysteine-type endopeptidase activity "
"Immune effector process "	1.41E-05	13	1392	"Immune effector process "
"Leukocyte activation "	1.62E-05	13	1416	"Leukocyte activation "
"Activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process "	2.29E-05	5	93	"Activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process "
"Regulation of endopeptidase activity "	4.04E-05	8	466	"Regulation of endopeptidase activity "
"Leukocyte aggregation "	4.04E-05	3	12	"Leukocyte aggregation "
"Secretion "	4.58E-05	14	1861	"Secretion "
"Cell activation "	4.76E-05	13	1591	"Cell activation "
"Regulation of peptidase activity "	5.31E-05	8	492	"Regulation of peptidase activity "
"Vesicle-mediated transport "	5.67E-05	15	2220	"Vesicle-mediated transport "
"Cell-cell adhesion "	7.88E-05	10	922	"Cell-cell adhesion "
"Neutrophil aggregation "	8.72E-05	2	2	"Neutrophil aggregation "
"Secretion by cell "	9.06E-05	13	1715	"Secretion by cell "
"Positive regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process "	0.000121703	5	142	"Positive regulation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process "
"Leukocyte cell-cell adhesion "	0.0001262	7	399	"Leukocyte cell-cell adhesion "

Figura 38. Trama interactiva i taules de gens on es representen els processos biològics enriquits en el CEC (CEC=SCC). La trama interactiva mostra la relació entre les vies enriquides. Hi ha dues vies (nodes) connectades si comparteixen un 20 % o més de gens. Els nodes més foscos són conjunts de gens enriquits significativament. Els nodes més grans representen conjunts de gens més grans. Les vores més gruixudes representen gens més solapats. Amb els cercles de colors es ressalta la naturalesa de les vies enriquides. En vermell es mostren els gens implicats en la resposta immunològica.



Biological process	Enrichment FDR	"Genes in list"	"Total genes"	"Functional Category"
	1.54E-08	59	4319	"Regulation of biological quality "
	3.03E-07	24	901	"Regulated exocytosis "
	5.75E-07	20	647	"Myeloid leukocyte mediated immunity "
	6.66E-07	5	10	"Cellular response to aldehyde "
	9.00E-07	27	1256	"Oxoacid metabolic process "
	1.05E-06	27	1276	"Organic acid metabolic process "
	1.07E-06	24	1023	"Exocytosis "
	2.03E-06	18	591	"Neutrophil mediated immunity "
	2.28E-06	25	1166	"Carboxylic acid metabolic process "
	4.54E-06	18	632	"Leukocyte degranulation "
	4.58E-06	18	640	"Myeloid cell activation involved in immune response "
	4.58E-06	19	712	"Nucleobase-containing compound catabolic process "
	4.59E-06	8	85	"Cellular aldehyde metabolic process "
	5.03E-06	17	577	"Neutrophil degranulation "
	5.04E-06	20	813	"Organic cyclic compound catabolic process "
	5.04E-06	17	583	"Neutrophil activation involved in immune response "
	5.04E-06	23	1072	"Oxidation-reduction process "
	5.08E-06	18	662	"Posttranscriptional regulation of gene expression "
	5.64E-06	17	594	"Neutrophil activation "
	6.34E-06	4	8	"Cellular detoxification of aldehyde "
	6.34E-06	17	603	"Granulocyte activation "
	6.77E-06	19	765	"Cellular nitrogen compound catabolic process "
	6.77E-06	19	764	"Heterocycle catabolic process "
	8.09E-06	35	2361	"Organic substance catabolic process "
	8.09E-06	19	778	"Aromatic compound catabolic process "
	9.88E-06	34	2273	"Small molecule metabolic process "
	1.21E-05	20	887	"Drug metabolic process "
	1.58E-05	14	438	"Cellular amino acid metabolic process "
	1.58E-05	9	152	"Antibiotic metabolic process "
	1.63E-05	10	201	"Regulation of mRNA stability "

Figura 39. Trama interactiva i taules de gens on es representen els processos biològics enriquits en el CBC (CBC=BCC). La trama interactiva mostra la relació entre les vies enriquides. Hi ha dues vies (nodes) connectades si comparteixen un 20 % o més de gens. Els nodes més foscos són conjunts de gens enriquits significativament. Els nodes més grans representen conjunts de gens més grans. Les vores més gruixudes representen gens més solapats. Amb els cercles de colors es ressalta la naturalesa de les vies enriquides. En vermell es mostren els gens implicats en la resposta immunològica.

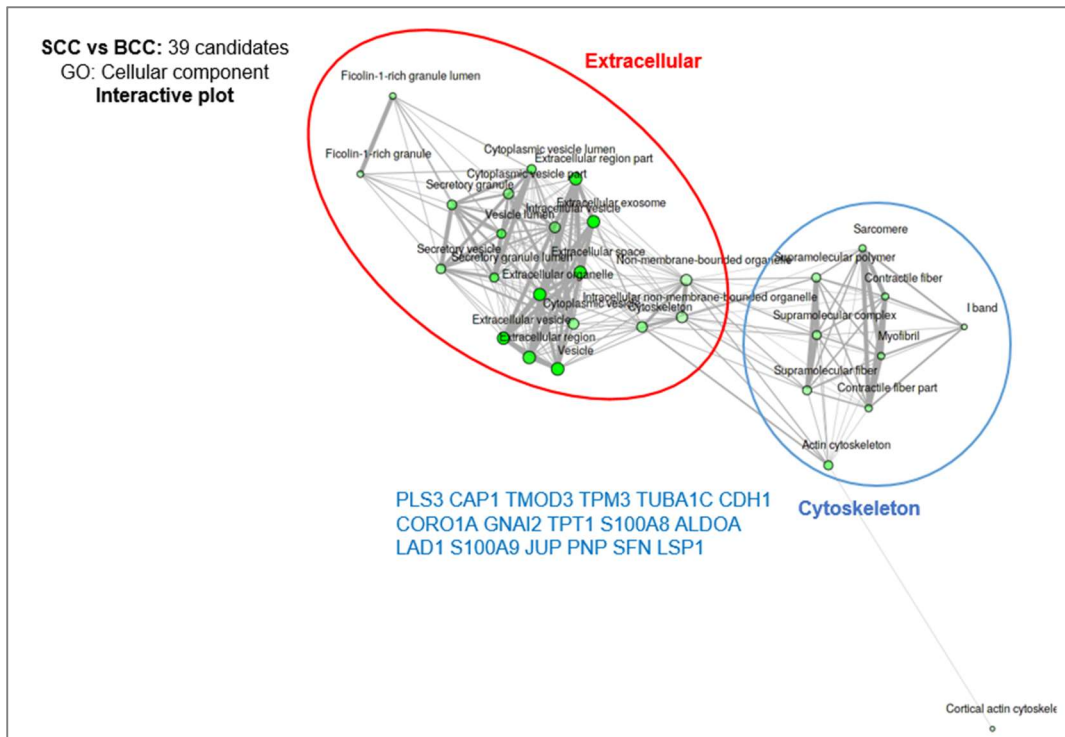


Figura 40. Trama interactiva on es representa la **localització cel·lular de les proteïnes enriquides en el CEC (CEC=SCC)**. La trama interactiva mostra la relació entre les localitzacions enriquides (*ShinyGO* v0.61; <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>). Hi ha dues vies (nodes) connectades si comparteixen un 20 % o més de gens. Els nodes més foscos són conjunts de gens enriquits significativament. Els nodes més grans representen conjunts de gens més grans. Les vores més gruixudes representen gens més solapats. Amb els cercles de colors es ressalten les localitzacions enriquides, en aquest cas extracel·lulars i de citoesquelet.

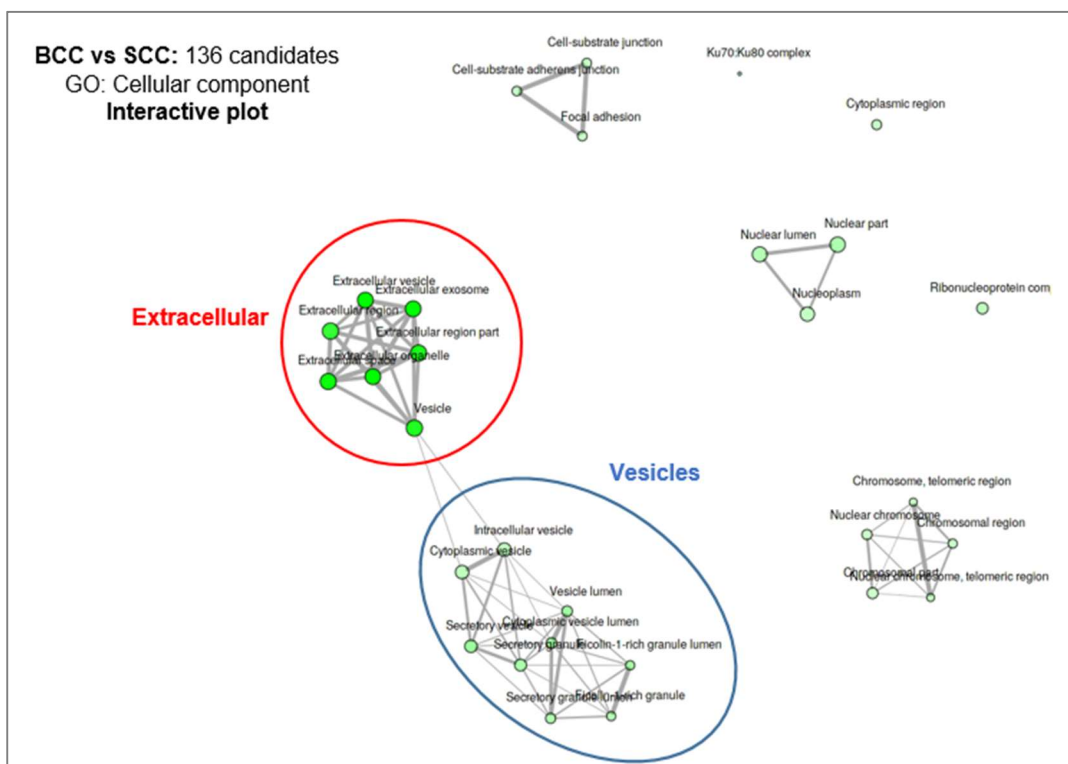


Figura 41. Trama interactiva on es representa la **localització cel·lular de les proteïnes enriquides en el CBC (CBC=BCC)**. La trama interactiva mostra la relació entre les localitzacions enriquides (*ShinyGO* v0.61; <http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>). Hi ha dues vies (nodes) connectades si comparteixen un 20 % o més de gens. Els nodes més foscos són conjunts de gens enriquits significativament. Els nodes més grans representen conjunts de gens més grans. Les vores més gruixudes representen gens més solapats. Amb els cercles de colors es ressalten les localitzacions enriquides, en aquest cas extracel·lulars i de vesícules.

Selecció de les proteïnes candidates

Destaquen doncs dues diferències principals entre els perfils proteòmics del CBC i del CEC: 1) Proteïnes del citoesquelet enriquides en el CEC i 2) Diferent perfil de proteïnes regulant la resposta immunològica en ambdós tumors. Agafant com a base aquestes dues diferències, hem seleccionat les proteïnes candidates d'entre les més enriquides en cada un dels tumors implicades en aquestes funcions. Un altre requisit que s'ha tingut en compte a l'hora de seleccionar els candidats és la disponibilitat d'un anticòs amb bons resultats previs en tincions immunohistoquímiques i immunoblots en d'altres tumors primaris.

Caracterització de l'expressió i la localització de les proteïnes candidates

Les dades obtingudes a partir de l'anàlisi proteòmica indiquen quins són els candidats enriquits en el TIF de cadascun dels CQ. Cal considerar però, que aquestes proteïnes poden haver estat secretades en el TIF des de diferents compartiments cel·lulars. Per tant, l'origen dels candidats poden ésser les pròpies cèl·lules tumorals, però també l'estroma o l'infiltrat de cèl·lules del sistema immunològic. S'espera que els candidats s'expressin almenys en algun dels tres tipus cel·lulars. Per tal de resoldre aquesta qüestió, s'estudia l'expressió i la localització de les proteïnes candidates mitjançant immunohistoquímica (IHQ) en mostres de tumors primaris de pacients. En les Taules 42 i 43 es poden veure resumides les característiques clíniques i histològiques d'aquests pacients. Les mostres IHQ estudiades (30 CBCs, 30 CECs) presenten les següents característiques:

- El grup dels **CECs** consta de 19 homes i 11 dones, amb una mitjana d'edat de 84.1 anys (DE 8.2). El 66.6 % dels CECs estan localitzats a la regió de "cara i coll", el 16.7 % al cuir, el 3.3 % al tronc, i el 13.3 % al dors de les mans. En tres dels pacients trobem immunosupressió. El 52.0 % dels pacients havien tingut prèviament altres carcinomes de queratinòcits. Pel que fa al grau de diferenciació histològica, el 46.7 % són carcinomes ben diferenciats, el 26.6 % són moderadament diferenciats i el 26.7 % són mal diferenciats. El 16.7 % dels CECs presenta infiltració perineural o perivascular a l'estudi anatomopatològic. El 76.7 % eren tumors primaris, el 16.7 % eren tumors que havien recidivat i el 6.7 % eren letàlides. Sis dels pacients havien mort a conseqüència del CEC.
- El grup dels **CBCs** consta de 20 homes i 10 dones, amb una mitjana d'edat de 73.1 anys (DE 12.9). El 76.6 % dels CBCs estan localitzats a la regió de "cara i coll", el 3.3 % al cuir, el 10.0 % al tronc, i el 6.6 % a les extremitats. En un dels pacients trobem immunosupressió (receptor d'un transplantament d'òrgan sòlid). El 40.0 % dels pacients havien tingut prèviament altres CQ. Referent al subtipus histològic, el 33.3 % són nodulars, el 10.0 % superficials, el 36.7 % infiltrants i el 20.0 % esclerodermiformes. Cap d'ells presenta infiltració perineural o perivascular a l'estudi anatomopatològic. El 83.3 % eren tumors primaris i el 16.7 % eren tumors que havien recidivat. Un dels pacients, que havia rebut tractament amb Vismodegib, havia mort a conseqüència del CBC.

Taula 42. Característiques clíniques i histopatològiques de les mostres de CEC.

Mostra CEC	Comentari	Histologia	H/D	Edat	Localització
CEC 30		Mal diferenciat	Home	90	Preauricular
CEC 31		Ben diferenciat	Home	95	Frontotemporal
CEC 32		Moderadament diferenciat	Home	92	Galta
CEC 33	Èxitus pel CEC	Ben diferenciat	Dona	89	Front
CEC 34	Letàlide del CEC 35 Amb M1 suprarenals	Mal diferenciat	Home	82	Preauricular
CEC 35	Primari de la letàlide CEC 34 Amb M1 suprarenals	Ben diferenciat	Home	82	Orella
CEC 36		Mal diferenciat	Home	91	Galta
CEC 37	Èxitus pel CEC	Mal diferenciat amb invasió perineural	Home	86	Cuir
CEC 38	Èxitus pel CEC	Ben-moderadament diferenciat	Home	68	Natja
CEC 39	Èxitus pel CEC	Moderadament diferenciat amb invasió perineural	Dona	89	Front
CEC 40	Primari de la letàlide CEC 41 Rebia tractament amb Hydrea® Èxitus pel CEC	Moderadament diferenciat amb invasió perineural	Dona	87	Nas
CEC 41	Letàlide del CEC 40 Rebia tractament amb Hydrea® Èxitus pel CEC	Mal diferenciat	Dona	87	Cervical
CEC 42	CEC recidivat	Poc diferenciat amb infiltració perineural	Home	80	Cuir
CEC 43		Mal diferenciat	Dona	84	Preauricular
CEC 44	Receptor de trasplantament d'òrgan sòlid que rebia tractament immunosupressor	Ben diferenciat	Dona	74	Front
CEC 45		Moderadament diferenciat	Dona	81	Front
CEC 46		Moderadament diferenciat	Home	91	Cuir
CEC 47		Ben diferenciat	Dona	82	Galta
CEC 48		Ben diferenciat	Home	73	Galta
CEC 49		Ben diferenciat	Home	89	Dors de la mà
CEC 50		Ben diferenciat	Dona	82	Galta
CEC 51		Ben diferenciat	Dona	84	Dors de la mà
CEC 52		Ben diferenciat	Dona	65	Galta
CEC 53		Ben diferenciat	Home	100	Galta
CEC 54		Moderadament diferenciat	Home	95	Dors de la mà
CEC 55		Moderadament diferenciat	Home	70	Cara
CEC 56		Ben diferenciat	Home	83	Dors de la mà
CEC 57		Ben diferenciat	Home	86	Orella
CEC 58		Mal diferenciat, sarcomatoide	Home	76	Cuir
CEC 59		Ben diferenciat	Home	89	Cara

M1=Metàstasi

Taula 43. Característiques clíniques i histopatològiques de les mostres de CBC.

Mostra CBC	Comentari	Histologia	H/D	Edat	Localització
CBC 30		Nodular	Home	70	Galta
CBC 31		Nodular	Home	72	Front
CBC 32		Nodular	Home	75	Coll
CBC 33		Nodular	Home	80	Galta
CBC 34	CBC recidivat Tractat amb Vismodegib	Esclerodermiforme	Dona	94	Nas
CBC 35	CBC recidivat Tractat amb Vismodegib	Infiltrant	Dona	86	Clavícula
CBC 36	CBC recidivat Tractat amb Vismodegib	Infiltrant	Home	62	Galta
CBC 37	Tractat amb Vismodegib Éxitus pel CBC	Infiltrant	Home	57	Cara
CBC 38	CBC recidivat Tractat amb Vismodegib Rebia tractament amb Hydrea®	Infiltrant	Home	82	Nas
CBC 39	Síndrome de Gorlin	Esclerodermiforme	Home	57	Tronc
CBC 40	Síndrome de Gorlin	Infiltrant	Home	58	Front
CBC 41		Esclerodermiforme	Dona	62	Galta
CBC 42		Esclerodermiforme	Dona	80	Nas
CBC 43		Esclerodermiforme	Home	94	Front
CBC 44		Esclerodermiforme	Dona	74	Cama
CBC 45	CBC recidivat	Infiltrant	Home	80	Nas
CBC 46		Infiltrant	Home	85	Orella
CBC 47		Infiltrant	Dona	79	Nas
CBC 48		Infiltrant	Home	91	Orella
CBC 49		Superficial	Home	64	Tronc
CBC 50		Nodular	Dona	69	Preauricular
CBC 51		Nodular	Home	65	Retroauricular
CBC 52		Nodular	Dona	84	No consta
CBC 53		Nodular	Home	86	Parietal
CBC 54		Superficial	Home	69	Tronc
CBC 55		Superficial	Dona	43	Front
CBC 56		Nodular	Dona	54	Front
CBC 57		Infiltrant	Home	85	Braç
CBC 58		Infiltrant	Home	78	Nas
CBC 59		Nodular	Home	58	Galta

Caracterització de l'expressió i la localització de les proteïnes candidates relacionades amb la resposta immunològica

El primer grup de proteïnes estudiades pertany als candidats relacionats amb la resposta immunològica: la cromogranina A, el PNP i la FABP5.

- **CROMOGRANINA A**

La cromogranina A (Chga) és una glicoproteïna àcida amb un pes molecular de 75 kDa que només hem trobat present al TIF dels CBCs. Està localitzada a la fracció soluble de les glàndules neurosecretores. S'expressa en pràcticament tots els tipus de cèl·lules neuroendocrines, per tant, s'utilitza com a marcador "panneuroendocrí". Està present al plasma i al fluid intersticial¹¹⁰. Depenent del context, la Chga pot mostrar activitat anti-inflamatòria, inhibint la infiltració dels macròfags, o pro-inflamatòria, promovent l'expressió de gens pro-inflamatoris¹¹¹.

Expressió i localització de la cromogranina A en les mostres d'immunohistoquímica

No trobem expressió de Chga en la pell sana en el 87.5 % (7/8) de les mostres (Figura 44.A). En una de les mostres (1/8) podem observar lleu tinció citoplasmàtica a la capa basal (Figura 44.B).

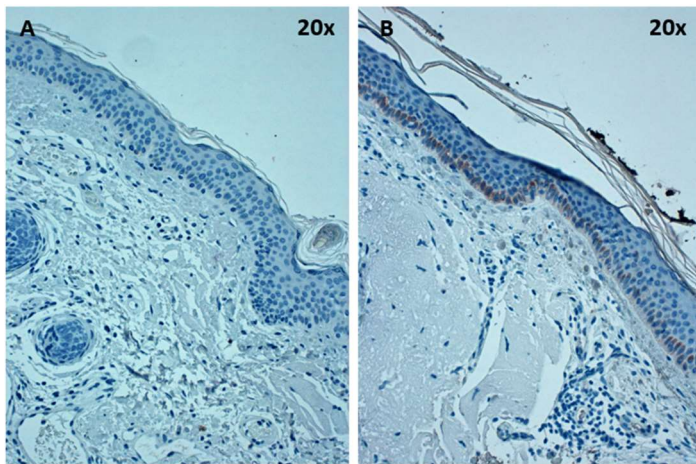


Figura 44. Expressió de Chga en dues mostres representatives de pell sana. **A)** Absència d'expressió. **B)** Expressió citoplasmàtica lleu a nivell de la capa basal.

Al CBC, trobem escassa o nul·la expressió a nivell de les cèl·lules neoplàsiques en 3/4 mostres (Figura 45.A). A la darrera mostra trobem lleu-moderada expressió citoplasmàtica (Figura 45.B). Cal destacar que en dues mostres de CBC trobem intensa expressió a nivell de l'estroma tumoral (Figura 45 B i C). Al CEC, trobem nul·la expressió en 4/4 mostres, tant a nivell de les cèl·lules neoplàsiques com estromals (Figura 46) (Taula 12).

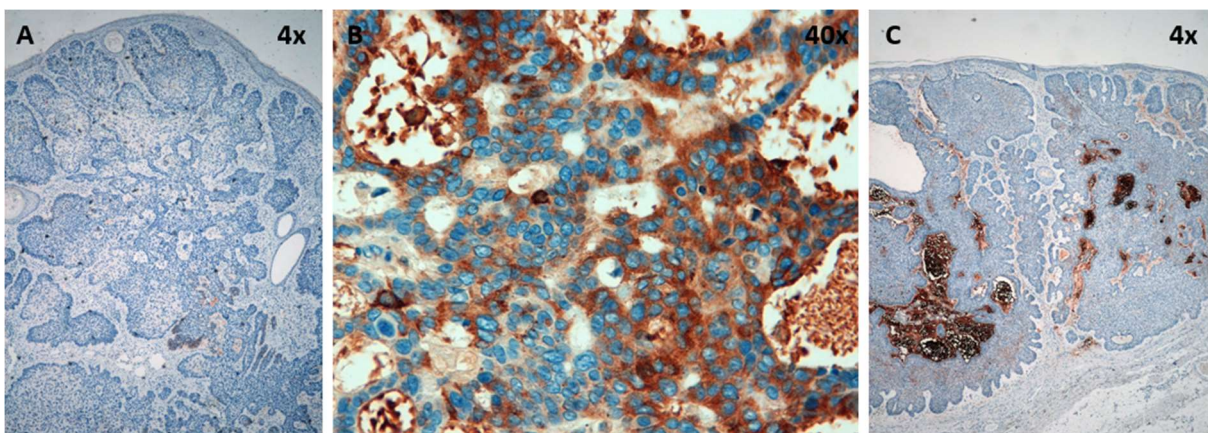


Figura 45. Expressió de Chga en 3 mostres representatives de CBCs. **A)** Absència d'expressió. **B)** Expressió citoplasmàtica lleu-moderada a nivell de les cèl·lules neoplàsiques i expressió moderada a nivell estromal. **C)** Expressió escassa a nivell de les cèl·lules neoplàsiques i expressió intensa a nivell estromal intratumoral.

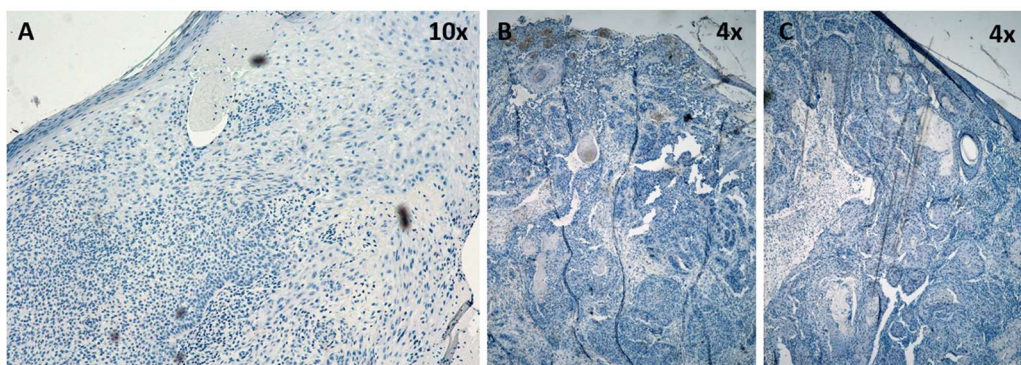


Figura 46. Absència d'expressió de cromogranina A en 3 mostres representatives de CEC, tant a nivell de les cèl·lules neoplàsiques com a l'estroma.

Taula 12. Nivells d'expressió de les proteïnes Chga i PNP en el teixit tumoral de cada una de les mostres de CBC i CEC.

Mostra	Cromogranina A	PNP
CBC 30	-	0
CBC 31	++	270
CBC 32	+	50
CBC 33	-	30
CEC 30	-	100
CEC 31	-	300
CEC 32	-	300
CEC 33	-	300

- **PNP**

Les proteïnes PNP (*purine nucleoside phosphorylase*) i FABP5 (*fatty acid-binding protein 5*) estan relacionades amb l'activació del sistema immunològic i es troben molt enriquides en el TIF del CEC (Taula 12 i 14). La proteïna PNP té com a principal funció el metabolisme dels nucleòtids, però també està implicada en múltiples altres funcions¹¹². Entre aquestes altres funcions, és important per a la maduració i activació dels limfòcits T. També s'ha descrit que més enllà de les seves activitats intracel·lulars, aquesta proteïna és secretada al medi en cèl·lules normals i tumorals¹¹³.

Secreció de PNP en les mostres de proteòmica del TIF

Al CEC, trobem una secreció de PNP 8.21 vegades superior a la de la pell sana ($p = 0.0005$). A més a més, al CEC trobem una secreció de PNP 3.24 vegades superior a la del CBC ($p = 0.0007$). Quan comparem el CBC amb la pell sana, l'expressió és 2.53 vegades major en el CBC, però no de manera significativa ($p = 0.15$).

Expressió i localització del PNP en les mostres d'immunohistoquímica

Troblem moderada-intensa expressió de PNP a la pell sana en el 100.0 % (8/8) de les mostres (Figura 47). La tinció és present en totes les capes de la pell, tant a nivell citoplasmàtic (+/++) com nuclear (+/+++).

En el CBC, trobem nul·la expressió en les cèl·lules neoplàsiques en 1/4 mostres, lleu en 2/4 mostres i intensa en 1/4 mostres (Figura 48). En el CEC, trobem moderada-intensa expressió en les cèl·lules neoplàsiques en les 4 mostres (Figura 49) (Taula 12). A les mostres d'ambdós tumors, l'expressió també és més intensa a nivell nuclear que a nivell citoplasmàtic. Per altra banda, tant en el CEC com en el CBC trobem 3/4 mostres (3 de cada tumor respectivament) amb lleu-moderada tinció a nivell estromal.

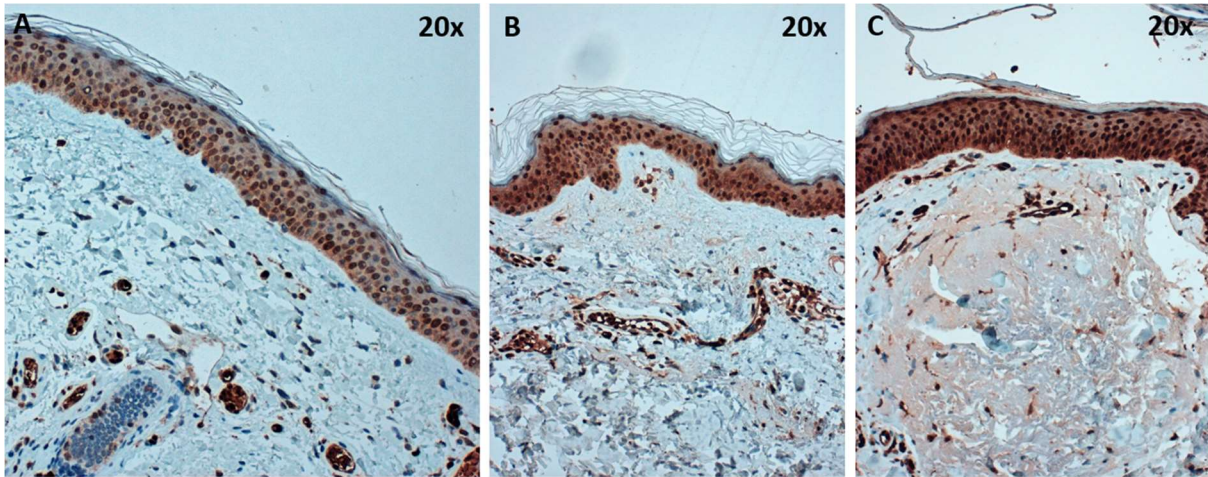


Figura 47. Expressió de PNP en 3 mostres representatives de pell sana. Podem observar que l'expressió és present en totes les capes, i és més intensa a nivell nuclear que a nivell citoplasmàtic.

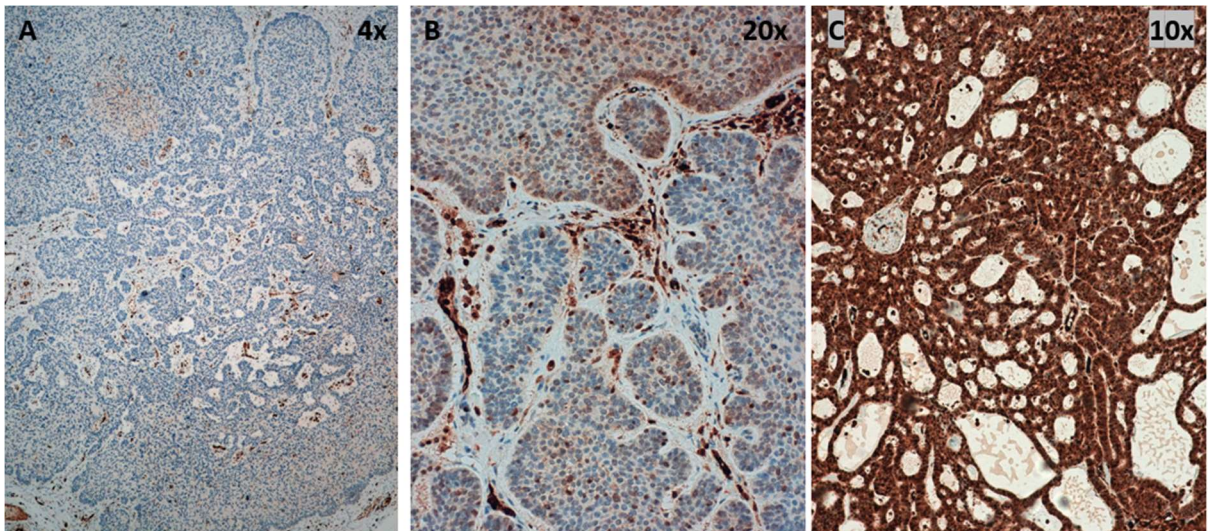


Figura 48. Expressió de PNP en 3 mostres de CBC. En les cèl·lules neoplàsiques trobem **A)** Absència d'expressió, **B)** Expressió lleu, **C)** Expressió intensa. A nivell estromal trobem **A)** Lleu expressió, **B)** Moderada expressió, **C)** Absència d'expressió.

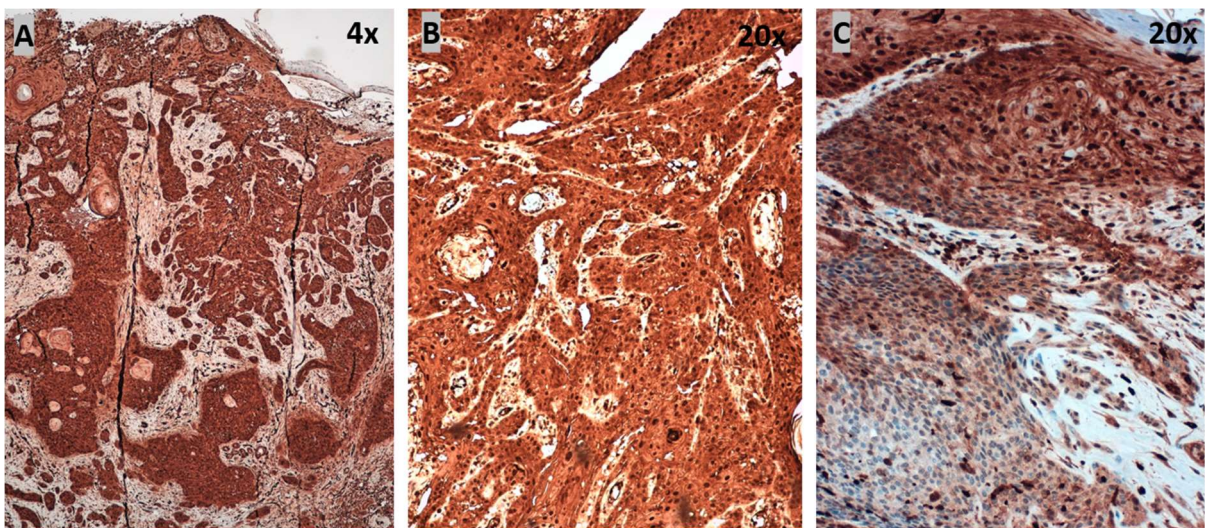


Figura 49. Expressió de PNP en 3 mostres de CEC. En les cèl·lules neoplàsiques trobem **A-B)** Intensa expressió, **C)** Expressió moderada o escassa en algunes zones del tumor. A nivell estromal trobem **A-C)** Expressió lleu-moderada.

- **FABP5**

La proteïna FABP5 (de l'anglès, *fatty acid-binding protein 5*, també anomenada E-FABP, d'epidèrmica o PA-FABP de *psoriasis-associated*) és una proteïna de baix pes molecular (15 kDa) intracel·lular implicada en la captació i el transport dels àcids grassos (AG). Forma part de la família de 10 isoformes de les FABPs. Durant el procés de proliferació de les cèl·lules neoplàsiques, els AG són necessaris tant com a font d'energia com per a la producció de molècules de senyalització i components de les membranes cel·lulars¹¹⁴. Les FABPs estan implicades en la regulació metabòlica dels AG durant la carcinogènesi. A més a més, s'ha descrit que alguns membres de la família FABP, entre elles la FABP5, tenen l'habilitat de creuar la membrana extracel·lular¹¹⁵. Entre les funcions de les FABPs trobem el transport de lípids a l'espai intracel·lular per a ser emmagatzemats com a gotetes lipídiques, al reticle endoplasmàtic per a la síntesi de membranes i al nucli per a regular la transcripció¹¹⁶⁻¹¹⁷. Per altra banda, la FABP5 també s'expressa abundantment a les cèl·lules immunològiques i té un paper crucial en la immunovigilància contra els tumors en els primers estadis¹¹⁸⁻¹²⁰.

Secreció de FABP5 en les mostres de proteòmica del TIF

En el CEC, trobem una secreció de FABP5 6.87 vegades superior a la de la pell sana ($p = 0.03$). A més a més, en el CEC trobem una secreció de FABP5 8.43 vegades superior a la del CBC ($p = 0.003$). En canvi, quan comparem el CBC amb la pell sana, aquesta darrera té una expressió no significativament superior, de 1.23 ($p = 0.79$).

Expressió i localització de la FABP5 en les mostres d'immunohistoquímica

Troblem expressió de FABP5 en la pell sana, a l'epiteli estratificat i granulós, però amb la capa basal negativa (Figura 50). Es localitza al citoplasma i al nucli. La mitjana dels *histoscores* de la pell sana és de 177.2 (DE 37.9).

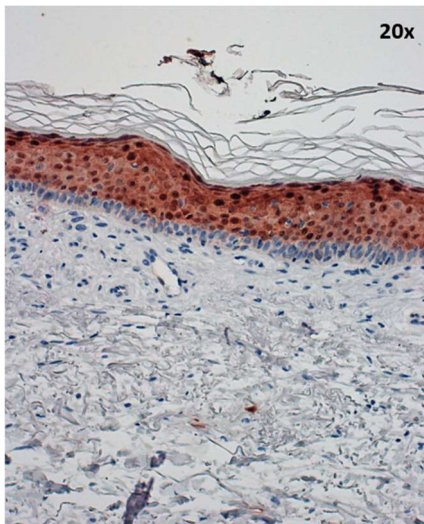


Figura 50. Expressió de FABP5 en una mostra representativa de pell sana. S'expressa tant al citoplasma com al nucli. Veiem com la capa basal és negativa.

Pel que fa al CBC, en general les seves cèl·lules neoplàsiques són negatives (23/30) (Taula 13). En les 7 mostres restants de CBC amb poca expressió a nivell de les cèl·lules neoplàsiques (*histoscores* d'entre 5-30, mitjana de 14.3, DE 8.4) trobem la tinció als centres dels nius tumorals, on les cèl·lules estan més diferenciades i són més escamoides (Figura 51). En 4/30 mostres trobem lleu tinció a nivell de l'estroma, independentment de l'expressió a nivell de les cèl·lules neoplàsiques.

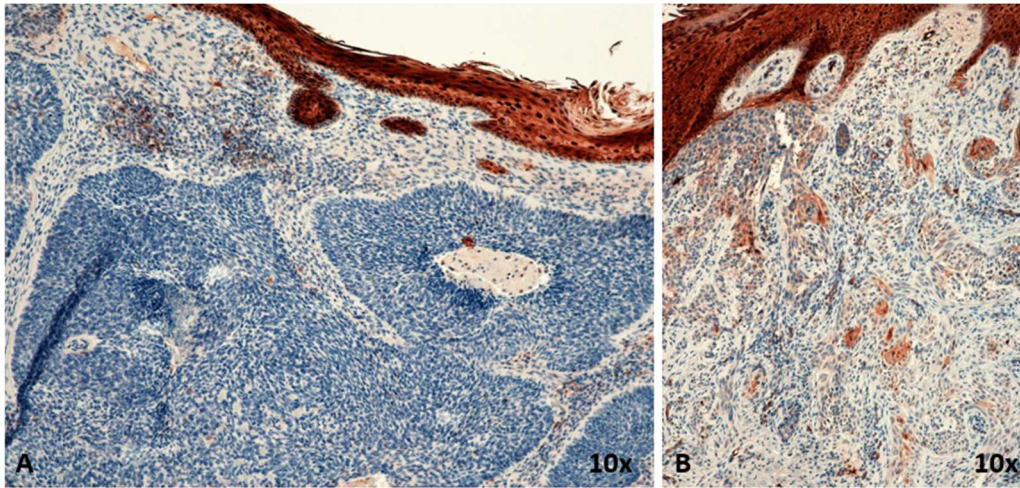


Figura 51. Expressió de FABP5 a les cèl·lules neoplàsiques de dues mostres de CBC. **A)** Tinció negativa. **B)** *Histoscore* de 10.

En el CEC, trobem la FABP5 expressada intensament (*histoscores* 200-300) (Taula 14) en les cèl·lules neoplàsiques en el 86.7 % de les mostres (26/30), però amb la particularitat de que es perd a les àrees agressives o mal diferenciades del tumor o a les letàlides (Figura 52). La mitjana dels *histoscores* a les àrees ben diferenciades és de 265.0 (DE 45.1), i a les àrees mal diferenciades és de 30.4 (DE 33.2). La tinció és nuclear (++) i citoplasmàtica/membrana (++) i es perd en totes dues a les àrees agressives. A més a més, la trobem lleument expressada a nivell de l'estroma en el 60% de les mostres.

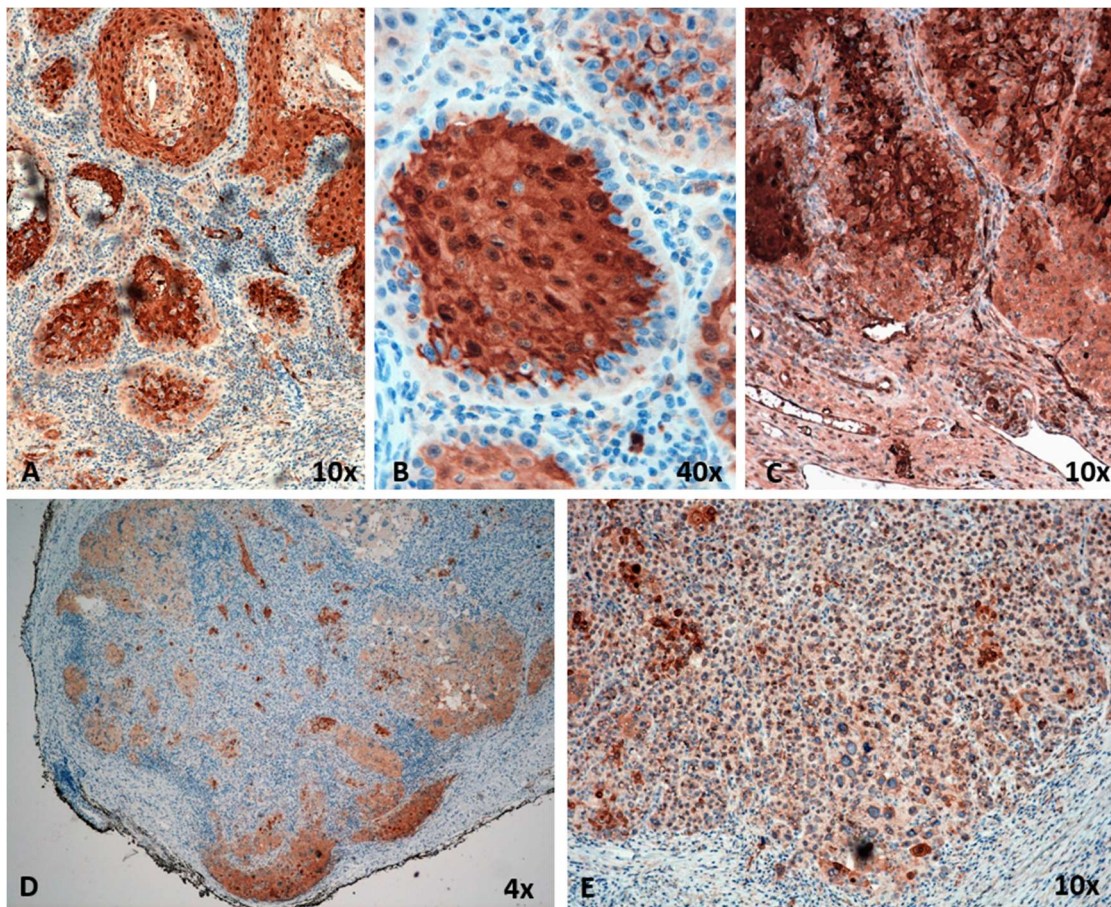


Figura 52. Expressió de FABP5 en mostres representatives de CEC. **A-C)** CECs primaris on es pot apreciar l'expressió més intensa al centre i menys intensa a la perifèria dels nius, on les cèl·lules estan més indiferenciades. **D-E)** Letàlide de CEC on s'aprecia l'escassa expressió de FABP5 a 4x (**D**) i 10x (**E**).

Taula 13. Nivells d'expressió (*histoscores*) de les proteïnes en les cèl·lules neoplàsiques de cada una de les mostres de CBC.

Mostra CBC	FABP5	LADININA-1	CORNULINA	ESTRATAFINA
CBC 30	20	20	280	50
CBC 31	15	40	30	220
CBC 32	0	10	210	20
CBC 33	0	40	150	100
CBC 34	0	30	290	50
CBC 35	0	60	60	20
CBC 36	0	0	160	70
CBC 37	30	250	270	50
CBC 38	0	70	200	30
CBC 39	0	40	280	50
CBC 40	0	0	270	20
CBC 41	0	10	220	30
CBC 42	5	0	200	0
CBC 43	0	160	290	20
CBC 44	10	0	10	0
CBC 45	0	10	300	10
CBC 46	0	0	280	15
CBC 47	0	0	280	15
CBC 48	0	0	300	0
CBC 49	0	0	220	0
CBC 50	0	10	200	10
CBC 51	0	20	180	80
CBC 52	0	80	260	25
CBC 53	0	30	270	90
CBC 54	10	65	190	50
CBC 55	10	60	20	130
CBC 56	0	0	20	0
CBC 57	0	50	290	40
CBC 58	0	140	190	90
CBC 59	0	0	270	30

Taula 14. Nivells d'expressió (*histoscores*) de les proteïnes en les cèl·lules neoplàsiques de cada una de les mostres de CEC. Amb la X s'indiquen les mostres de CEC que no tenen ambdues zones, sinó només àrees ben diferenciades o mal diferenciades.

Mostra CEC	FABP5 de les àrees ben diferenciades	FABP5 de les àrees mal diferenciades	LAD1	CRNN	SFN
CEC 30	220	10	130	80	290
CEC 31	280	20	300	10	300
CEC 32	220	10	250	0	300
CEC 33	230	20	220	120	300
CEC 34	X	40	280	80	290
CEC 35	300	40	280	80	300
CEC 36	150	0	280	80	280
CEC 37	150	X	250	140	280
CEC 38	300	50	300	150	300
CEC 39	280	20	250	120	300
CEC 40	300	150	250	100	300
CEC 41	X	40	180	0	300
CEC 42	300	X	160	70	300
CEC 43	250	20	240	10	150
CEC 44	300	X	300	120	300
CEC 45	300	50	260	80	300
CEC 46	200	10	280	40	250
CEC 47	300	30	280	70	280
CEC 48	0	0	250	0	280
CEC 49	280	0	250	20	300
CEC 50	280	X	280	150	280
CEC 51	250	0	270	20	300
CEC 52	280	100	250	130	300
CEC 53	300	10	250	20	280
CEC 54	250	20	250	80	300
CEC 55	300	50	270	80	280
CEC 56	300	50	270	110	280
CEC 57	290	20	280	60	270
CEC 58	X	20	0	80	10
CEC 59	280	10	130	0	280

Estudi estadístic FABP5

En la Figura 53 podem comparar gràficament l'expressió (segons els *histoscores*) de FABP5 en les mostres de pell sana, CBC i CEC (classificats entre àrees ben diferenciades i àrees mal diferenciades). L'expressió en les mostres de pell sana és moderada, absent en els CBCs i augmenta intensament en els CECs en les àrees ben diferenciades, per a tornar-se gairebé absent en les àrees mal diferenciades. Aquestes diferències, en global, són estadísticament significatives ($p < 0.000001$).

A continuació, per a estudiar més a fons aquestes relacions, es van realitzar comparacions múltiples respecte a la categoria de referència, que en aquest cas és la pell sana. Les diferències són estadísticament significatives tant per al CBC ($p < 0.00001$), com per als CECs en les àrees ben diferenciades ($p < 0.00001$) i en les àrees mal diferenciades ($p < 0.00001$).

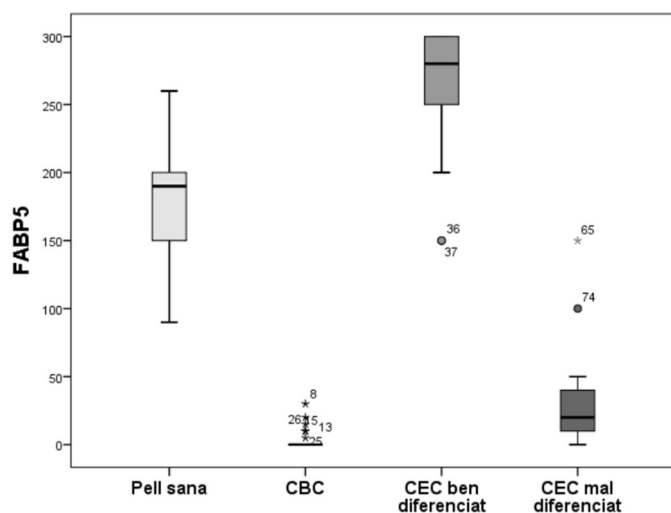


Figura 53. Diagrama de caixes on es veu representada l'expressió de FABP5 en les cèl·lules neoplàsiques dels diferents tumors i en la pell sana segons els valors dels *histoscores*.

En el cas del CBC, l'expressió de FABP5 és escassa en totes les mostres, independentment de l'agressivitat histològica, per tant, en l'estudi estadístic no s'ha trobat cap relació entre l'expressió de FABP5 i el subtipus histològic o el fet de ser tumor primari vs. recidiva.

Caracterització de l'expressió i la localització de les proteïnes candidates relacionades amb el citoesquelet

- **ESTRATAFINA**

L'estratafina (SFN) o proteïna 14-3-3 sigma forma part d'una família de 7 isoformes de proteïnes ubiques reguladores de diversos processos cel·lulars (transducció de senyals, regulació del cicle cel·lular, apoptosi, organització del citoesquelet, etc.). L'isoforma 14-3-3 sigma és la que s'ha relacionat més directament amb el càncer. Inicialment la van descriure com una proteïna el gen de la qual era induïble mitjançant p53 com a resposta a agents nocius per a l'ADN. La classificaven com un regulador negatiu del cicle cel·lular¹²¹, aturant-lo en fase G2 per a permetre la reparació de l'ADN abans d'iniciar-se la mitosi.

Secreció de SFN en les mostres de proteòmica del TIF

En el CEC, trobem una secreció de SFN 3.60 vegades superior a la de la pell sana ($p = 0.003$). A més a més, en el CEC trobem una secreció de SFN 4.46 vegades superior a la del CBC ($p = 0.00001$). En canvi, quan comparem el CBC amb la pell sana, aquesta darrera té una expressió escassament superior, de 1.24 ($p = 0.46$).

Expressió i localització de l'SFN en les mostres d'immunohistoquímica

Troblem expressió de SFN en la pell sana, inclosa la capa basal. Es localitza tant al citoplasma com a la membrana, però no als nuclis (Figura 54). La mitjana dels *histoscores* és de 259.5 (DE 40.9).

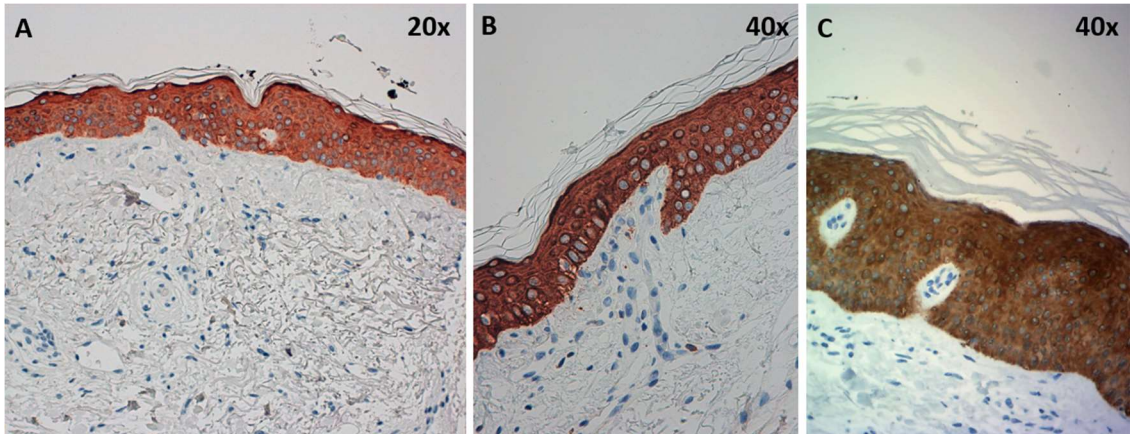


Figura 54. Expressió de SFN en 3 mostres representatives de pell sana. Es pot apreciar com s'expressa intensament a nivell citoplasmàtic, però no a nivell nuclear.

En general, els CBCs expressen escassa o lleu SFN a nivell de les cèl·lules neoplàsiques, amb una mitjana d'*histoscores* de 45.3 (DE 47.4) (Figura 55) (Taula 13). De la mateixa manera que passa en la pell sana, la trobem expressada al citoplasma de les cèl·lules neoplàsiques, però no al nucli. En les mostres que expressen SFN (21/30), el 66.7 % (14/21) ho fan més al centre dels nus, i menys a la perifèria (Figures 55 D i E). En el 33.3 % (7/21) de mostres restants l'expressió és homogènia (Figures 55 F i G). En cap de les mostres de CBC trobem expressió d'SFN a nivell estromal.

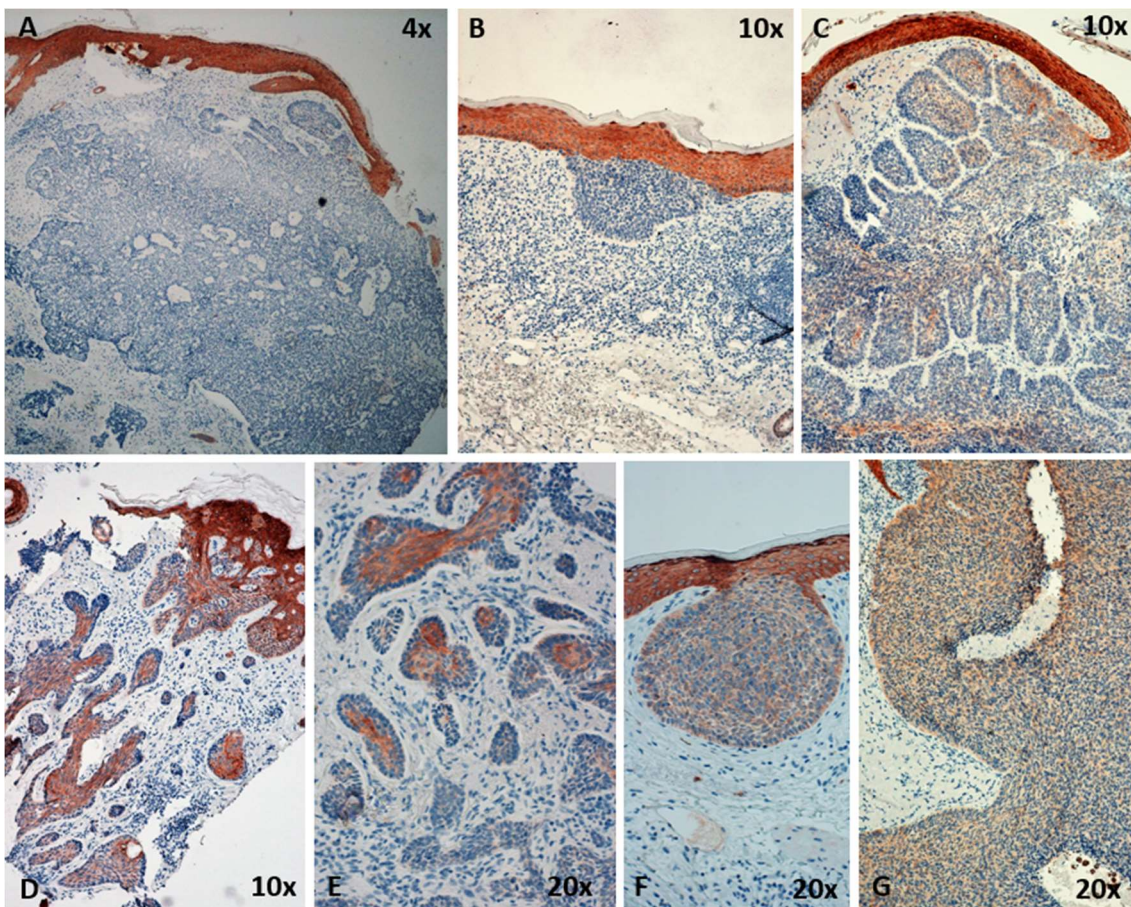


Figura 55. Expressió de SFN en les cèl·lules neoplàsiques de diverses mostres representatives de CBC. Es pot apreciar com s'expressa a nivell citoplasmàtic, però no a nivell nuclear. **A-B)** CBCs sense expressió de SFN. **C-E)** CBCs amb diferents graus d'expressió de SFN on s'observa que la intensitat als centres dels nus és major que en la perifèria. **F-G)** CBCs amb lleu expressió de SFN, de distribució homogènia.

En el CEC, trobem l'SFN intensament expressada a nivell de les cèl·lules neoplàsiques, mitjana de 276.0 (DE 57.7) (Taula 14), independentment de l'agressivitat histològica (Figura 56). Sobretot a nivell de membrana (+++) i citoplasma (++/+++). Cal destacar que, a diferència de la pell sana i del CBC, també la trobem expressada al nucli (++/+++), en el 66.7 % (20/30) de les mostres (Figura 56.E), independentment de l'agressivitat histològica. A nivell estromal només la trobem expressada en el 19% de les mostres.

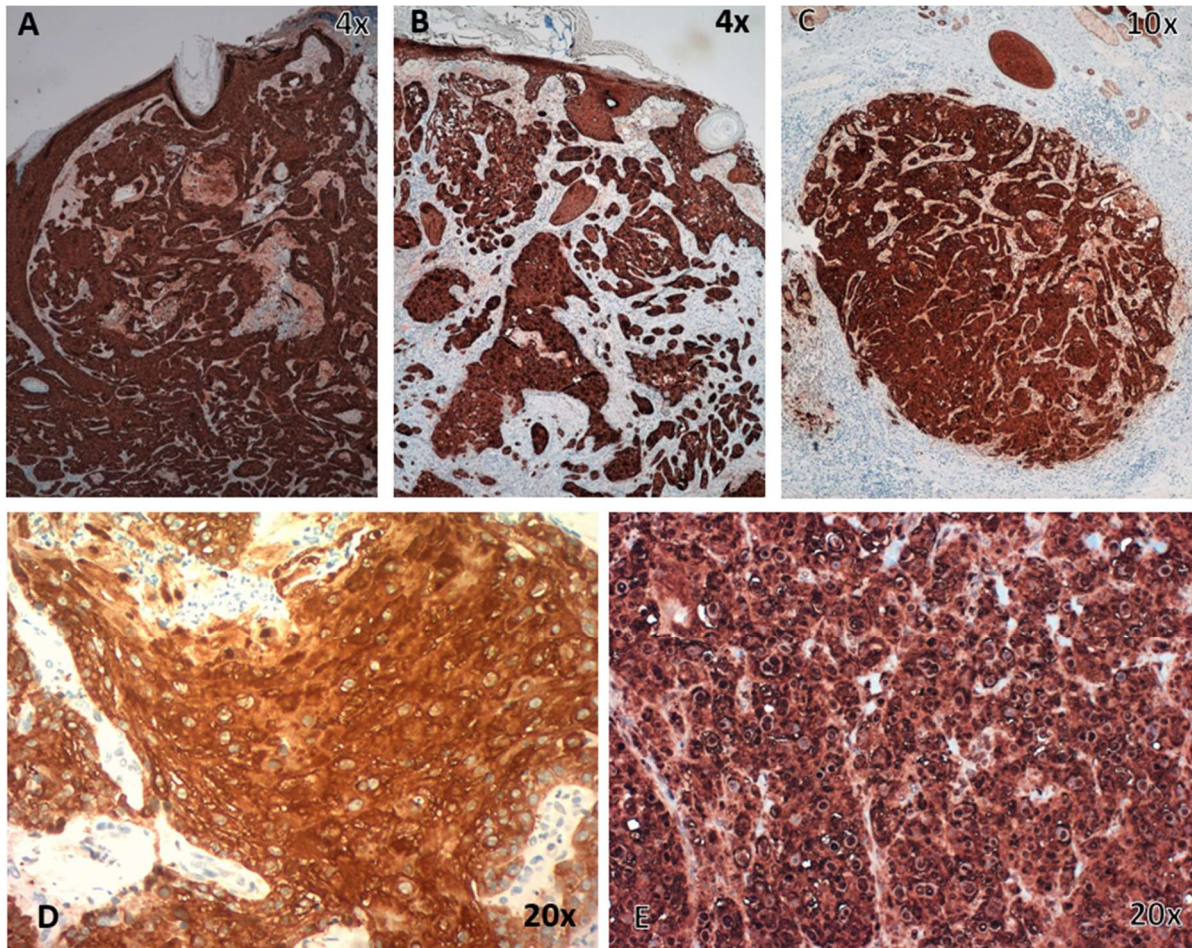


Figura 56. Expressió d'SFN en les cèl·lules neoplàsiques de mostres representatives de CEC. **A-B)** CECs primaris amb intensa expressió de SFN. **C)** Letàlide de CEC amb intensa expressió de SFN. **D)** Ampliació d'un tumor primari on es veu absència d'expressió d'SFN en els nuclis de les cèl·lules. **E)** Ampliació d'una letàlide de CEC on es veu tinció intensa en múltiples nuclis.

Estudi estadístic SFN

En la Figura 57 podem comparar gràficament l'expressió (segons els *histoscores*) d'SFN en les mostres de pell sana, CBC i CEC. L'expressió en les mostres de pell sana és intensa, es redueix en el CBC i augmenta en el CEC, essent globalment aquestes diferències estadísticament significatives ($p < 0.000001$). A continuació, per a estudiar més a fons aquestes relacions, es van realitzar comparacions múltiples respecte a la categoria de referència, que en aquest cas és la pell sana. Les diferències van ser estadísticament significatives tant per al CBC ($p < 0.000001$), com per al CEC ($p = 0.00033$).

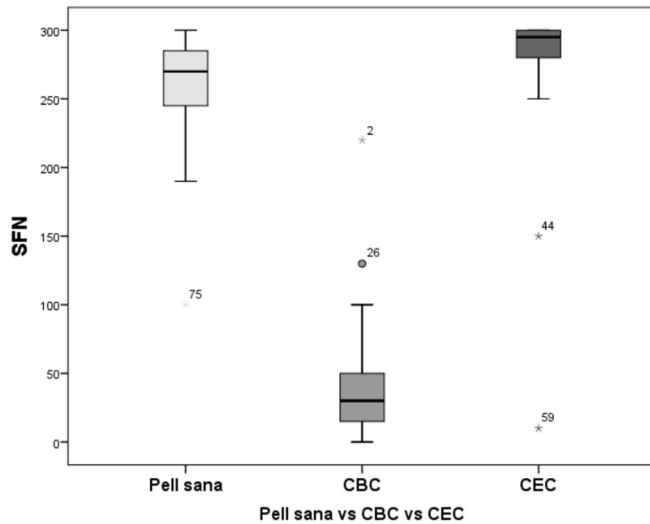


Figura 57. Diagrama de caixes on es representa l'expressió de SFN en les cèl·lules neoplàsiques dels diferents tumors i en la pell sana segons els valors dels *histoscores*.

Pel que fa al CBC, es va estudiar si els diferents patrons d'expressió d'SFN (homogeni vs. més intens al centre dels nius) es podrien relacionar amb el subtipus histològic de CBC. Es va veure que els subtipus de baix risc (superficial i nodular) tenien un patró d'expressió de SFN més homogeni, i els subtipus d'alt risc (infiltrant i esclerodermiforme) un patró d'expressió d'SFN més intens al centre dels nius (Figura 58) ($p = 0.037$).

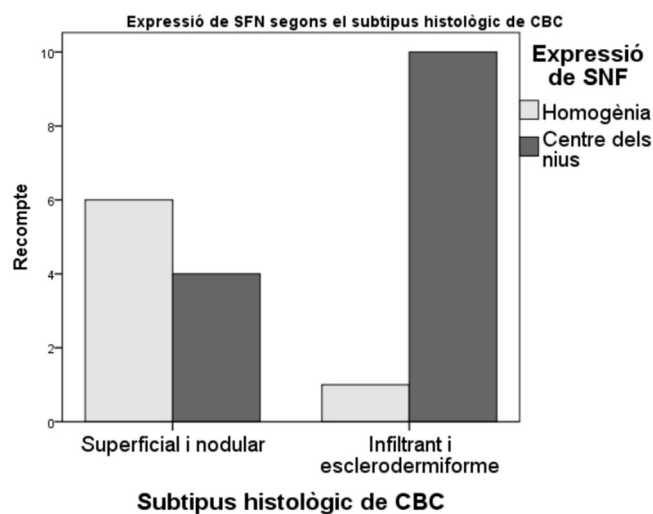


Figura 58. Diagrama de barres on es representa l'expressió d'SFN (homogènia vs. central) en els diferents subtipus histològics de CBC ($p = 0.037$).

En el cas del CEC, l'expressió d'SFN a les cèl·lules neoplàsiques és intensa en totes les mostres, independentment de l'agressivitat histològica. Per aquest motiu, en l'estudi estadístic no s'ha trobat cap relació entre l'expressió d'SFN i el grau de diferenciació histològica, la infiltració perineural, tumor primari vs. recidiva o èxits a causa del CEC. Tampoc s'ha trobat relació entre l'expressió d'SFN a nivell estromal i les característiques mencionades.

- **LADININA 1**

La ladinina 1 (LAD1) és una proteïna de 59 kDa que només hem trobat secretada en el TIF de les mostres de CEC. És un filament d'ancoratge que forma part de la làmina densa de la membrana basal. S'expressa àmpliament en múltiples teixits i la seva transcripció és induïda per l'*epidermal growth factor* (EGF). En els darrers anys s'ha localitzat no només als filaments de la perifèria de les cèl·lules sinó també al llarg del citoesquelet i del citoplasma¹²². Es distribueix de manera similar a l'actina, a la que regula, regulant així els canvis de disposició del citoesquelet. Roth *et al.*¹²² descriuen dos estats per la LAD1 en les cèl·lules, la forma soluble i la forma modificada o fosforil·lada, que coprecipita amb els filaments d'F-actina. Aquesta unió amb l'F-actina té lloc a través de mediadors, que són les filamines.

Expressió i localització de la LAD1 en les mostres d'immunohistoquímica

Trobem expressió de LAD1 en la pell sana, present en totes les capes (Figura 59). Es localitza difusament al citoplasma, però no al nucli. La mitjana dels *histoscores* és de 205.4 (DE 66.1).

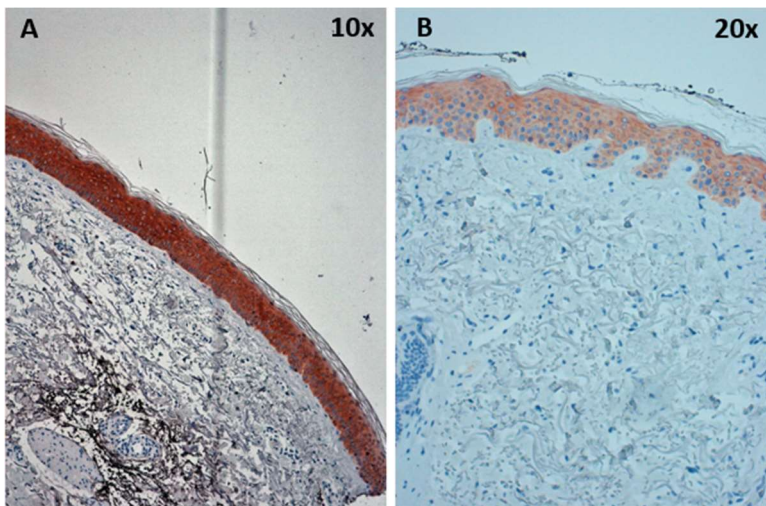


Figura 59. Expressió de LAD1 en 2 mostres representatives de pell sana a 10x (A) i 20x (B). Veiem que l'expressió es localitza difusament al citoplasma, però no al nucli.

En general, els CBCs expressen escassa o lleu LAD1 a nivell de les cèl·lules neoplàsiques, amb una mitjana d'*histoscores* de 39.2 (DE 55.6) (Figura 60) (Taula 13). De la mateixa manera que passa en la pell sana, la trobem expressada difusament al citoplasma, però no al nucli. En les mostres que expressen LAD1 (16/30), el 50.0 % (8/16) ho fan més al centre dels nius, i menys a la perifèria (Figura 60 D i E). En l'altre 50.0 % (8/16) de mostres l'expressió és homogènia (Figura 60.F). En cap de les mostres de CBC trobem expressió de LAD1 a nivell de l'estroma.

En el CEC, trobem la LAD1 intensament expressada a nivell de les cèl·lules neoplàsiques, mitjana d'*histoscores* de 242.3 (DE 62.2), independentment de l'agressivitat histològica (Figura 61) (Taula 14). Es localitza sobretot a nivell de membrana (+++) i citoplasma (++) , però no al nucli (-) (Figures 61 C i E). Aquesta expressió intensa de la LAD1 a nivell de la membrana és la diferència principal que trobem entre el CEC i la pell sana pel que fa a l'expressió i la localització de la LAD1 en les cèl·lules. En cap de les mostres de CEC trobem la LAD1 expressada a nivell de l'estroma.

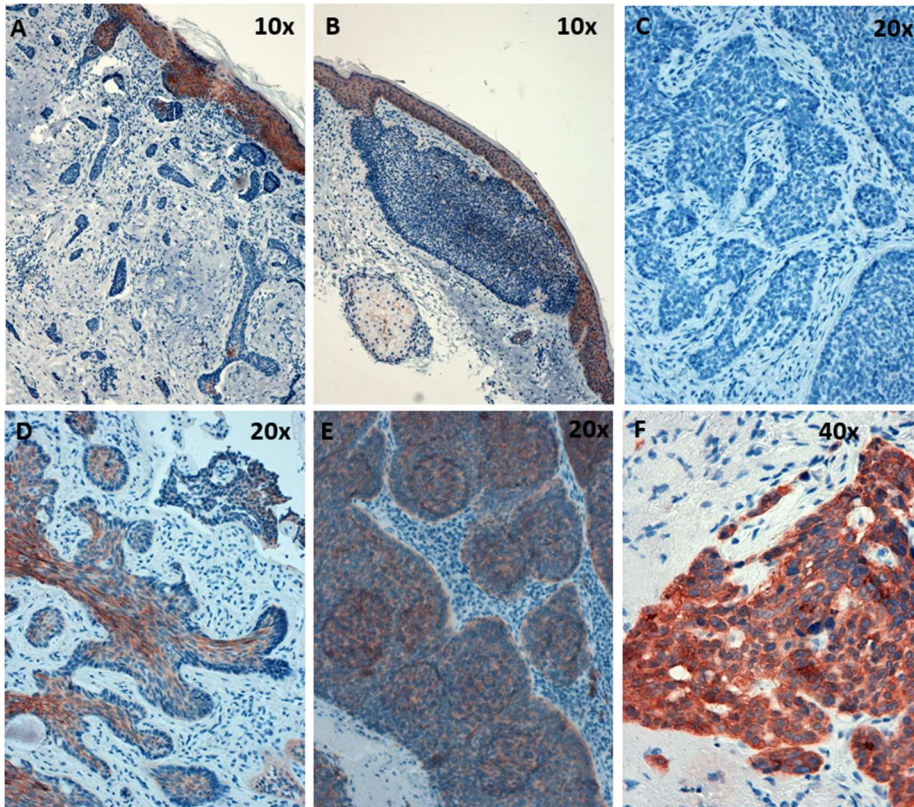


Figura 60. Expressió de LAD1 en diverses mostres de CIC. S'expressa a nivell citoplasmàtic, però no a nivell nuclear. **A-C)** CICs sense expressió de LAD1. **D)** CIC amb expressió de LAD1 on veiem que la intensitat als centres dels nus és major que a la perifèria. **E-F)** CICs amb expressió de LAD1 de distribució homogènia. La localització és majoritàriament citoplasmàtica.

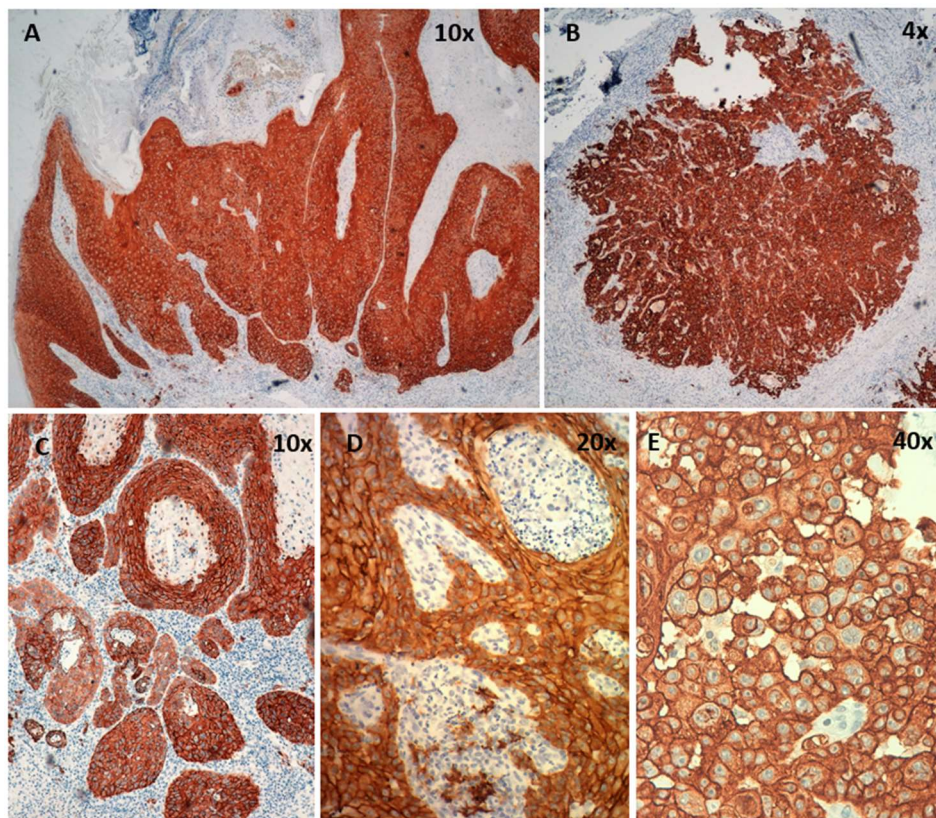


Figura 61. Expressió de LAD1 en les mostres de CIC. S'expressa intensament a nivell de membrana, moderadament al citoplasma, i absent al nucli. **A)** CIC primari amb intensa expressió de LAD1. **B)** Letàlide de CIC amb intensa expressió de LAD1. **C-E)** Detalls de CICs on veiem la localització sobretot a nivell de membrana (+++) i en menor mesura al citoplasma (++)

Estudi estadístic LAD1

En la Figura 62 podem comparar gràficament l'expressió (segons els *histoscores*) de LAD1 en les mostres de pell sana, CBC i CEC. L'expressió en les mostres de pell sana és moderada-intensa, es redueix en el CBC i augmenta en el CEC, essent globalment aquestes diferències estadísticament significatives ($p < 0.000001$). A continuació, per a estudiar més a fons aquestes relacions, es realitzen comparacions múltiples respecte la categoria de referència, que en aquest cas és la pell sana. Les diferències són estadísticament significatives tant per al CBC ($p < 0.000001$), com per al CEC ($p = 0.005$).

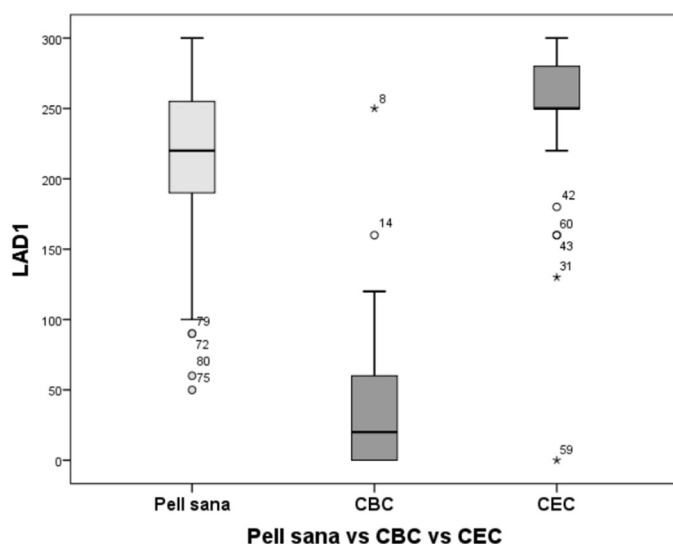
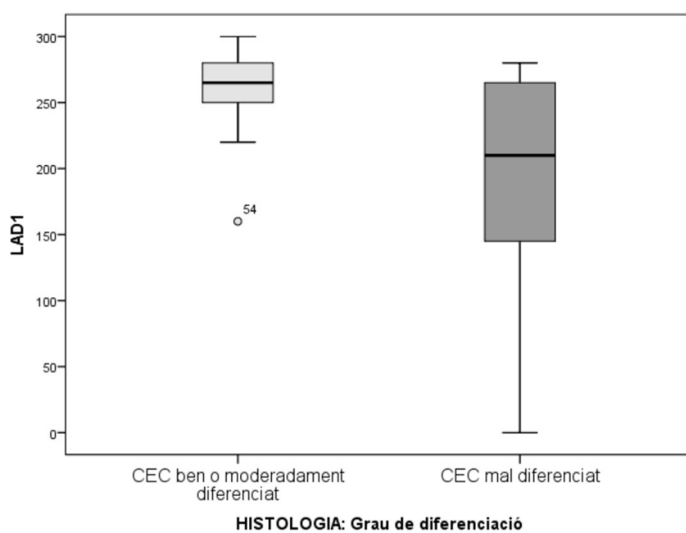


Figura 62. Diagrama de caixes on es representa l'expressió de LAD1 en les cèl·lules neoplàsiques dels diferents tumors i en la pell sana segons els valors dels *histoscores*.

També es va veure que l'expressió de LAD1 en els CECs histològicament mal diferenciats era significativament menor ($p = 0.029$) que en els CECs ben o moderadament diferenciats (Figura 63).



p=0.029

Figura 63. Diagrama de caixes on es compara l'expressió de LAD1 segons el grau de diferenciació histològica dels CECs.

Pel que fa al CBC, no s'ha pogut trobar cap relació entre l'expressió de LAD1 i el subtipus histològic, tampoc amb els tumors recidivats. De la mateixa manera, no s'ha trobat relació entre el patró d'expressió de LAD1 (centre vs. homogeni) i el subtipus histològic del tumor o el risc de recidiva.

- **CORNULINA**

La cornulina (CRNN), anteriorment anomenada SEP53, és una proteïna de 53 KDa i 495 aminoàcids que només hem trobat secretada al TIF de les mostres de CBC. Conté al seu extrem N-terminal un domini d'unió al calci, similar al de la família de les proteïnes S100. El seu gen està localitzat al cromosoma 1q21, formant part de l'anomenat complex de diferenciació epidèrmica¹²³. Es localitza sobretot a les capes superiors de les mucoses, i participa en la diferenciació terminal i la resposta immunològica a través de la regulació de la senyalització per calci¹²⁴. També se li ha atribuït una funció de supressor de tumors tant *in vitro* com *in vivo*, inhibint la transició de G1 a S del cicle cel·lular¹²⁵. Aquesta inhibició la realitza augmentant l'expressió de la P21 i del Rb, i inhibint la ciclina D1.

Expressió i localització de la cornulina en les mostres d'immunohistoquímica

En general, en la pell sana trobem escassa tinció de cornulina (Figura 64.A) amb una mitjana d'*histoscores* de 17.7 (DE 14.5). Cal destacar però, que en el 64.9 % de les mostres (37/57) sí que trobem expressió citoplasmàtica de CRNN en la capa granulosa de l'epidermis (Figures 64 B i C).

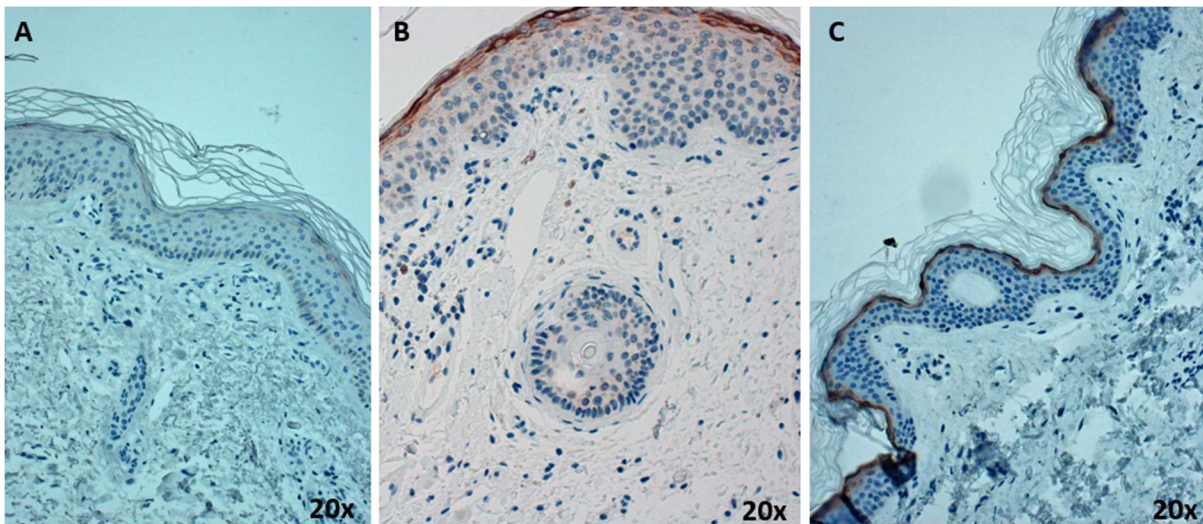


Figura 64. Expressió de CRNN en 3 mostres representatives de pell sana. **A)** Absència d'expressió. **B-C)** Expressió a nivell de la capa granulosa.

En el CBC, trobem la CRNN intensament expressada a nivell de les cèl·lules neoplàsiques, amb una mitjana d'*histoscores* de 206.3 (DE 92.3) (Figura 65) (Taula 13). Es localitza sobretot a nivell de la membrana nuclear (+++) i al citoplasma (++) , però escassament al nucli (-) (Figura 65.C). Per altra banda, només la trobem a nivell estromal en el 10% de les mostres de CBCs.

En el CEC, la CRNN s'expressa per norma general de manera lleu o moderada a nivell de les cèl·lules neoplàsiques, amb *histoscores* de [0-150] en totes les mostres, amb una mitjana de 70.0 (DE 48.2) (Figura 66) (Taula 14). De la mateixa manera que passa al CBC, la trobem sobretot al citoplasma i a la membrana nuclear, i escassament al nucli (Figura 66.C). De les mostres on s'expressa, en el 42.9 % (9/21), ho fa de manera més intensa al front invasiu o agressiu del tumor, i en la resta ho fa de manera homogènia (Figura 66 D i E). A més a més, la trobem expressada de manera lleu a nivell estromal en el 52 % de les mostres de CECs.

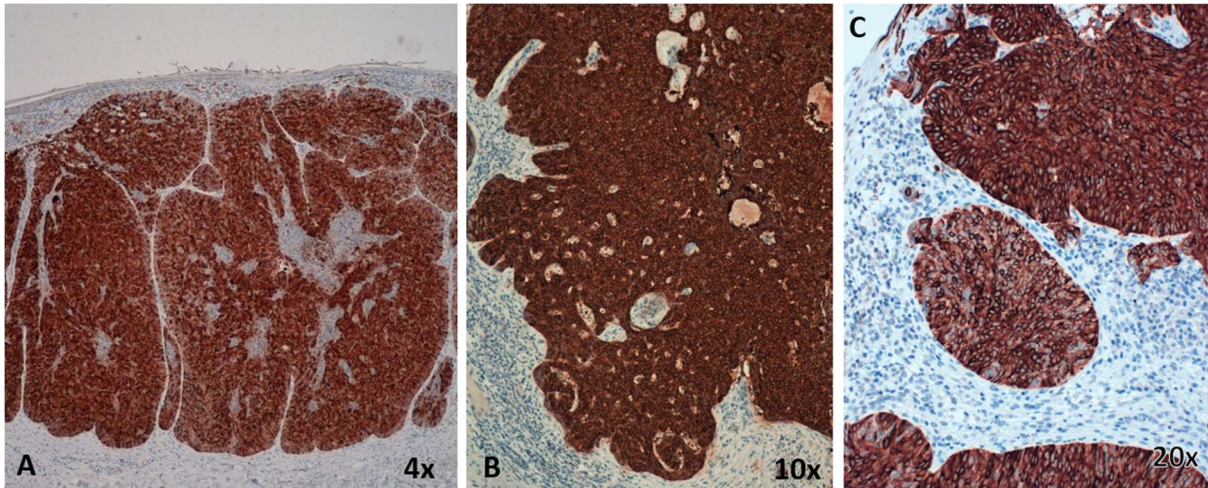


Figura 65. Expressió de CRNN en les cèl·lules neoplàsiques de 3 mostres representatives de CBC. **A-C)** Intensa expressió. **C)** Ampliació on s'aprecia que s'expressa la CRNN al citoplasma i a la membrana nuclear, però no al nucli.

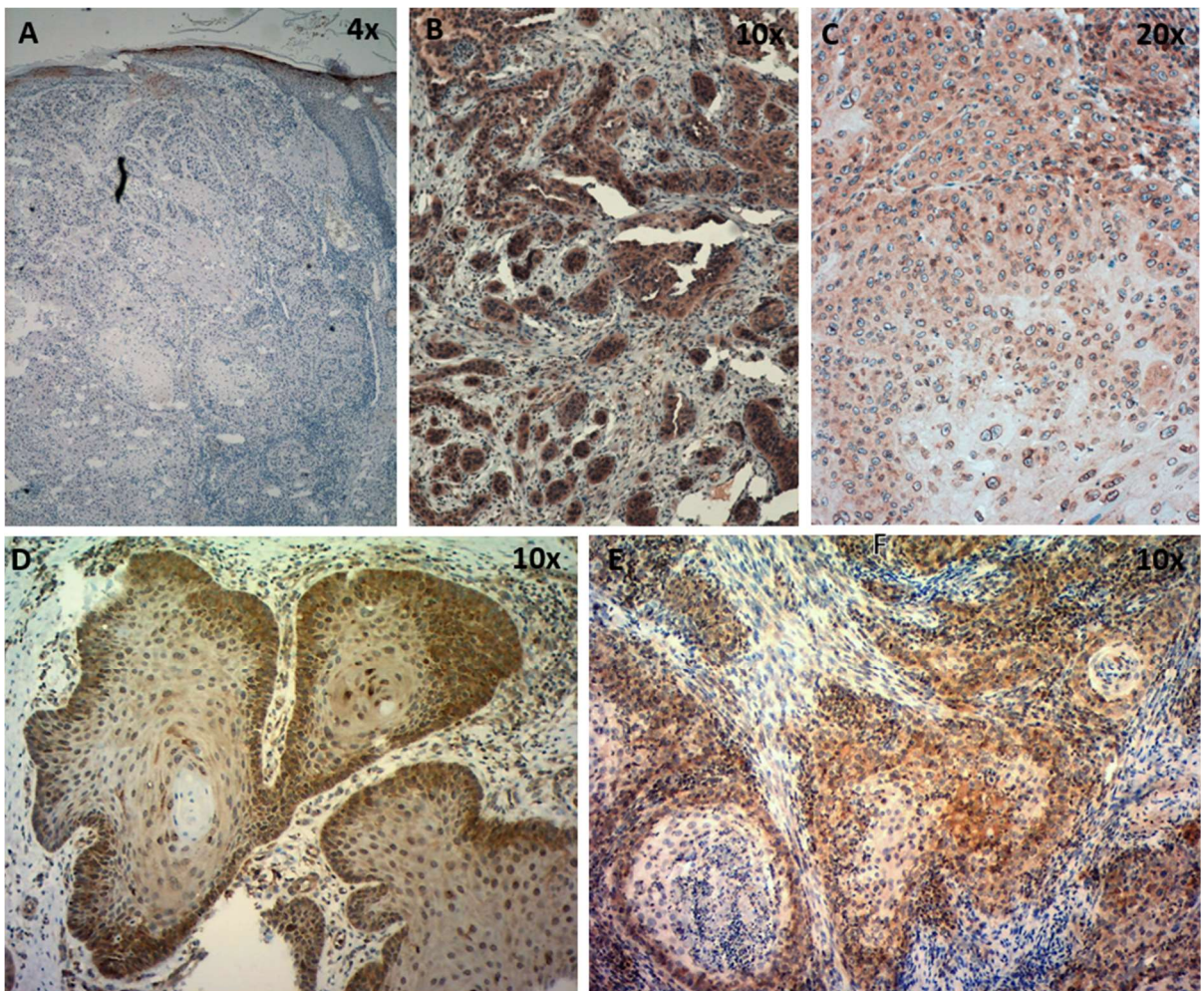


Figura 66. Expressió de CRNN en diverses mostres representatives de CEC. **A)** CEC sense expressió de CRNN. **B)** CEC amb expressió de CRNN. **C)** Es pot apreciar com s'expressa a nivell citoplasmàtic i de membrana nuclear, però no al nucli. **D-E)** CECs amb expressió de CRNN on veiem que la intensitat en les àrees més externes dels nius o histològicament agressives és major.

Estudi estadístic CRNN

En la Figura 67 es pot comparar gràficament l'expressió de CRNN (segons els *histoscores*) en les mostres de pell sana, CBC i CEC. L'expressió en les mostres de pell sana és escassa, augmenta intensament en el CBC i en menor mesura en el CEC, essent globalment aquestes diferències estadísticament significatives ($p < 0.000001$). A continuació, per a estudiar més a fons aquestes relacions, es realitzen comparacions múltiples respecte a la categoria de referència, que en aquest cas és la pell sana. Les diferències són estadísticament significatives tant per al CBC ($p < 0.000001$), com per al CEC ($p = 0.0002$).

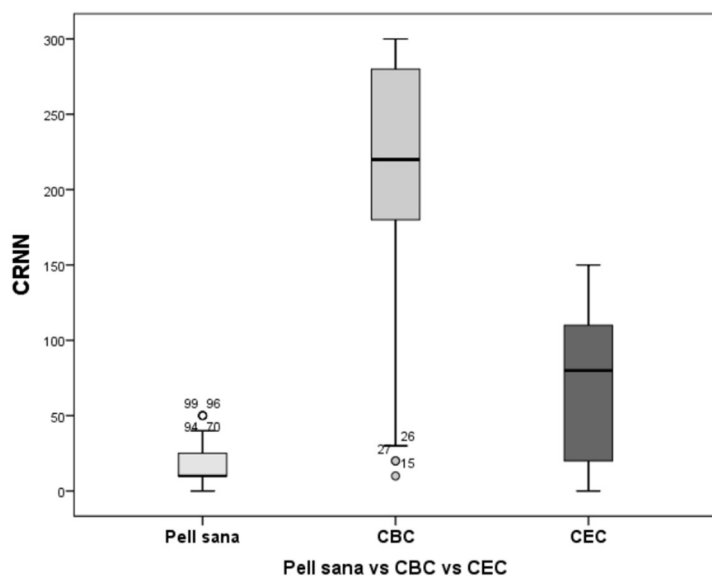


Figura 67. Diagrama de caixes on es representa l'expressió de CRNN en les cèl·lules neoplàsiques dels diferents tumors i en la pell sana segons els valors dels *histoscores*.

També podem veure que l'expressió de CRNN en els CECs primaris sense infiltració perineural era significativament menor ($p = 0.01$) que en els CECs recidivats o amb infiltració perineural (Figura 68). Aquesta troballa concorda amb el fet que l'expressió en el front invasiu dels CECs sigui major que en les àrees més diferenciades.

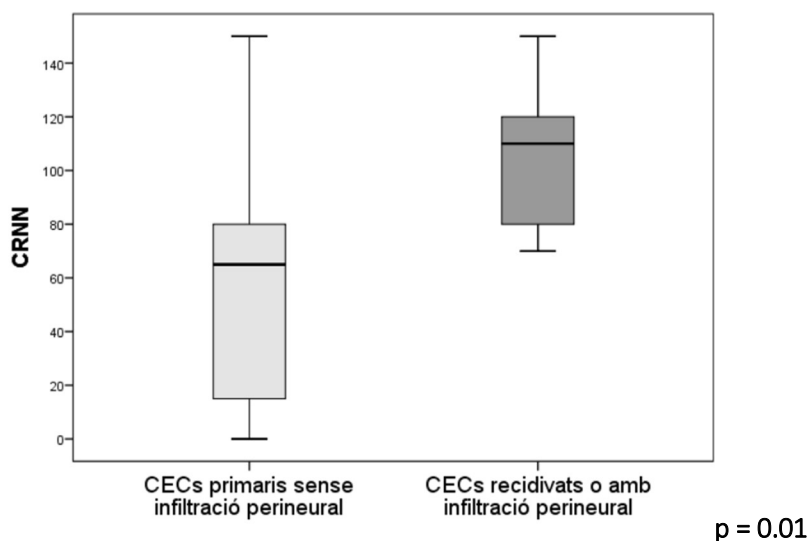


Figura 68. Diagrama de caixes on es compara l'expressió de CRNN segons l'agressivitat histològica dels CECs.

De la mateixa manera, si comparem l'expressió de CRNN entre els diferents subtipus histològics de CBC, observem que en els subtipus més agressius (infiltrant i esclerodermiforme) la tendència és a expressar més CRNN que en els subtipus menys agressius (superficial i nodular), tot i que sense ser aquestes diferències estadísticament significatives ($p = 0.1$) (Figura 69).

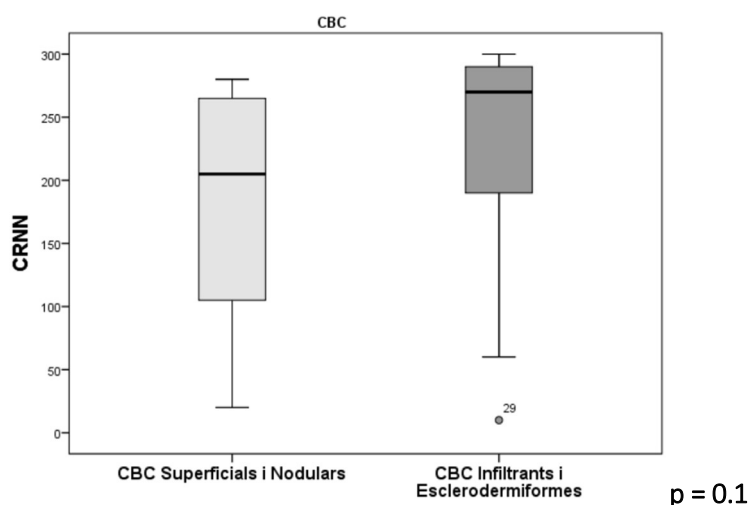


Figura 69. Diagrama de caixes on es compara l'expressió de CRNN segons el subtipus histològic dels CBCs.

Si estudiem més a fons la presència de CRNN en la pell sana adjacent als tumors, veiem que entre les pells sanes adjacents als CECs està significativament més present ($p = 0.01$) que entre les adjacents als CBCs (85.7 % vs. 44.8 %, respectivament) (Figura 70). En canvi, no s'ha trobat relació entre l'expressió de CRNN en la pell sana i la presència de múltiples carcinomes en els pacients, el sexe ni la localització (ni pel que fa a l'àrea corporal ni per tractar-se o no de zones fotoexposades).

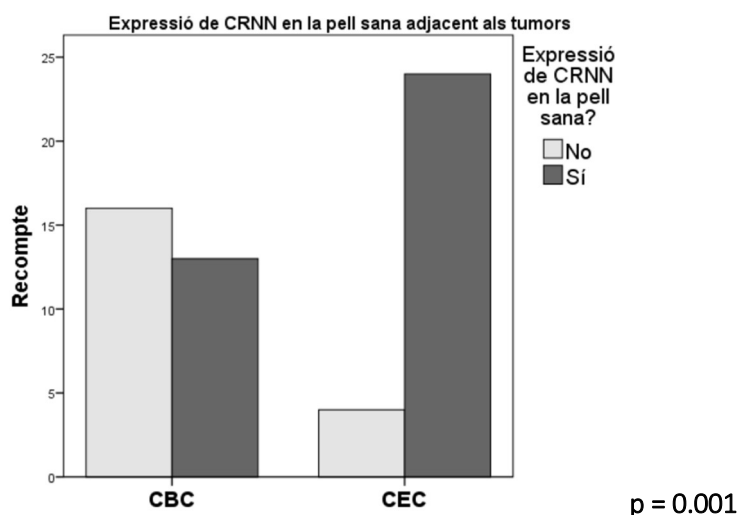


Figura 70. Diagrama de barres on es representa la presència o no de CRNN entre les pells sanes adjacents als CBCs i als CECs ($p = 0.001$).

Per tant, només trobem secreció de CRNN en les mostres de TIF provinents de CBCs. A més a més, en el CBC l'expressió de CRNN per part de les cèl·lules neoplàsiques és major que en el CEC (mitjana d'*histoscores* en el CBC = 206.3 i en el CEC = 70.0). En canvi, l'expressió de CRNN tant a nivell de l'estroma peritumoral com de la pell sana adjacent als tumors és major en els CECs que en els CBCs.

Els resultats de les proteïnes FABP5, SFN, LAD1 i CRNN estan sintetitzats a les Taules 15-18.

Taula 15. Resum dels resultats obtinguts per a la proteïna FABP5.

FABP5	Pell Sana (NS)	CBC	CEC
Secreció en el TIF	NS vs. CBC → 1.23 vegades superior (p=0.79)		CEC vs. NS → 6.87 vegades superior (p=0.03) CEC vs. CBC → 8.43 vegades superior (p=0.03)
Expressió en les cèl·lules neoplàsiques	- Moderada expressió. - Mitjana <i>histoscores</i> = 177.2 (DE 37.9).	- Poca expressió (23/30 mostres negatives). - Mitjana <i>histoscores</i> = 14.3 (DE 8.4).	- Molta expressió en 26/30 mostres.
Localització cel·lular	Citoplasma i nucli	Citoplasma i nucli	Citoplasma i nucli
Capas de la pell sana on s'expressa?	S'expressa a l'epiteli estratificat i granulós, però NO a la capa basal		
Expressió en l'estroma peritumoral		13.3% de les mostres amb lleu expressió estromal	60% de les mostres amb lleu expressió estromal
Destaca			S'expressa intensament en les àrees ben diferenciades (mitjana d' <i>histoscores</i> de 265.0) però es perd a les àrees agressives o a les letàlides (mitjana d' <i>histoscores</i> 30.4).

Taula 16. Resum dels resultats obtinguts per a la proteïna estratafina.

ESTRATAFINA	Pell Sana (NS)	CBC	CEC
Secreció en el TIF	NS vs. CBC → 1.24 vegades superior (p=0.46)		CEC vs. NS → 3.60 vegades superior (p=0.003) CEC vs. CBC → 4.46 vegades superior (p=0.00001)
Expressió en les cèl·lules neoplàsiques	- Intensa expressió. - Mitjana <i>histoscores</i> = 259.5 (DE 40.9).	- Escassa expressió. - Mitjana <i>histoscores</i> = 45.3 (DE 47.4).	- Intensa expressió. - Mitjana <i>histoscores</i> = 276.0 (DE 57.7).
Localització cel·lular	Citoplasma i membrana	Citoplasma i membrana	NUCLI , citoplasma i membrana
Capas de la pell sana on s'expressa?	Totes les capas		
Expressió en l'estroma peritumoral		No s'expressa	19% de les mostres amb lleu expressió estromal
Destaca		Els subtipus de CBC de baix risc (superficial i nodular) tenen un patró d'expressió homogeni de l'SFN, i els subtipus d'alt risc (infiltrant i esclerodermiforme) expressen l'SFN més intensament al centre dels nius (p=0.037).	La diferent localització de l'estratafina en el CEC (on també s'expressa al NUCLI) respecte a la pell sana i al CBC.

Taula 17. Resum dels resultats obtinguts per a la proteïna ladinina 1.

LADININA 1	Pell Sana (NS)	CBC	CEC
Secreció en el TIF	No es secreta	No es secreta	Es secreta només al CEC
Expressió en les cèl·lules neoplàsiques	- Intensa expressió. - Mitjana <i>histoscores</i> = 205.4 (DE 66.1).	- Escassa expressió. - Mitjana <i>histoscores</i> = 39.2 (DE 55.6).	- Intensa expressió. - Mitjana <i>histoscores</i> = 242.3 (DE 62.2).
Localització cel·lular	Citoplasma	Citoplasma	MEMBRANA i citoplasma
Capas de la pell sana on s'expressa?	Totes les capas		
Expressió en l'estroma peritumoral		No s'expressa	No s'expressa
Destaca			La diferent localització de la ladinina 1 en el CEC (on s'expressa sobretot a la membrana) respecte a la pell sana i al CBC. ----- L'expressió de ladinina 1 en els CECs histològicament mal diferenciats és significativament menor que en els CECs ben o moderadament diferenciats (p=0.029).

Taula 18. Resum dels resultats obtinguts per a la proteïna cornulina.

CORNULINA	Pell Sana (NS)	CBC	CEC
Secreció en el TIF	No es secreta	Es secreta només al CBC	No es secreta
Expressió en les cèl·lules neoplàsiques	- Escassa expressió. - Mitjana <i>histoscores</i> = 17.7 (DE 14.5).	- Intensa expressió. - Mitjana <i>histoscores</i> = 206.3 (DE 92.3).	- Lleu o moderada expressió. - Mitjana <i>histoscores</i> = 70.0 (DE 48.2).
Localització cel·lular	Citoplasma	Membrana nuclear i citoplasma	Membrana nuclear i citoplasma
Capas de la pell sana on s'expressa?	En el 64.9% de les mostres trobem expressió citoplasmàtica a la capa granulosa		
Expressió en l'estroma peritumoral		10% de les mostres amb lleu expressió estromal	52% de les mostres amb lleu expressió estromal
Destaca	Entre les pells sanes adjacents als CECs està significativament més present a la capa granulosa que entre les adjacents als CBCs (87.7 i 44.8%, respectivament) (p=0.01).		L'expressió de cornulina en els CECs primaris sense infiltració perineural és significativament menor que en els CECs recidivats o amb infiltració perineural (p=0.01).

Estudi proteòmic del TIF i selecció de les proteïnes candidates

De les dades de proteòmica obtingudes del TIF sabem que les mostres amb una quantitat mitjana més elevada de proteïnes eren les del CBC, seguides del CEC i finalment les de la pell sana (Figura 33). Això concorda amb els estudis de proteòmica realitzats prèviament en d'altres tumors, on també troben més quantitat de proteïnes en les mostres tumorals que en les mostres sanes adjacents¹²⁶. Aquesta diferència en la quantitat de proteïnes detectades indica la major varietat de fenotips cel·lulars entre les cèl·lules tumorals i la major complexitat de les seves activitats cel·lulars.

De manera inesperada, els nostres resultats mostren que segons el perfil d'expressió de proteïnes del TIF s'observen dues classes de CEC. Aquest fet no és insòlit, i està descrit en la literatura que diferents subtipus d'un mateix tumor presenten variacions en el perfil proteòmic del TIF¹²⁷. En molts casos, aquests treballs extreuen i comparen directament els TIFs de diferents subtipus tumorals (per exemple, càncer de mama luminal respecte triple negatiu). En el nostre cas però, utilitzant mostres de CEC sense classificar en subtipus, aquestes s'agrupen en funció de la composició del seu TIF. Aquest és el punt de partida per a realitzar un treball per a caracteritzar aquests dos subtipus de CEC. Amb les dades actuals no som capaços de descriure'ls, ja que els grups no concorden amb diferències en la histologia, en el risc de recidiva, o en característiques clíniques com l'edat, el gènere o la localització del tumor. Esperem, en un futur, ser capaços de definir les causes d'aquesta separació en 2 grups. Les diferències en la composició proteòmica del TIF són molt valuoses per a posteriorment determinar marcadors serològics que identifiquin subtipus tumorals amb pronòstics o tractaments diferents.

Un cop analitzades les proteïnes del TIF de cada tumor, es confirma que la localització extracel·lular està molt enriquida en ambdós, i fins i tot en el cas del CBC la localització en vesícules. Aquestes dades recolzen la qualitat i la fiabilitat de les mostres de TIF. A continuació, hem comparat els TIFs dels 2 CQ entre ells i amb la pell sana. Les diferències rellevants entre els grups ens han permès seleccionar les proteïnes candidates a estar implicades en els mecanismes invasius d'aquests tumors. Aquestes diferències són: 1) Trobem en el CEC un enriquiment en proteïnes del citoesquelet, i 2) Ambdós tumors presenten un enriquiment en proteïnes que regulen la resposta immunològica, però el perfil d'aquesta resposta és diferent entre ells.

Estudi mitjançant IHQ de l'expressió i la localització en el teixit de les proteïnes candidates

Proteïnes candidates relacionades amb la resposta immunològica

- CROMOGRANINA A

A la literatura, hi ha publicat un treball on es descriu la Cgha expressada a la capa basal de l'epidermis de la pell sana¹²⁸, tot i que sense especificar el percentatge de mostres positives. Segons les nostres dades, la Cgha no s'expressa en l'epidermis. Entre les nostres mostres de pell sana, només 1/8 presentava lleu expressió a la capa basal (Figura 44).

Pel que fa al CBC, hi ha diferents treballs que descriuen l'expressió de Chga amb resultats molt variables. S'ha descrit expressada en el 27 % dels CBCs en una sèrie de 66 casos publicada per Terada *et al.*¹²⁸ i

en el 72.7 % en una sèrie de 33 casos publicada per Houcine *et al.*¹²⁹, tot i que en aquest darrer treball l'expressió era intensa només en el 21 % de les mostres. De totes maneres, dades anteriors indicaven percentatges molt menors d'expressió en mostres de CBC, 0 % en una sèrie de 50 casos¹³⁰ i 4 % en una de 53 casos¹³¹. Segons els resultats del nostre estudi IHQ, la Chga s'expressa i es localitza en el citoplasma de les cèl·lules neoplàsiques en 2/4 mostres de CBC i en l'estroma intratumoral en 2/4 mostres de CBC (una d'elles sense expressió a nivell de les cèl·lules neoplàsiques). Aquestes dades d'expressió coincideixen amb les de la literatura, mostrant que la Chga només s'expressa en alguns CBC. Desconeixem la funció de la Chga expressada i secretada en el CBC. Més enllà de la seva funció de regulació de la resposta inflamatòria, l'expressió de la Chga en alguns CBC podria estar relacionada amb la diferenciació neuroendocrina que s'ha descrit en aquests tumors¹²⁹. També podria formar part de la complexa interacció que té lloc entre el sistema nerviós perifèric i les cèl·lules neoplàsiques, descrita mitjançada a través de factors neuroendocrins alliberats a nivell local en els CCNM¹³².

Fins on arriba el nostre coneixement actual, no hi ha estudis pel que fa a la secreció o expressió de Chga en mostres de CEC. L'expressió en les nostres mostres de CEC és nul·la, tant a nivell de les cèl·lules neoplàsiques com de l'estroma. La presència d'expressió només en alguns CBCs i absent en els CECs concorda amb que només es detecti secretada en el TIF dels CBCs i ens indicaria que els seus possibles efectes en la resposta inflamatòria dels CQ no haurien de ser rellevants per a explicar el comportament de la majoria d'aquest tumors.

- **PNP**

Fins on arriba el nostre coneixement actual, no hi ha estudis sobre l'expressió de PNP en la pell o en tumors cutanis. Segons els nostres resultats, la presència d'expressió intensa en les cèl·lules tumorals dels CECs i en molt menor mesura en les cèl·lules dels CBCs concorda amb els nivells de detecció en el TIF d'aquests tumors. També coincideix que els CECs són tumors més agressius que els CBCs, amb una major capacitat per a metastatitzar. En aquest sentit, l'expressió de PNP s'ha trobat en tumors de pròstata, amb uns nivells més elevats en graus "Gleason" alts i en tumors envaint fora del teixit prostàtic (pT3)¹³³. En canvi, es troba escassament expressat en l'epiteli prostàtic sa o hiperplàsic. Per tant, l'expressió de PNP podria estar relacionada amb l'agressivitat tumoral, però ni pel nostre model ni per altres tumors es coneix la funció del PNP ni tampoc què implica la seva secreció. De totes maneres, un aspecte important pel qual s'ha estudiat el PNP és com a possible diana terapèutica. El PNP es requereix per a la maduració dels limfòcits T i la seva inhibició farmacològica es planteja per a moderar el creixement en leucèmies¹³⁴. Un aspecte important a considerar és que el PNP s'expressa sobretot en les mostres de pell sana i de CEC. Per contra, aquesta proteïna es troba secretada abundantment en el TIF del CEC però no en el de la pell sana. Tot i que no sabem quina funció té el PNP en el TIF, el fet que es trobi escassament secretat en l'epidermis sana planteja que la utilització d'inhibidors del PNP podria ser interessant com a teràpia per a combatre el CEC metastàtic.

- **FABP5**

Pel que fa a la pell, la funció de la FABP5 s'ha relacionat amb la diferenciació terminal dels queratinòcits. Durant l'estratificació de l'epidermis, un augment del metabolisme lipídic succeeix en paral·lel a la diferenciació dels queratinòcits, per tal de formar la barrera cutània-lipídica. En la pell sana, s'ha descrit la FABP5 expressada al citoplasma de les capes espinosa i granulosa, però no a la capa basal¹³⁵. Es troba

marcadament sobreexpressada en les plaques de psoriasi¹³⁵. Fins i tot s'ha descrit que la pell irradiada sobreexpressa FABP5, que promou la fibrosi cutània activant la via de senyalització TGF- β ¹¹⁵.

Fins on arriba el nostre coneixement actual, no s'havia estudiat prèviament l'expressió de FABP5 en els CQ. En aquest treball, trobem la FABP5 secretada de manera intensa en el CEC, i escassament en la pell sana i en el CBC. L'anàlisi de les dades suggereix tres aspectes principals a discutir. En primer lloc, la FABP5 s'expressa tant en la pell sana com en el CEC, però només la trobem secretada en el teixit tumoral. Aquest fet planteja un primer interrogant. Pel que fa concretament a la FABP5 secretada, en desconeixem la seva funció en el CEC o la seva relació amb la carcinogènesi. En pacients amb melanoma es va estudiar la presència de FABP5 en mostres d'orina, i es va comparar amb controls sans¹³⁶. En els pacients sans, es va trobar en el 50 % de les dones (5/10) i en el 0 % dels homes (0/7). En els pacients amb melanoma, la presència de FABP5 en orina no variava significativament del grup control (39 % vs. 29 %). El que sí que van trobar va ser que es detectava en totes les dones amb melanomes d'estadi I-III, però no en estadis IV. El fet que en pacients amb metàstasi de melanoma no es detecti FABP5 en orina suggereix als autors que hi ha una relació inversament proporcional entre l'expressió de la proteïna i les metàstasis. En el cas del CEC, concordaria amb la menor expressió de FABP5 en les zones mal diferenciades dels tumors o les letàlides. Una altra possibilitat, com ja s'ha introduït prèviament, és que la FABP5 també s'expressa abundantment en les cèl·lules immunològiques i té un paper crucial en la immuno-vigilància contra els tumors en els primers estadis¹¹⁸⁻¹²⁰. Aquest paper el desenvolupa augmentant, en els macròfags, la secreció d'INF- β a través de regular la formació de gotetes lipídiques intracel·lulars. Aquest INF- β augmenta l'arribada de limfòcits NK a l'estroma tumoral¹¹⁸. Podria ser que la funció de la FABP5 secretada per les cèl·lules tumorals estigui relacionada amb la capacitat de modular la resposta immunològica en els CECs. Això concordaria també amb el segon aspecte a discutir, que és l'elevada expressió de FABP5 en el CEC i no en el CBC, ja que com hem vist, el perfil de proteïnes que regulen la resposta immunològica és diferent en ambdós tumors.

Una altra explicació per l'elevada expressió de FABP5 en el CEC i no en el CBC, podria ser l'origen cel·lular dels CQ. Recordem que la FABP5 s'expressa en la pell sana, excepte a la capa basal, en concordança amb la seva implicació en la diferenciació terminal dels queratinòcits i tal com s'havia descrit prèviament¹³⁵. Seguint aquesta línia, trobem escassa expressió de FABP5 en el CBC, tumor presumptament originat a la capa basal de l'epidermis. En canvi, l'expressió és intensa en el CEC, tumor originat en les capes estratificades de la pell, i es redueix en les àrees mal diferenciades del CEC i a les seves letàlides, quan les cèl·lules perden la seva diferenciació queratinocítica. Per tant, sembla que a mesura que les cèl·lules tumorals cutànies van perdent l'expressió de FABP5, perden la capacitat de diferenciar-se.

El tercer aspecte a discutir és quina funció té l'expressió i/o secreció de FABP5 en el desenvolupament tumoral. En la literatura, es descriuen diferents implicacions de la FABP5 en diversos tumors. Kawaguchi *et al.*¹³⁷ demostren que la FABP5 està altament sobreexpressada durant la carcinogènesi mitjançant mecanismes epigenètics, i promou el creixement i les metàstasis de les cèl·lules neoplàsiques prostàtiques. També la trobem sobreexpressada en el càncer de mama triple negatiu¹³⁸⁻¹³⁹, en el càncer de còlon¹⁴⁰, en el de bufeta¹⁴¹, en el pancreàtic¹⁴² i en el carcinoma escamós oral¹⁴³. En línies cel·lulars de càncer de pròstata i de mama, la FABP5 regula l'expressió de gens implicats en el metabolisme lipídic, promovent la lipòlisi de les gotes lipídiques citoplasmàtiques i activant la síntesi *de novo* dels AG¹⁴⁴, afavorint la proliferació cel·lular, la supervivència i les metàstasis. De la mateixa manera, la inhibició de

l'expressió de FABP5 redueix el creixement de les cèl·lules tumorals en línies cel·lulars de càncer de pròstata¹⁴⁵. En aquestes cèl·lules¹⁴⁵, s'ha vist que quan la FABP5 s'uneix als AG transloca del citoplasma al nucli, i que és la localització nuclear la que promou la proliferació de les cèl·lules cancerígenes mitjançant l'activació de la via ERR α (*estrogen related receptor alfa*). En el nostre treball, veiem marcatge nuclear de FABP5 tant en pell sana com en CEC, però el fet que la proteïna estigui més expressada en el CEC pot suggerir que participa en la proliferació de les cèl·lules neoplàsiques.

Ohata *et al.*¹⁴⁶ descriuen que en l'hepatocarcinoma la FABP5 afavoreix la progressió cel·lular i les metàstasis induint la transició epitel·li-mesènquima (TEM). Posteriorment, es va demostrar que l'expressió de FABP5 actuava com a factor pronòstic independent i es correlacionava amb la taxa de supervivència global dels pacients amb hepatocarcinoma¹⁴⁷. Aquest fet concorda amb que s'hagi observat TEM en alguns CECs¹⁴⁸, però no hi hagi res descrit pels CBCs. Finalment, relacionat amb que dels CQ els CECs poden fer metàstasis amb més facilitat, també s'ha descrit la FABP5 implicada en l'angiogènesi tumoral, regulada per la via del receptor PPAR-VEGF (*peroxisome proliferator-activated receptor*)¹⁴⁹⁻¹⁵⁰. Per tant, l'expressió de FABP5 s'ha descrit augmentada en múltiples tumors no cutanis, implicant un pitjor pronòstic.

Proteïnes candidates relacionades amb el citoesquelet

- **ESTRATAFINA**

En la pell, l'estratafina participa en la diferenciació terminal dels queratinòcits. Aquesta diferenciació terminal està regulada positivament per la proteïna quinasa C (PKC). L'estratafina s'uneix a la PKC a través d'un domini homòleg a la pleckstrina. És responsable d'una regulació positiva de la PKC ja activada (més que no pas responsable de la seva activació), i aquesta regulació positiva sembla dependent de la concentració d'estratafina¹⁵¹. Per altra banda, en condicions normals l'estratafina segresta al regulador de la transcripció YAP1 al citoplasma en els queratinòcits diferenciats. La translocació de YAP1 del nucli al citoplasma activa la progressió de progenitor a estat diferenciat. Mutacions en l'estratafina causen ratolins amb un fenotip caracteritzat per una epidermis hiperproliferativa amb escassa diferenciació¹⁵². En la pell sana dels ratolins, troben l'estratafina expressada al nucli, al citoplasma i a l'espai extracel·lular. En aquest treball, hem detectat l'SFN expressada en totes les capes de l'epidermis de la pell sana, inclosa la capa basal, a nivell citoplasmàtic però no al nucli.

L'anàlisi dels nostres resultats mostra com l'SFN és secretada de manera intensa en el CEC, i escassament en la pell sana i el CBC. També veiem que l'SFN s'expressa fortament en el CEC i en la pell sana, però no en el CBC. Una vegada més, com en el cas de la FABP5, veiem que l'SFN tot i que s'expressa en la pell sana no s'hi secreta i només se secreta en el CEC. En la literatura, trobem una referència on descriuen que l'SFN és secretada pels queratinòcits¹⁵³, però no hi ha informació sobre la funció que pot tenir aquesta SFN secretada. Un altre aspecte diferencial entre pell sana i CEC és que l'expressió d'SFN en la pell sana és a nivell citoplasmàtic i de membrana, però no al nucli. En canvi, en el CEC trobem l'SFN a nivell de la membrana, del citoplasma i del nucli. Tal com s'ha detallat, sembla que la influència que té l'SFN sobre la diferenciació dels queratinòcits és dependent de la seva localització citoplasmàtica. Per tant, encara que l'expressió de l'SFN sigui elevada tant en la pell sana (mitjana de

259.5) com en el CEC (mitjana de 286.2), la localització nuclear podria tenir un paper important en la seva carcinogènesi, no permetent la correcta diferenciació dels queratinòcits en aquest tumor.

En el CBC, trobem escassa expressió d'SFN, i es localitza a la membrana i al citoplasma de les cèl·lules neoplàsiques, però no al nucli. El CBC és un tumor que deriva de les cèl·lules basals i que, per tant, no presenta diferenciació terminal de queratinòcit de la mateixa manera que ho faria el CEC. De fet, la trobem expressada al centre dels nius en els tumors més agressius, on les cèl·lules són més escamoides. També es podria relacionar, en aquests tumors histològicament més agressius, l'expressió d'SFN amb la proliferació cel·lular i el creixement tumoral, de la mateixa manera que podria passar en el CEC i que s'ha descrit en d'altres tumors.

Pel que fa al possible paper de l'SFN en el desenvolupament del CEC, sabem que aquesta proteïna s'ha descrit implicada en d'altres tumors. La literatura suggereix que la funció de l'estratafina podria ésser context-dependent i teixit-específica, variant molt entre els diferents òrgans. D'una banda, en les fases inicials de l'adenocarcinoma de pulmó, la sobreexpressió d'estratafina està causada per la desmetilació del seu promotor, i aquesta sobreexpressió estimula la proliferació cel·lular, el creixement tumoral i la formació de metàstasis¹⁵⁴. En aquest mateix tipus tumoral, Shiba-Ishii *et al.*¹⁵⁵, mitjançant immunohistoquímica, estudien la seva expressió en el teixit tumoral. La troben expressada en el 98 % dels adenocarcinomes agressius i només en el 14 % dels menys agressius. Val la pena destacar que les cèl·lules *in situ* que envoltaven les invasives en els tumors agressius també presentaven una intensa tinció per a l'estratafina. En els estudis funcionals¹⁵⁵, troben que alteracions en l'estratafina provoquen canvis en la proliferació cel·lular (quan reduïm l'estratafina es redueix la proliferació, i viceversa), però no en la invasió. Aquesta regulació positiva de la proliferació cel·lular la realitza a través de l'activació de la via PI3K/Akt. D'altres tumors on s'ha descrit una sobreexpressió de l'estratafina, implicant un pitjor pronòstic, són el de cap i coll, estómac, pàncrees i còlon¹⁵⁶⁻¹⁶⁰.

D'altra banda, en el càncer de mama, troben que l'estratafina està infraexpressada, i que el mecanisme causant és la hipermetilació del seu gen, que ocasiona un silenci transcripcional en el 95 % dels càncers de mama invasius¹⁶¹. Aquesta hipermetilació del gen no es troba en les mostres sanes de pacients sense tumors (0 %), augmenta en les mostres amb atípia (38 %) i és molt alta en les mostres de carcinoma ductal *in situ* (83 %). Curiosament, sí que troben hipermetilació en les mostres sanes perilesionals de les pacients amb carcinoma (78-100 %), dada que recolza la idea del camp de cancerització en aquests tumors. Per tant, aquesta hipermetilació té lloc ben aviat en el procés de cancerització de les cèl·lules tumorals, en la fase pre-invasiva. D'altres tipus tumorals com l'hepatocarcinoma, el tumor de pròstata, etc., també presenten hipermetilació del promotor del gen de l'estratafina i infraexpressió de la mateixa¹⁶²⁻¹⁶⁴.

En resum, pel que fa al paper de l'SFN en la carcinogènesi del CEC, i davant de la dualitat funcional en d'altres tumors, creiem que la seva funció ha d'estar relacionada amb el fet que es trobi expressada en el CEC també en el nucli, i sobretot amb la seva secreció més que no pas amb els nivells d'expressió.

- **LADININA 1**

Hem trobat la LAD1 secretada només en el CEC. Fins on arriba el nostre coneixement actual, no hi ha publicacions respecte la seva secreció o expressió a la pell o als tumors cutanis. Una vegada més, segons els resultats de l'estudi amb IHQ, la LAD1 s'expressa intensament en les cèl·lules neoplàsiques del CEC

(mitjana de 242.3), però també en la pell sana (mitjana de 205.4), tot i que no es secreta en aquesta última. Cal destacar que en les mostres de pell sana l'expressió de LAD1 és difusa al citoplasma, i en canvi, en les mostres de CEC està intensament localitzada al llarg de la perifèria cel·lular. Aquest canvi de localització de la LAD1 en el CEC podria estar relacionat amb la seva participació en la motilitat cel·lular. També podria representar un augment de la secreció en aquests tumors, i això explicaria que la trobem secretada només en el CEC, però expressada tant al CEC com a la pell sana. Canvis en la localització de la LAD1 també els han descrit altres autors¹⁶⁵. Per exemple, la LAD1 es troba expressada tant en mostres de carcinoma *in situ* (CIS) oral com en mostres sanes adjacents, però en localitzacions intracel·lulars diferents. En les mostres de CIS la troben localitzada al llarg de la perifèria cel·lular, mentre que en les mostres sanes la troben difusa al citoplasma, de manera similar als nostres resultats.

La LAD1 és un filament d'ancoratge que forma part de la làmina densa de la membrana basal. En els darrers anys s'ha vist que es localitza no només als filaments de la perifèria de les cèl·lules sinó també al llarg del citoesquelet i del citoplasma¹²², de manera similar a la distribució de l'actina, amb la que interactua. Pel que fa a la funció de la LAD1, s'ha descrit implicada en el remodelatge de les fibres d'actina, la proliferació i la motilitat de les cèl·lules mamàries¹²². És un substrat de fosforil·lació de la via EGFR. L'activació que estimula la LAD1 de la via EGF-ERK augmenta la motilitat cel·lular i la progressió del cicle cel·lular¹⁶⁶. La depleció de la LAD1, per contra, inhibeix la migració cel·lular, la invasió i la tumorigènesi en models animals de càncer de mama, a través de la disfunció de les invadopòdies, protrusions de la membrana plasmàtica amb activitat proteolítica i grans quantitats de filaments d'actina¹²². A més a més, les cèl·lules deplecionades de LAD1 tenen menors taxes de proliferació cel·lular. La regulació que efectua la LAD1 de la via ERK-MEK té lloc a través de la proteïna adaptadora estratafina, que ja coneixem. L'estratafina actua com un cofactor soluble del citoesquelet, és induïda per la p53, s'uneix a fosfoproteïnes, aquí la LAD1, i la seva sobreexpressió s'associa a un augment d'activitat de la via MEK-ERK. Aquestes dades podrien explicar que en el nostre treball les expressions de la LAD1 i l'SFN siguin escasses en les mostres de CBC i elevades en les mostres de CEC, ja que tal hi com està descrit en la literatura, la via ERK es troba activada en el CEC¹⁶⁷, però no en el CBC¹⁶⁸.

A nivell d'agressivitat, i considerant que dels CQ els CECs fan més fàcilment metàstasis i tenen TEM, Klobuclar *et al.*¹⁶⁹ detecten una sobreexpressió de LAD1 en els teixits metastàtics del càncer de laringe, però no en els tumors no metastàtics. També la relacionen amb la transició epiteli-mesènquima de les cèl·lules tumorals¹⁶⁹.

- **CORNULINA**

En l'estudi de proteòmica del TIF, trobem que la secreció de CRNN succeeix només en el CBC. La presència de CRNN extracel·lular s'ha descrit com a biomarcador en diferents treballs. La CRNN s'ha detectat en el plasma humà¹⁷⁰ i en la saliva de porcs en condicions d'estrès¹⁷¹, però se'n desconeix la seva funció. Coincidint amb la seva presència en el TIF del CBC, també observem que l'expressió de CRNN és intensa en el CBC i mostra tendència a relacionar-se amb els subtipus més agressius. Curiosament, l'expressió també és major en el CEC que en la pell sana, i és major en els tumors més agressius (recidivats o amb infiltració perineural) i en les àrees més indiferenciades. Tot i així, no hem detectat la presència de CRNN secretada en el CEC. Cal destacar, que en el CBC l'expressió de CRNN per part de les cèl·lules neoplàsiques és major que en el CEC (mitjana d'*histoscores* en el CBC = 206.3 i

en el CEC = 70.0), en canvi, l'expressió de CRNN tant a nivell de l'estroma peritumoral com de la pell sana adjacent als tumors és major en els CECs que en els CBCs.

La CRNN està expressada i es localitza a les capes superiors dels epitelis escamosos diferenciats, i en el cas de l'epidermis és un marcador tardà de la diferenciació dels queratinòcits¹⁷². D'acord amb això, en el nostre treball només es detecta la CRNN en la capa granulosa de la pell sana. En canvi, la veiem expressada en les cèl·lules basaloides dels tumors. Per contra, la CRNN està considerada com un supressor de tumors. S'ha descrit infraexpressada en el citoplasma del 55-89 % de mostres primàries de carcinoma escamós esofàgic^{123,125}. A més a més, s'ha vist que el grau d'infraexpressió es correlaciona significativament amb el grau histològic del tumor, amb la presència de metàstasis limfàtiques i amb el temps de supervivència. En la displàsia epitelial oral la troben infraexpressada respecte a la mucosa sana, i absent en el carcinoma escamós oral¹⁷³. Val la pena mencionar que en els carcinomes escamosos orals ben diferenciats o queratinitzants troben expressió de cornulina en les perles de queratina¹⁷⁴. També s'ha descobert que l'absència d'expressió de cornulina en els marges quirúrgics dels carcinomes escamosos de cap i coll s'associa a un major risc de recidives locals¹⁷⁵.

La diferència entre aquests tumors i els cutanis referent a l'expressió de CRNN es podria relacionar amb funcions específiques del teixit. En aquest sentit, en la psoriasi¹⁷⁶ s'ha relacionat la cornulina amb una funció promotora de la proliferació dels queratinòcits, activant la via PI3K/Akt. La sobreexpressió de cornulina *in vitro* augmenta la fosforil·lació d'Akt, activant la via. La troben expressada de manera lleu a la capa basal de la pell sana en el 49.12 % de les mostres. En la psoriasi la troben altament expressada en totes les capes de l'epidermis en el 73.6 % de les mostres. De la mateixa manera, troben augmentada l'expressió *in vivo* de cornulina després d'augmentar la inflamació mitjançant l'aplicació d'una crema amb imiquimod en la pell dels ratolins. *In vitro*, en cultius de queratinòcits *knockdown* de cornulina, aquests autors observen una inhibició del cicle cel·lular, que s'atura durant la transició de la fase G1 a S, i que s'acompanya de la reducció de l'expressió de ciclina D1. Al contrari, quan s'estimula l'expressió de cornulina en els queratinòcits, augmenta la proliferació cel·lular, estimulant-se la transició de G1 a S i l'expressió de ciclina D1¹⁷⁶. El tractament amb calcipotriol redueix l'expressió de la cornulina.

Els autors del treball postulen que aquesta contradicció respecte les troballes d'estudis previs en mostres de diversos carcinomes, on consideren la CRNN una supressora de tumors, i les de la psoriasi, on té una funció de promotora de la proliferació, es podria explicar pel context de benignitat-malignitat en el qual trobem la cornulina (psoriasi vs. carcinoma). Els nostres resultats suggereixen que en els carcinomes cutanis, de la mateixa manera que en la psoriasi i a diferència de la resta de tumors, la CRNN es troba sobreexpressada en consonància amb la seva funció de promotora de la proliferació, descrita prèviament en la pell. A més a més, si tenim en compte que l'expressió de CRNN es detecta en tumors menys agressius, com el CBC, però també en els més agressius com el CEC, i sobretot en els fronts invasius, proposem que aquesta diferència en la sobreexpressió de la CRNN (de la psoriasi i els carcinomes cutanis respecte a la resta de carcinomes) estaria més relacionada amb la localització (cutània o no) que no pas amb la condició de la patologia estudiada (benigna o maligna).

Finalment, de la mateixa manera que s'ha vist en d'altres marcadors descrits en aquest treball (veure més amunt), sospitem que la presència de la CRNN secretada només en un dels tumors, el CBC, és el fet rellevant per a explicar les característiques del tumor, més que no pas la seva expressió.

Conclusions

Conclusions

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

1. L'evolució del CBC a Lleida segueix el patró observat en altres poblacions: tot i que per sobre dels 60 anys els pacients segueixen essent més freqüentment homes, en < 60 anys ja trobem una predominança femenina.
2. L'ús de les cabines de bronzejat és l'únic factor de risc més freqüent entre les dones i explicaria la predominança femenina del CBC en menors de 60 anys.
3. L'increment de la incidència entre els pacients joves estaria relacionada amb la genètica, el fototipus cutani i les cremades a la infància. Hi hauria poca relació amb l'ús de les cabines de bronzejat.
4. L'etiologia del CBC entre els pacients joves sembla més relacionada amb l'exposició intermitent als raigs UV en àrees habitualment cobertes.
5. L'elecció del millor mètode d'obtenció de TIF requereix comparar-los en una mateixa mostra, ja que els resultats són molt dependents de les característiques del tumor a estudiar, com la consistència i el maneig del teixit.
6. La centrifugació a altes rpm és el mètode d'elecció per a obtenir TIF de mostres de tumors cutanis. Aquest mètode no causa un major trencament cel·lular i permet obtenir més quantitat de proteïnes extracel·lulars.
7. El CEC, el CBC i la pell sana tenen cadascun un perfil específic de proteïnes secretades obtingudes a partir del seu TIF. La secreció de PNP, FABP5, SFN i LAD1 és un perfil propi del CEC.
8. Les diferències en la composició proteica del TIF indiquen que existeix una diferent resposta immunològica de l'organisme enfront al CBC i al CEC.
9. Les mostres de CEC es classifiquen clarament en dos grups segons el perfil d'expressió de proteïnes del seu TIF. Aquests dos grups no es poden explicar amb les dades disponibles actualment ni per diferències en la seva histologia, el risc de recidiva, o característiques clíniques com l'edat, el gènere o la localització del tumor.
10. El patró d'expressió de FABP5 permet distingir les zones diferenciades de les invasives en el CEC.
11. Existeix una diferent localització de l'estratafina en la pell sana (membrana-citoplasma) i el CEC (nuclear) que podria estar relacionada amb el desenvolupament tumoral.

12. Existeix una diferent localització de la ladinina 1 en la pell sana (difusa en el citoplasma) i el CEC (membrana) que podria estar relacionada amb el desenvolupament tumoral.
13. Les proteïnes PNP, FABP5, SFN i LAD1 estan relacionades amb l'agressivitat tumoral i podrien ser dianes terapèutiques per al tractament del CEC.
14. L'expressió de CRNN per part de les cèl·lules neoplàsiques i sobretot la seva secreció són un marcador de CBC.

Futur de la línia d'investigació

Futur de la línia d'investigació

El CBC és el càncer més freqüent de l'ésser humà. En les darreres dècades ha experimentat un canvi epidemiològic important, reflectint la transformació que està vivint la societat. Per aquest motiu, és important conèixer exactament quins seran en un futur els factors de risc més rellevants i adreçar-los correctament a les campanyes de salut. Continuant amb els resultats del primer capítol d'aquesta tesi, s'estan recollint dades de FR en tots els grups d'edat, per a poder conèixer amb més precisió les diferències que existeixen entre ells i l'evolució que han tingut, i ser així capaços d'oferir un consell més personalitzat als nostres pacients.

Per altra banda, a partir del mètode que hem descrit per a aïllar TIF de mostres cutànies, es podrà estudiar el perfil proteòmic d'altres CCNM o fins i tot d'altres patologies cutànies no tumorals com la hidradenitis. Això permetrà conèixer una mica més aquestes malalties i els seus mecanismes fisiopatològics i esperem que en un futur no molt llunyà permeti descobrir noves dianes terapèutiques.

Per últim, aplicant el mètode per aïllar el TIF hem pogut descriure el perfil proteòmic dels CQ. Amb aquestes dades s'obre un ampli ventall de qüestions que esperem poder resoldre en un futur. Queda pendent, per exemple, poder descriure les causes per les quals els 2 grups de CEC clarament es diferencien segons el seu perfil de secreció de proteïnes, i que amb les dades disponibles actualment no hem pogut explicar. A més a més, a partir de les proteïnes candidates seleccionades relacionades amb l'agressivitat tumoral es podran realitzar estudis funcionals i esperem que descobrir dianes terapèutiques. Finalment, de la mateixa manera que s'han estudiat en aquest treball les proteïnes sobreexpressades en els CQ, queda pendent analitzar les proteïnes infraexpressades. Això permetria potser descriure supressors de tumors inactivats en aquestes neoplàsies.

Referències

Referències

1. Ionescu DN, Arida M, Jukic DM. Metastatic basal cell carcinoma: four case reports, review of literature, and immunohistochemical evaluation. *Arch Pathol Lab Med*. 2006;130:45-51.
2. Venables ZC, Autier P, Nijsten T, Wong KF, Langan SM, Rous B, Broggio J, Harwood C, Henson K, Proby CM, Rashbass J, Leigh IM. Nationwide Incidence of Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in England. *JAMA Dermatol*. 2019; 155(3):298-306.
3. Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2005; 353:2262-2269.
4. Apalla, Z.; Nashan, D.; Weller, R.B.; Castellsagué, X. Skin Cancer: Epidemiology, Disease Burden, Pathophysiology, Diagnosis, and Therapeutic Approaches. *Dermatol Ther (Heidelberg)*. 2017; 7 (Suppl. 1):5–19.
5. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol*. 2002; 146:1–6.
6. Staples M, Marks R, Giles G. Trends in the incidence of non-melanocytic skin cancer (NMSC) treated in Australia 1985–1995: are primary prevention programs starting to have an effect? *Int J Cancer*. 1998; 78:144–8.
7. Staples MP, Elwood M, Burton RC, Williams JL, Marks R, Giles GG. Nonmelanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust*. 2006; 184:6–10.
8. Harris RB, Griffith K, Moon TE. Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancers in southeastern Arizona, 1985–1996. *J Am Acad Dermatol*. 2001; 45:528–36.
9. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol*. 2012; 166:1069-1080.
10. Bielsa I, Soria X, Esteve M, Ferrándiz C; Skin Cancer Study Group of Barcelonès Nord. Population-based incidence of basal cell carcinoma in a Spanish Mediterranean area. *Br J Dermatol*. 2009; 161(6):1341-1346.
11. Rubió-Casadevall J, Hernandez-Pujol AM, Ferreira-Santos MC, Morey-Esteve G, Vilardell L, Osca-Gelis G, Vilar-Coromina N, Marcos-Gragera R. Trends in incidence and survival analysis in non-melanoma skin cancer from 1994 to 2012 in Girona, Spain: A population-based study. *Cancer Epidemiol*. 2016; 45:6-10.
12. Fatima Birch-Johansen, Allan Jensen, Lone Mortensen, Anne Braae Olesen and Susanne K. Kjær. Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancer in Denmark 1978–2007: rapid incidence increase among young Danish women. *Int Cancer* 2010; 127:2190–2198.
13. Adalsteinsson JA, Ratner D, Olafsdóttir E, Grant-Kels J, Ungar J, Silverberg JI, Kristjansson AK, Jonasson JG, Tryggvadóttir L. Basal cell carcinoma: an emerging epidemic in women in Iceland. *Br J Dermatol*. 2020 Feb 7. [Epub ahead of print].
14. Skellett AM, Hafiji J, Greenberg DC, Wright KA, Levell NJ. The incidence of basal cell carcinoma in the under-30s in the UK. *Clin Exp Dermatol*. 2012; 37:227-229.
15. Paolino G, Donati M, Didona D, Mercuri SR, Cantisani C. Histology of Non-Melanoma Skin Cancers: An Update. *Biomedicines*. 2017 Dec 20;5(4). pii: E71
16. Amici JM, Dousset L, Battistella M, Vergier B, Bailly JY, Cogrel O, Gusdorf L, Alfaro C, Ezzedine K, Cribier B, Beylot-Barry M. Clinical factors predictive for histological aggressiveness of basal cell carcinoma: A prospective study of 2274 cases. *Ann Dermatol Venereol*. 2019 Dec 9. pii: S0151-9638(19)31014-2. [Epub ahead of print].
17. Hollestein LM, de Vries E, Nijsten T. Trends of cutaneous squamous cell carcinoma in the Netherlands: increased incidence rates, but stable relative survival and mortality 1989-2008. *Eur J Cancer*. 2012; 48(13):2046-2053.
18. Brewster DH, Bhatti LA, Inglis JH, et al. Recent trends in incidence of nonmelanoma skin cancers in the east of Scotland, 1992-2003. *Br J Dermatol* 2007; 156(6):1295–1300.
19. Andersson EM, Paoli J, Wastensson G. Incidence of cutaneous squamous cell carcinoma in coastal and inland areas of Western Sweden. *Cancer Epidemiol* 2011;35(6): e69–74.
20. Nguyen KD, Han J, Li T, et al. Invasive cutaneous squamous cell carcinoma incidence in US health care workers. *Arch Dermatol Res* 2014; 306(6):555–560.
21. Karia P. Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012. *J Am Acad Dermatol*. 2013; 68:957–966.
22. Venables ZC, Autier P, Nijsten T, Wong KF, Langan SM, Rous B, Broggio J, Harwood C, Henson K, Proby CM, Rashbass J, Leigh IM. Nationwide Incidence of Metastatic Cutaneous Squamous Cell Carcinoma in England. *JAMA Dermatol*. 2019; 1;155:298-306.
23. Waldman A, Schmults C. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2019 Feb; 33(1):1-12.
24. Yanofsky VR, Mercer SE, Phelps RG. Histopathological variants of cutaneous squamous cell carcinoma: a review. *J Skin Cancer*. 2011; 2011:210813

25. Nagarajan P, Asgari MM, Green AC, Guhan SM, Arron ST, Proby CM, Rollison DE, Harwood CA, Toland AE. Keratinocyte Carcinomas: Current concepts and future research priorities. *Clin Cancer Res.* 2019 Apr 15;25(8):2379-2391.
26. Krynitz B, Edgren G, Lindelof B, et al. Risk of skin cancer and other malignancies in kidney, liver, heart and lung transplant recipients 1970 to 2008: a Swedish population-based study. *Int J Cancer* 2013;132(6):1429–38.
27. Sinnya S, Zwald FO, Colegio OR. Skin cancer in the crosshairs: highlights from the biennial scientific retreat of international transplant skin cancer collaborative and skin care in organ transplant recipients Europe. *Transplant Direct* 2015;1(7): e26.
28. Omland SH, Gniadecki R, Haedersdal M, et al. Skin cancer risk in hematopoietic stem-cell transplant recipients compared with background population and renal transplant recipients: a population-based cohort study. *JAMA Dermatol* 2016; 152(2):177–83.
29. Yoon J, Phibbs CS, Chow A, Pomerantz H, Weinstock MA. Costs of Keratinocyte Carcinoma (Nonmelanoma Skin Cancer) and Actinic Keratosis Treatment in the Veterans Health Administration. *Dermatol Surg.* 2016 Sep; 42(9):1041-7.
30. Perera E, Gnaneswaran N, Staines C, Win AK, Sinclair R. Incidence and prevalence of non-melanoma skin cancer in Australia: A systematic review. *Australas J Dermatol.* 2015 Nov; 56(4):258-67.
31. Morris S, Cox B, Bosanquet N. Cost of skin cancer in England. *Eur J Health Econ.* 2009; 10:267-73.
32. Karimkhani C, Dellavalle RP, Coffeng LE, Flohr C, Hay RJ, Langan SM, Nsoesie EO, Ferrari AJ, Erskine HE, Silverberg JI, Vos T, Naghavi M. Global Skin Disease Morbidity and Mortality: An Update from the Global Burden of Disease Study 2013. *JAMA Dermatol.* 2017 May 1;153(5):406-412.
33. Karagiannis GS, Pavlou MP, Diamandis EP. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Mol Oncol.* 2010; 4:496-510.
34. Gullino PM, Clark SH, Grantham FH. The interstitial fluid of solid tumors. *Cancer Res.* 1964; 24:780-94.
35. Wagner M., Wiig H. Tumor Interstitial Fluid Formation, Characterization and Clinical Implications. *Front Oncol.* 2015; 5:1-12.
36. Haslene-Hox H, Tenstad O, Wiig H. Interstitial fluid-a reflection of the tumor cell microenvironment and secretome. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Nov; 1834(11):2336-2346.
37. Méndez O, Villanueva J. Challenges and opportunities for cell line secretomes in cancer proteomics. *Proteomics Clin Appl.* 2015 Apr; 9(3-4):348-57.
38. Mayya V, Han DK. Phosphoproteomics by mass spectrometry: insights, implications, applications and limitations. *Expert Rev Proteomics.* 2009 Dec; 6(6):605-618
39. Burian M, Velic A, Matic K, et al. Quantitative proteomics of the human skin secretome reveal a reduction in immune defense mediators in ectodermal dysplasia patients. *J Invest Dermatol.* 2015 Mar; 135(3):759-767.
40. Park JE, Tan HS, Datta A, Lai RC, Zhang H, Meng W, Lim SK, Sze SK. Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Mol Cell Proteomics.* 2010 Jun; 9(6):1085-1099.
41. Stone MD, Odland RM, McGowan T, Onsongo G, Tang C, Rhodus NL, Jagtap P, Bandhakavi S, Griffin TJ. Novel In Situ Collection of Tumor Interstitial Fluid from a Head and Neck Squamous Carcinoma Reveals a Unique Proteome with Diagnostic Potential. *Clin Proteomics.* 2010 Sep; 6(3):75-82.
42. Haslene-Hox H, Oveland E, Berg KC, Kolmannskog O, Woie K, Salvesen HB, Tenstad O, Wiig H. A new method for isolation of interstitial fluid from human solid tumors applied to proteomic analysis of ovarian carcinoma tissue. *PLoS One.* 2011 Apr 26;6(4): e19217.
43. Celis JE, Gromov P, Cabezón T, Moreira JM, Ambartsumian N, Sandelin K, Rank F, Gromova I. Proteomic characterization of the interstitial fluid perfusing the breast tumor microenvironment: a novel resource for biomarker and therapeutic target discovery. *Mol Cell Proteomics.* 2004 Apr;3(4):327-44.
44. Sun W, Ma J, Wu S, Yang D, Yan Y, Liu K, Wang J, Sun L, Chen N, Wei H, Zhu Y, Xing B, Zhao X, Qian X, Jiang Y, He F. Characterization of the liver tissue interstitial fluid (TIF) proteome indicates potential for application in liver disease biomarker discovery. *J Proteome Res.* 2010 Feb 5;9(2):1020-1031.
45. Onsuratham S, Haanon O, Pinlaor P, Pairojkul C, Khuntikeo N, Thanan R, Roytrakul S, Pinlaor S. Proteomics detection of S100A6 in tumor tissue interstitial fluid and evaluation of its potential as a biomarker of cholangiocarcinoma. *Tumour Biol.* 2018; 40:1010428318767195.
46. Lomas A., Leonardi-Bee J., Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 2012; 166(5):1069–1080.
47. Bath-Hextall F, Leonardi-Bee J, Smith C, Meal A, Hubbard R. Trends in incidence of skin basal cell carcinoma. Additional evidence from a UK primary care data base study. *Int J Cancer.* 2007; 121(9):2105–2108

48. Nehal KS, Bichakjian CK. Update on Keratinocyte Carcinomas. *N Engl J Med*. 2018 Jul 26; 379(4):363-374.
49. Birch-Johansen F, Jensen A, Mortensen L, Olesen AB, Kjær SK. Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancer in Denmark 1978–2007: rapid incidence increase among young Danish women. *Int J Cancer*. 2010;127(9):2190–2198
50. Christenson LJ, Borrowman TA, Vachon CM, et al. Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. *JAMA Dermatol*. 2005; 294(6):681–690
51. Karagas MR, Zens MS, Li Z, Stukel TA, Perry AE, Gilbert-Diamond D, et al. Early-Onset Basal Cell Carcinoma and Indoor Tanning: A Population-Based Study. *Pediatrics* 2014; 134:e4-e12.
52. Nemer KM, Bauman TM, Boyd AS. Risk Factors for Basal Cell Carcinoma in Men Younger than 40 years: A Case-Control Study. *Dermatol Surg* 2018; 0:1-6.
53. Ferrucci LM, Cartmel B, Molinaro AM, Leffell DJ, Bale AE, Mayne ST. Indoor tanning and risk of early-onset basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2012; 67(4):552–562
54. Bakos RM, Kriz M, Muhlstadt M, et al. Risk factors for early-onset basal cell carcinoma in a German institution. *Eur J Dermatol* 2011; 21:705-709.
55. Yu M, Zloty D, Cowan B, et al. Superficial, nodular, and morpheaform basal-cell carcinomas exhibit distinct gene expression profiles. *J Invest Dermatol* 2008; 128:1797–1805.
56. Scrivener Y, Grosshans E, Cribier B. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br J Dermatol*. 2002 Jul; 147(1):41-47.
57. de Vries E, Louwman M, Bastiaens M, de Gruijl F, Coebergh JW. Rapid and continuous increases in incidence rates of basal cell carcinoma in the southeast Netherlands since 1973. *J Invest Dermatol*. 2004; 123(4):634–638.
58. Matas-Nadal C, Malvehy J, Ferreres JR, Boada A, Bodet D, Segura S, Salleras M, Azon A, Bel-Pla S, Bigata X, Campoy A, Curcó N, Dalmau J, Formigon M, Gonzalez A, Just M, Llistosella E, Nogues ME, Pedragosa R, Pujol JA, Sabat M, Smandia JA, Zaballos P, Puig S, Martí RM. Increasing incidence of lentigo maligna and lentigo maligna melanoma in Catalonia. *Int J Dermatol*. 2019 May; 58(5):577-581.
59. Schmitt J, Haufe E, Trautmann F, et al. Occupational UV-exposure is a major risk factor for basal cell carcinoma: results of the population-based case-control study FB-181. *J Occup Environ Med* 2018; 60:36–43.
60. Zhang M, Qureshi AA, Geller AC, Frazier L, Hunter DJ, Han J. Use of tanning beds and incidence of skin cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30:1588-1593.
61. Choi K, Lazovich D, Southwell B, Forster J, Rolnick SJ, Jackson J. Prevalence and characteristics of indoor tanning use among men and women in the United States. *Arch Dermatol*. 2010; 146(12):1356–1361.
62. Demko CA, Borawski EA, Debanne SM, Cooper KD, Stange KC. Use of indoor tanning facilities by white adolescents in the United States. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2003; 157(9):854–860.
63. J A Adalsteinsson, D Ratner, E Olafsdóttir, J Grant-Kels, J Ungar, J I Silverberg, A K Kristjansson, J G Jonasson, L Tryggvadóttir: Basal Cell Carcinoma: An Emerging Epidemic in Women in Iceland. *Br J Dermatol*, 2020 Feb 7. Online ahead of print.
64. Suppa M, Gandini S, Njimi H, et al. Prevalence and determinants of sunbed use in thirty European countries: data from the Euromelanoma skin cancer prevention campaign. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019 Mar; 33 Suppl 2:13-27
65. Raone B, Patrizi A, Gurioli C, Gazzola A, Ravaioli GM. Cutaneous carcinogenic risk evaluation in 375 patients treated with narrowband-UVB phototherapy: A 15-year experience from our Institute. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2018 Sep; 34(5):302-306.
66. Wei EX, Li X, Nan H. Having a first-degree relative with melanoma increases lifetime risk of melanoma, squamous cell carcinoma, and basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Aug; 81(2):489-499.
67. Chen EI, Yates JR 3rd. Cancer proteomics by quantitative shotgun proteomics. *Mol Oncol*. 2007; 1:144-159.
68. Bittremieux W, Tabb DL, Impens F, Staes A, Timmerman E, Martens L, Laukens K. Quality control in mass spectrometry-based proteomics. *Mass Spectrom Rev*. 2018; 37:697-711.
69. Bodzon-Kulakowska A, Bierczynska-Krzysik A, Dylag T, Drabik A, Suder P, Noga M, Jarzebinska J, Silberring J. Methods for samples preparation in proteomic research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007; 15; 849:1-31.
70. Wagner M., Wiig H. Tumor Interstitial Fluid Formation, Characterization and Clinical Implications. *Front Oncol*. 2015; 5:1-12.
71. Haslene-Hox H. Measuring gradients in body fluids - A tool for elucidating physiological processes, diagnosis and treatment of disease. *Clin Chim Acta*. 2018; 23. S0009-8981: 30423-6.
72. Celis JE, Gromov P, Cabezón T, Moreira JM, Ambartsumian N, Sandelin K, Rank F, Gromova I. Proteomic characterization of the interstitial fluid perfusing the breast tumor microenvironment: a novel resource for biomarker and therapeutic target discovery. *Mol Cell Proteomics*. 2004; 3:327-344.

73. David H. Chu. Development and structure of skin. *In Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7th ed.; Mc Graw Hill Medical Ed, 2008; p 63.
74. Huang CM, Ananthaswamy HN, Barnes S, Ma Y, Kawai M, Elmets CA. Mass spectrometric proteomics profiles of in vivo tumor secretomes: capillary ultrafiltration sampling of regressive tumor masses. *Proteomics*. 2006 Nov; 6(22):6107-16.
75. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systemic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatic resources. *Nature Protocols* 2009; 4:44.
76. Wiig H, Aukland K and Tenstad O. Isolation of interstitial fluid from rat mammary tumors by a centrifugation method. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284: H416-H424.
77. Haslene-Hox H, Oveland E, Berg KC, Kolmannskog O, Woie K, Salvesen HB, Tenstad O and Wiig H. A new method for isolation of interstitial fluid from human solid tumors applied to proteomic analysis of ovarian carcinoma tissue. *PLoS One* 6. 2011; e192-117.
78. Villarreal L, Méndez O, Salvans C, Gregori J, Baselga J, Villanueva J. Unconventional secretion is a major contributor of cancer cell line secretomes. *Mol Cell Proteomics*. 2013 May; 12(5):1046-1060.
79. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012; 10: e1001450.
80. Pathan M, Fonseka P, Chitti SV, Kang T, Sanwlani R, Van Deun J, Hendrix A, Mathivanan S. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Research*. 2019; 47, Issue D1, D516–D519.
81. R.J. Fijneman, M. de Wit, M. Pourghiasian, S.R. Piersma, T.V. Pham, M.O. Warmoes, *et al.* Proximal fluid proteome profiling of mouse colon tumors reveals biomarkers for early diagnosis of human colorectal cancer, *Clin Cancer Res*. 2012; 18, 2613–2624.
82. Hoskins ER., Hood BL., Sun M., Krivak TC., Edwards RP., and Conrads TP. Proteomic analysis of ovarian cancer proximal fluids: Validation of elevated peroxiredoxin 1 in patient peripheral circulation. *PLoS One*. 2011; 6: e25056.
83. Tilli CM, Van Steensel MA, Krekels GA, Neumann HA, Ramaekers FC. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2005; 152:1108-1124.
84. Donovan J. Review of the hair follicle origin hypothesis for basal cell carcinoma. *Dermatol Surg*. 2009; 35:1311-1323.
85. Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3:903-911.
86. Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005; 6:306-317.
87. Doglioni C, Piccinin S, Demontis S, Cangi MG, Pecciarini L, Chiarelli C, Armellin M, Vukosavljevic T, Boiocchi M, Maestro R. Alterations of beta-catenin pathway in non-melanoma skin tumors: loss of alpha-ABC nuclear reactivity correlates with the presence of beta-catenin gene mutation. *Am J Pathol*. 2003; 163:2277-2287.
88. Saldanha G, Ghura V, Potter L, Fletcher A. Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. *Br J Dermatol*. 2004; 151:157-164.
89. Li X, Deng W, Lobo-Ruppert SM, Ruppert JM. Gli1 acts through Snail and E-cadherin to promote nuclear signaling by beta-catenin. *Oncogene*. 2007; 26:4489-98.
90. Nakamura M, Tokura Y. Epithelial-mesenchymal transition in the skin. *J Dermatol Sci*. 2011; 61:7-13.
91. Jordan NV, Johnson GL, Abell AN. Tracking the intermediate stages of epithelial-mesenchymal transition in epithelial stem cells and cancer. *Cell Cycle*. 2011; 10:2865-2873.
92. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16.
93. Nindl I, Gottschling M, Krawtchenko N, *et al.* Low prevalence of p53, p16(INK4a) and Ha-ras tumour-specific mutations in low-graded actinic keratosis. *Br J Dermatol* 2007; 156: 34-39.
94. Ziegler A, Jonason AS, Leffell DJ, *et al.* Sunburn and p53 in the onset of skin cancer. *Nature* 1994; 372:773-776.
95. Bito T, Ueda M, Ahmed NU, Nagano T, Ichihashi M. Cyclin D and retinoblastoma gene product expression in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma in relation to p53 expression. *J Cutan Pathol* 1995; 22:427-434.
96. Burnworth B, Popp S, Stark HJ, *et al.* Gain of 11q/cyclin D1 overexpression is an essential early step in skin cancer development and causes abnormal tissue organization and differentiation. *Oncogene* 2006; 25:4399-4412.
97. Shen Y, Xu J, Jin J, Tang H, Liang J. Cyclin D1 expression in Bowen's disease and cutaneous squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol* 2014; 2:545-548.
98. Li YY, Hanna GJ, Laga AC, Haddad RI, Lorch JH, Hammerman PS. Genomic analysis of metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015; 21:1447-1456.
99. Yilmaz AS, Ozer HG, Gillespie JL, *et al.* Differential mutation frequencies in metastatic cutaneous squamous cell carcinomas *versus* primary tumors. *Cancer* 2017; 123:1184-1193.

100. Lee CS, Bhaduri A, Mah A, *et al.* Recurrent point mutations in the kinetochore gene KNSTRN in cutaneous squamous cell carcinoma. *Nat Genet* 2014; 46: 1060-1062.
101. South AP, Purdie KJ, Watt SA, *et al.* NOTCH1 mutations occur early during cutaneous squamous cell carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 2014; 134: 2630-2638.
102. Wang NJ, Sanborn Z, Arnett KL, *et al.* Loss-of-function mutations in Notch receptors in cutaneous and lung squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 17761-6.
103. Davoli T, Xu AW, Mengwasser KE, *et al.* Cumulative haploinsufficiency and triplosensitivity drive aneuploidy patterns and shape the cancer genome. *Cell* 2013; 155: 948-62.
104. Tanaka N, Odajima T, Ogi K, Ikeda T, Satoh M. Expression of E-cadherin, alpha-catenin, and beta-catenin in the process of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2003; 89: 557-63.
105. Campos MA, Lopes JM, Soares P. The genetics of cutaneous squamous cell carcinogenesis. *Eur J Dermatol.* 2018; 28(5):597–605.
106. Karagiannis GS, Pavlou MP, Diamandis EP. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Mol Oncol.* 2010; 4:496-510.
107. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer.* 2001 Oct; 1(1):46-54.
108. Roth L, Srivastava S, Lindzen M, Sas-Chen A, Sheffer M, Lauriola M, *et al.* SILAC identifies LAD1 as a filamin-binding regulator of actin dynamics in response to EGF and a marker of aggressive breast tumors. *Sci Signal.* 2018 Jan 30; 11(515): eaan0949.
109. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, Iyer AK. PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome. *Front Pharmacol.* 2017 Aug 23; 8:561.
110. Glinicki P, Jeske W, Kapuścińska R, Zgliczyński W. Comparison of chromogranin A (CgA) levels in serum and plasma (EDTA2K) and the respective reference ranges in healthy males. *Endokrynol Pol.* 2015; 66(1):53-6.
111. Mahata SK, Corti A. Chromogranin A and its fragments in cardiovascular, immunometabolic, and cancer regulation. *Ann N Y Acad Sci.* 2019 Nov; 1455(1):34-58.
112. Peña-Altamira LE, Polazzi E, Giuliani P, Beraudi A, Massenzio F, Mengoni I, Poli A, Zuccarini M, Ciccarelli R, Di Iorio P, Virgili M, Monti B, Caciagli F. Release of soluble and vesicular purine nucleoside phosphorylase from rat astrocytes and microglia induced by pro-inflammatory stimulation with extracellular ATP via P2X₇ receptors. *Neurochem Int.* 2018 May; 115:37-49.
113. Grunebaum E, Campbell N, Leon-Ponte M, Xu X, Chapdelaine H. Partial Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency Helps Determine Minimal Activity Required for Immune and Neurological Development. *Front Immunol.* 2020 Jun 30; 11:1257.
114. Currie E, Schulze A, Zechner R, Walther TC, Farese Jr RV. Cellular fatty acid metabolism and cancer. *Cell metabolism.* 2013; 18:153-161.
115. Song J, Zhang H, Wang Z, Xu W, hong L, Cao J, *et al.* The Role of FABP5 in Radiation-Induced Human Skin Fibrosis. *Radiation Research.* 2018; 189 (2): 177-186.
116. Zendzian-Piotrowska M, Górski J. Fatty acid binding protein (FABP). *Postepy Hig Med Dosw.* 1994;48(6):753–761.
117. Owada Y. Fatty acid binding protein: localization and functional significance in the brain. *Tohoku J Exp Med.* 2008; 214(3):213–220.
118. Y. Zhang, Y. Sun, E. Rao, F. Yan, Q. Li, Y. Zhang, K.A. Silverstein, S. Liu, E. Sauter, M.P.Cleary, B. Li, Fatty acid-binding protein E-FABP restricts tumor growth by promoting IFN-beta responses in tumor-associated macrophages, *Cancer research*, 2014; 74:2986-2998.
119. Y. Pan, T. Tian, C.O. Park, S.Y. Lofftus, S. Mei, X. Liu, C. Luo, J.T. O'Malley, A. Gehad, J.E. Teague, S.J. Divito, R. Fuhlbrigge, P. Puigserver, J.G. Krueger, G.S. Hotamisligil, R.A. Clark, T.S. Kupper, Survival of tissue-resident memory T cells requires exogenous lipid uptake and metabolism. *Nature*, 2017; 543:252-256.
120. B. Li, J.M. Reynolds, R.D. Stout, D.A. Bernlohr, J. Suttles, Regulation of Th17 differentiation by epidermal fatty acid-binding protein. *Journal of immunology.* 2009; 182:7625-7633.
121. Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, *et al.* 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* 1997; 1:3–11.
122. Roth L, Srivastava S, Lindzen M, Sas-Chen A, Sheffer M, Lauriola M, *et al.* SILAC identifies LAD1 as a filamin-binding regulator of actin dynamics in response to EGF and a marker of aggressive breast tumors. *Sci Signal.* 2018 Jan 30; 11(515): eaan0949.
123. Pawar H, Maharudraiah J, Kashyap MK, Sharma J, Srikanth SM *et al.* (2013) Downregulation of cornulin in esophageal squamous cell carcinoma. *Acta Histochem.* 2012; 115: 89-99.
124. Contzler R, Favre B, Huber M, Hohl D. Cornulin, a new member of the "fused gene" family, is expressed during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol.* 2005; 124:990-997.

125. Chen K, Li Y, Dai Y, Li J, Qin Y, Zhu Y, Zeng T, Ban X, Fu L, Guan XY. Characterization of tumor suppressive function of cornulin in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013 Jul 24; 8(7): e68838.
126. Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Xu B, Babkair H, Sumita Y, Cheng J, Yamamoto T, Saku T. Proteomic and histopathological characterization of the interface between oral squamous cell carcinoma invasion fronts and non-cancerous epithelia. *Exp Mol Pathol*. 2017 Apr; 102(2):327-336.
127. Terkelsen T, Pernemalm M, Gromov P, Børresen-Dale AL, Krogh A, Haakensen VD, Lethiö J, Papaleo E, Gromova I. High throughput proteomics of breast cancer interstitial fluid: identification of tumor subtype-specific serologically relevant biomarkers. *Mol Oncol*. 2020 Nov 11. doi: 10.1002/1878-0261.12850.
128. Terada T. Expression of NCAM (CD56), chromogranin A, synaptophysin, c-KIT (CD117) and PDGFRA in normal non-neoplastic skin and basal cell carcinoma: an immunohistochemical study of 66 consecutive cases. *Med Oncol*. 2013 Mar; 30(1):444.
129. Houcine Y, Chelly I, Zehani A, Belhaj Kacem L, Azzouz H, Rekik W, C H, Haouet S, Kchir N. Neuroendocrine differentiation in basal cell carcinoma. *J Immunoassay Immunochem*. 2017; 38(5):487-493.
130. Ishida M, Kurashima R, Okabe H. Aberrant expression of class III beta-tubulin in basal cell carcinoma of the skin. *Oncol Rep*. 2009; 22:733–737.
131. George E, Swanson PE, Wick MR. Neuroendocrine differentiation in basal cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Am J Dermatopathol*. 1989; 11:131–135.
132. Lupu M, Caruntu A, Caruntu C, Papagheorghe LML, Ilie MA, Voiculescu V, *et al*. Neuroendocrine factors: The missing link in non-melanoma skin cancer (Review). *Oncol Rep*. 2017 Sep; 38(3):1327-1340.
133. Kojima S, Chiyomaru T, Kawakami K, Yoshino H, Enokida H, Nohata N, Fuse M, Ichikawa T, Naya Y, Nakagawa M, Seki N. Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer. *Br J Cancer*. 2012 Jan 17; 106(2):405-413.
134. Davenne T, Rehwinkel J. PNP inhibitors selectively kill cancer cells lacking SAMHD1. *Mol Cell Oncol*. 2020 Sep 20; 7(6):1804308.
135. Hagens G, Masouyé I, Augsburg E, Hotz R, Saurat JH, Siegenthaler G. Calcium-binding protein S100A7 and epidermal-type fatty acid-binding protein are associated in the cytosol of human keratinocytes. *Biochem J*. 1999; 339, 419-427.
136. Brouard MC, Saurat JH, Ghanem G and Siegenthaler G. Urinary excretion of epidermal-type fatty acid-binding protein and S100A7 protein in patients with cutaneous melanoma. *Melanoma Res*. 2002; 12: 627-631.
137. Kawaguchi K, Kinameri A, Suzuki S, Senga S, Ke Y, Fujii H. The cancer-promoting gene fatty acid-binding protein 5 (FABP5) is epigenetically regulated during human prostate carcinogenesis. *The Biochemical Journal*. 2016; 473:449-461.
138. R.Z. Liu, K. Graham, D.D. Glubrecht, D.R. Germain, J.R. Mackey, R. Godbout, Association of FABP5 expression with poor survival in triple-negative breast cancer: implication for retinoic acid therapy, *The American journal of pathology*, 2011; 178:997-1008.
139. C.A. Powell, M.W. Nasser, H. Zhao, J.C. Wochna, X. Zhang, C. Shapiro, K. Shilo, R.K. Ganju, Fatty acid binding protein 5 promotes metastatic potential of triple negative breast cancer cells through enhancing epidermal growth factor receptor stability, *Oncotarget*, 2015; 6:6373-6385.
140. K. Kawaguchi, S. Senga, C. Kubota, Y. Kawamura, Y. Ke, H. Fujii, High expression of Fatty Acid-Binding Protein 5 promotes cell growth and metastatic potential of colorectal cancer cells, *FEBS open bio*, 2016; 6:190-199.
141. Chen R, Feng C, Xu Y. Cyclin-dependent kinase-associated protein Cks2 is associated with bladder cancer progression. *J Int Med Res*. 2011; 39:533–540.
142. Sinha P, Hutter G, Kottgen E, Dietel M, Schadendorf D, Lage H. Increased expression of epidermal fatty acid binding protein, cofilin, and 14-3-3-sigma (stratifin) detected by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry and microsequencing of drug-resistant human adenocarcinoma of the pancreas. *Electrophoresis*. 1999; 20:2952–2960.
143. Fang LY, Wong TY, Chiang WF, Chen YL. Fatty-acid-binding protein 5 promotes cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2010; 39:342–348.
144. Shogo Senga, Narumi Kobayashi, Koichiro Kawaguchi, Akira Ando, Hiroshi Fujii. Fatty acid-binding protein 5 (FABP5) promotes lipolysis of lipid droplets, de novo fatty acid (FA) synthesis and activation of nuclear factor-kappaB(NF-kB) signaling in cancer cells. *Bbamcb* (2018).
145. Senga S, Kawaguchi K, Kobayashi N, Ando A, Fujii H. A novel fatty acid-binding protein 5-estrogen-related receptor α signaling pathway promotes cell growth and energy metabolism in prostate cancer cells. *Oncotarget*. 2018 Aug 3; 9(60):31753-31770.

146. Ohata T, Yokoo H, Kamiyama T, et al. Fatty acid-binding protein 5 function in hepatocellular carcinoma through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Med.* 2017; 6(5):1049–1061.
147. Lu JB, Cai SH, Pan YH, Yun JP. Altered epidermal fatty acid-binding protein expression in hepatocellular carcinoma predicts unfavorable outcomes. *Cancer Manag Res.* 2018 Nov 23; 10:6275–6284.
148. 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; 72(2):93–102.
149. F.S. Forootan, S.S. Forootan, X. Gou, J. Yang, B. Liu, D. Chen, M.S. Al Fayi, W. Al-Jameel, P.S. Rudland, S.A. Hussain, Y. Ke, Fatty acid activated PPARgamma promotes tumorigenicity of prostate cancer cells by up regulating VEGF via PPAR responsive elements of the promoter, *Oncotarget*, 2016; 7:9322–9339.
150. E. Morgan, P. Kannan-Thulasiraman, N. Noy, Involvement of Fatty Acid Binding Protein 5 and PPARbeta/delta in Prostate Cancer Cell Growth. *PPAR research*, 2010.
151. Dellambra E, Patrone M, Sparatore B, Negri A, Cecilian F, Bondanza S, Molina F, Cancedda FD, De Luca M. Stratifin, a keratinocyte specific 14-3-3 protein, harbors a pleckstrin homology (PH) domain and enhances protein kinase C activity. *J Cell Sci.* 1995; 108 (Pt 11):3569–3579.
152. Herron BJ, Liddell RA, Parker A, Grant S, Kinne J, Fisher JK, Siracusa LD. A mutation in stratifin is responsible for the repeated epilation (Er) phenotype in mice. *Nat Genet.* 2005; 37: 1210–1212.
153. Katz AB, Taichman LB. A partial catalog of proteins secreted by epidermal keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol.* 1999 May; 112(5):818–821.
154. Shiba-Ishii A, Noguchi M. Aberrant stratifin overexpression is regulated by tumor-associated CpG demethylation in lung adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 2012; 180:1653–1662.
155. Shiba-Ishii A, Kano J, Morishita Y, Sato Y, Minami Y, Noguchi M. High expression of stratifin is a universal abnormality during the course of malignant progression of early-stage lung adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2011 Nov 15; 129(10):2445–2453.
156. Villaret DB, Wang T, Dillon D, Xu J, Sivam D, Cheever MA, Reed SG. Identification of genes overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma using a combination of complementary DNA subtraction and microarray analysis. *Laryngoscope.* 2000; 110:374–381.
157. Shimomura K, Sakakura C, Fujita Y, Nakanishi M, Hagiwara A, Yamagishi H. [Overexpression of 14-3-3 in primary gastric cancers and clinical application for the detection of micrometastases in the peritoneal cavity]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 2002; 103:386.
158. Friess H, Ding J, Kleeff J, Fenkell L, Rosinski JA, Guweidhi A, Reidhaar-Olson JF, Korc M, Hammer J, Buchler MW. Microarray-based identification of differentially expressed growth- and metastasis-associated genes in pancreatic cancer. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:1180–1199.
159. Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL, Berg K, Hollingsworth MA, Cameron JL, Yeo CJ, Kern SE, Goggins M, Hruban RH. Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: a comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Res.* 2003; 63: 8614–8622.
160. Logsdon CD, Simeone DM, Binkley C, Arumugam T, Greenson JK, Giordano TJ, Misek DE, Kuick R, Hanash S. Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2003; 63:2649–2657.
161. Umbricht CB, Evron E, Gabrielson E, Ferguson A, Marks J, Sukumar S. Hypermethylation of 14-3-3 sigma (stratifin) is an early event in breast cancer. *Oncogene.* 2001 Jun 7; 20(26):3348–3353.
162. Iwata N, Yamamoto H, Sasaki S, Itoh F, Suzuki H, Kikuchi T, Kaneto H, Iku S, Ozeki I, Karino Y, Satoh T, Toyota J, et al. Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000; 19:5298–5302.
163. Lodygin D, Diebold J, Hermeking H. Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3sigma expression. *Oncogene.* 2004; 23:9034–9041.
164. Suzuki H, Itoh F, Toyota M, Kikuchi T, Kakiuchi H, Imai K. Inactivation of the 14-3-3 sigma gene is associated with 50 CpG island hypermethylation in human cancers. *Cancer Res.* 2000; 60:4353–4357.
165. Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Xu B, Babkair H, Sumita Y, Cheng J, Yamamoto T, Saku T. Proteomic and histopathological characterization of the interface between oral squamous cell carcinoma invasion fronts and non-cancerous epithelia. *Exp Mol Pathol.* 2017; 102(2):327–336.
166. G. Tarcic, R. Avraham, G. Pines, I. Amit, T. Shay, Y. Lu, et al. EGR1 and the ERK-ERF axis drive mammary cell migration in response to EGF. *FASEB J.* 2011; 26:1582–1592.

167. Hu SC, Yu HS, Yen FL, Chen GS, Lan CC. CXCR7 expression correlates with tumor depth in cutaneous squamous cell carcinoma skin lesions and promotes tumor cell survival through ERK activation. *Exp Dermatol*. 2014 Dec; 23(12):902-908.
168. Aguayo RS, Rafel M, Santacana M, Fusté NP, Garí E. Erk1/2 activation in stromal fibroblasts from sporadic basal cell carcinomas. *Dermatol Surg*. 2015 Jun; 41(6):677-684.
169. Klobučar M, Sedić M, Gehrig P, Grossmann J, Bilić M, Kovač-Bilić L, Pavelić K, Kraljević Pavelić S. Basement membrane protein laminin-1 and the MIF-CD44-β1 integrin signaling axis are implicated in laryngeal cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(10):1938-1954.
170. Sundkvist A, Myte R, Bodén S, Enroth S, Gyllensten U, Harlid S, van Guelpen B. Targeted plasma proteomics identifies a novel, robust association between cornulin and Swedish moist snuff. *Sci Rep*. 2018; 8(1):2320.
171. Escribano D, Horvatić A, Contreras-Aguilar MD, Guillemin N, Cerón JJ, Tecles F, Martínez-Miró S, Eckersall PD, Manteca X, Mrljak V. Changes in saliva proteins in two conditions of compromised welfare in pigs: An experimental induced stress by nose snaring and lameness. *Res Vet Sci*. 2019; 125:227-234.
172. Contzler R, Favre B, Huber M, Hohl D. Cornulin, a new member of the "fused gene" family, is expressed during epidermal differentiation. *J Invest Dermatol*. 2005; 124: 990-997.
173. Xiao H, Langerman A, Zhang Y, et. al. Quantitative proteomic analysis of microdissected oral epithelium for cancer biomarker discovery. *Oral Oncol*. 2015; 51:1011-1019.
174. Neetha Santosh BDS, MS , Kristin K. McNamara DDS, MS , F. Michael Beck DDS, MA , John R. Kalmar DMD, PhD , Expression of Cornulin in Oral Premalignant Lesions, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* (2019), doi: <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2019.02.003>
175. Schaaij-Visser TB, Graveland AP, Gauci S, et. al. Differential Proteomics Identifies Protein Biomarkers That Predict Local Relapse of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2009; 15:7666-7675.
176. Li C, Xiao L, Jia J, Li F, Wang X, Duan Q, Jing H, Yang P, Chen C, Wang Q, Liu J, Shao Y, Wang N, Zheng Y. Cornulin Is Induced in Psoriasis Lesions and Promotes Keratinocyte Proliferation via Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathways. *J Invest Dermatol*. 2019; 139(1):71-80.

Annexes

Taula suplementària S1. Llista de proteïnes ribosomals incloses en l'anàlisi de lisi cel·lular.

Accession	Protein Name
P39023	60S ribosomal protein L3 OS=Homo sapiens GN=RPL3 PE=1 SV=2
P26373	60S ribosomal protein L13 OS=Homo sapiens GN=RPL13 PE=1 SV=4
P05388	60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens GN=RPLP0 PE=1 SV=1
P30050	60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens GN=RPL12 PE=1 SV=1
P08865	40S ribosomal protein SA OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=1 SV=4
P50914	60S ribosomal protein L14 OS=Homo sapiens GN=RPL14 PE=1 SV=4
P63220	40S ribosomal protein S21 OS=Homo sapiens GN=RPS21 PE=1 SV=1
P39019	40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens GN=RPS19 PE=1 SV=2
P62906	60S ribosomal protein L10a OS=Homo sapiens GN=RPL10A PE=1 SV=2
P61513	60S ribosomal protein L37a OS=Homo sapiens GN=RPL37A PE=1 SV=2
P46783	40S ribosomal protein S10 OS=Homo sapiens GN=RPS10 PE=1 SV=1
Q02878	60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens GN=RPL6 PE=1 SV=3
P42766	60S ribosomal protein L35 OS=Homo sapiens GN=RPL35 PE=1 SV=2
P60866	40S ribosomal protein S20 OS=Homo sapiens GN=RPS20 PE=1 SV=1
P49207	60S ribosomal protein L34 OS=Homo sapiens GN=RPL34 PE=1 SV=3
P62273	40S ribosomal protein S29 OS=Homo sapiens GN=RPS29 PE=1 SV=2
P62277	40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens GN=RPS13 PE=1 SV=2
Q9Y3U8	60S ribosomal protein L36 OS=Homo sapiens GN=RPL36 PE=1 SV=3
P62917	60S ribosomal protein L8 OS=Homo sapiens GN=RPL8 PE=1 SV=2
P62241	40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens GN=RPS8 PE=1 SV=2
P18077	60S ribosomal protein L35a OS=Homo sapiens GN=RPL35A PE=1 SV=2
P62847	40S ribosomal protein S24 OS=Homo sapiens GN=RPS24 PE=1 SV=1
P62979	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=2
P36578	60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens GN=RPL4 PE=1 SV=5
P05386	60S acidic ribosomal protein P1 OS=Homo sapiens GN=RPLP1 PE=1 SV=1
P62269	40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens GN=RPS18 PE=1 SV=3
P62753	40S ribosomal protein S6 OS=Homo sapiens GN=RPS6 PE=1 SV=1
P27635	60S ribosomal protein L10 OS=Homo sapiens GN=RPL10 PE=1 SV=4
P62841	40S ribosomal protein S15 OS=Homo sapiens GN=RPS15 PE=1 SV=2
P62829	60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens GN=RPL23 PE=1 SV=1
P84098	60S ribosomal protein L19 OS=Homo sapiens GN=RPL19 PE=1 SV=1
P62280	40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens GN=RPS11 PE=1 SV=3
Q02543	60S ribosomal protein L18a OS=Homo sapiens GN=RPL18A PE=1 SV=2
P42677	40S ribosomal protein S27 OS=Homo sapiens GN=RPS27 PE=1 SV=3
P40429	60S ribosomal protein L13a OS=Homo sapiens GN=RPL13A PE=1 SV=2
P62899	60S ribosomal protein L31 OS=Homo sapiens GN=RPL31 PE=1 SV=1
P61927	60S ribosomal protein L37 OS=Homo sapiens GN=RPL37 PE=1 SV=2
P32969	60S ribosomal protein L9 OS=Homo sapiens GN=RPL9 PE=1 SV=1
P46779	60S ribosomal protein L28 OS=Homo sapiens GN=RPL28 PE=1 SV=3
Q07020	60S ribosomal protein L18 OS=Homo sapiens GN=RPL18 PE=1 SV=2
P62861	40S ribosomal protein S30 OS=Homo sapiens GN=FAU PE=1 SV=1
P62081	40S ribosomal protein S7 OS=Homo sapiens GN=RPS7 PE=1 SV=1
P23396	40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens GN=RPS3 PE=1 SV=2
Q9BYN8	28S ribosomal protein S26, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPS26 PE=1 SV=1

P62913	60S ribosomal protein L11 OS=Homo sapiens GN=RPL11 PE=1 SV=2
P62266	40S ribosomal protein S23 OS=Homo sapiens GN=RPS23 PE=1 SV=3
P63173	60S ribosomal protein L38 OS=Homo sapiens GN=RPL38 PE=1 SV=2
P61353	60S ribosomal protein L27 OS=Homo sapiens GN=RPL27 PE=1 SV=2
P62424	60S ribosomal protein L7a OS=Homo sapiens GN=RPL7A PE=1 SV=2
P62888	60S ribosomal protein L30 OS=Homo sapiens GN=RPL30 PE=1 SV=2
P18621	60S ribosomal protein L17 OS=Homo sapiens GN=RPL17 PE=1 SV=3
P62910	60S ribosomal protein L32 OS=Homo sapiens GN=RPL32 PE=1 SV=2
P46778	60S ribosomal protein L21 OS=Homo sapiens GN=RPL21 PE=1 SV=2
P35268	60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens GN=RPL22 PE=1 SV=2
P46777	60S ribosomal protein L5 OS=Homo sapiens GN=RPL5 PE=1 SV=3
P62701	40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens GN=RPS4X PE=1 SV=2
P62263	40S ribosomal protein S14 OS=Homo sapiens GN=RPS14 PE=1 SV=3
P62851	40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens GN=RPS25 PE=1 SV=1
P83731	60S ribosomal protein L24 OS=Homo sapiens GN=RPL24 PE=1 SV=1
P62854	40S ribosomal protein S26 OS=Homo sapiens GN=RPS26 PE=1 SV=3
P15880	40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens GN=RPS2 PE=1 SV=2
P61247	40S ribosomal protein S3a OS=Homo sapiens GN=RPS3A PE=1 SV=2
P61254	60S ribosomal protein L26 OS=Homo sapiens GN=RPL26 PE=1 SV=1
P46782	40S ribosomal protein S5 OS=Homo sapiens GN=RPS5 PE=1 SV=4
P46781	40S ribosomal protein S9 OS=Homo sapiens GN=RPS9 PE=1 SV=3
P61313	60S ribosomal protein L15 OS=Homo sapiens GN=RPL15 PE=1 SV=2
P18124	60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens GN=RPL7 PE=1 SV=1
P62750	60S ribosomal protein L23a OS=Homo sapiens GN=RPL23A PE=1 SV=1
P25398	40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens GN=RPS12 PE=1 SV=3
P83881	60S ribosomal protein L36a OS=Homo sapiens GN=RPL36A PE=1 SV=2
P62244	40S ribosomal protein S15a OS=Homo sapiens GN=RPS15A PE=1 SV=2
P08708	40S ribosomal protein S17 OS=Homo sapiens GN=RPS17 PE=1 SV=2
P05387	60S acidic ribosomal protein P2 OS=Homo sapiens GN=RPLP2 PE=1 SV=1
P62249	40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens GN=RPS16 PE=1 SV=2
P62857	40S ribosomal protein S28 OS=Homo sapiens GN=RPS28 PE=1 SV=1
P46776	60S ribosomal protein L27a OS=Homo sapiens GN=RPL27A PE=1 SV=2
P47914	60S ribosomal protein L29 OS=Homo sapiens GN=RPL29 PE=1 SV=2
Q9HD33	39S ribosomal protein L47, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MRPL47 PE=1 SV=2



Risk factors for early-onset basal cell carcinomas and the trend towards their female predominance

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1111/ddg.14390>

Clara Matas-Nadal^{1,2,3},
 Marc Sagristà², Xavier
 Gómez-Arbonés⁴, Carmen
 Sobrino Bermejo³, Josep Manel
 Fernández-Armenteros^{1,3}, Joan
 Àngel Baldó^{1,3}, Josep Manel
 Casanova Seuma^{1,3,4}, Rafael
 Aguayo Ortiz^{1,3}

(1) IRB Lleida, Lleida, Catalunya, Spain

(2) Dermatology Department,
 Corporació de Salut de la Selva i el
 Maresme, Girona, Spain

(3) Dermatology Department, Hospital
 Universitari Arnau de Vilanova de
 Lleida, Lleida, Spain

(4) Departament de Medicina,
 Universitat de Lleida, Lleida, Spain

Summary

Background: A dramatic rise in the incidence rates of basal cell carcinoma (BCC) in young women has been reported.

Objectives: We investigate potential risk factors (RF) for sporadic BCC in young patients and the current distribution of such RF in the general population of Catalonia, comparing the differences among men and women.

Patients and Methods: A case-control study was performed, 69 BCCs diagnosed in patients ≤ 45 years of age vs. 69 healthy controls. Afterward, 1,078 participants from the general population completed an RF questionnaire.

Results: Repeated sunburns were more frequent in instances of early-onset BCC in covered skin than in sun-exposed skin ($P = 0.029$). In the general population, 39.1 % of participants reported sunbed use (50.1 % in women, 10.9 % in men). Sunbed use was the only relevant RF more predominant in women than men, favoring the trend to female predominance of BCCs above other RF. Additionally, we found a significant trend in young participants for reduced sunbed use ($P < 0.001$), although they had the same percentage of repeated sunburns. Repeated sunburns are the most relevant RF for early-onset BCCs that can be targeted in prevention campaigns.

Conclusions: We should be aware of the more relevant RF for early-onset BCCs and their distribution among the general population to address preventive campaigns.

Introduction

Basal cell carcinoma (BCC) is the most frequently diagnosed cancer in fair-skinned populations worldwide [1]. Its incidence is rising by almost 10 % each year [2]. Almost 70 % of sporadic BCCs hold alterations in the Hedgehog signaling pathway [3, 4]. Basal cell carcinoma was considered a tumor of elderly onset, occurring mainly in sun-exposed areas in males [5]. However, recent evidence suggests a dramatic rise in the incidence rates of BCC in younger women [6, 7]. Previous reports [8–10] pointed out significant risk factors among younger patients, such as smoking, a history of multiple blistering sunburns, and sunbed use. However, the female predominance of these tumors and their causes need to be thoroughly revised to better address preventive campaigns.

The aim of this work is to study these recent trends and clarify their causes. We describe the differences

(demographic, tumor localization, and histology) between young and older patients, from BCCs diagnosed in our sanitary region (Lleida, Catalonia) in the year 2017. Afterward, we investigate potential risk factors for sporadic BCC in younger patients with a case-control study. Finally, through an online questionnaire, we assessed the current distribution of such risk factors in the general population of the Mediterranean area of Catalonia (Spain), comparing the differences among men and women, to clarify the trend towards their female predominance.

Patients and Methods

This work was performed with the approval of the Ethics Committee for Scientific Research of HUAV-UdL (Hospital Universitari Arnau de Vilanova-University of Lleida).

BCC data collection

Data from pathology-proven BCCs newly diagnosed in 2017 was obtained from the dermatopathology register of our sanitary region and completed by reviewing medical records of the patients. Information including age, sex, Fitzpatrick skin type, eye and hair colors, year of BCC diagnosis, tumor characteristics (histopathological subtype, localization), personal history of other tumors, and personal diseases or treatments was collected.

Case-control study about risk factors in young patients

BCC cases from patients ≤ 45 years of age diagnosed during the 2013–2017 period were selected (the period was extended to five years to have enough young participants). Exclusion criteria for the cases included a history of radiotherapy, known genetic syndromes characterized by frequent BCCs and organ transplant recipients. Questionnaires were adapted from those used in other recent epidemiologic studies [8–11] to facilitate future data pooling. Telephone interviews were conducted to collect the following information: number of blistering sunburns, use of sunscreen, outdoor job (yes/no), daily hours working outdoors (0/2/4/6/8 hours), smoking history (yes/no), packs/day and years of smoking history, family history of skin cancer (yes/no) and type (if known), history of ever having performed indoor tanning (yes/no), number of tanning bed visits, and age at first exposure.

Controls, matched for age and gender, were selected from patients seeking medical advice in our dermatology department for other reasons not related to skin cancer (minor benign skin conditions as warts, cysts, few and benign melanocytic nevi etc.). Controls completed the same questionnaire as cases.

As we used all available cases from the 2013–2017 period, we did not perform a previous sample size calculation. However, with our final sample, we had a statistical power of 95 % for detection of a minimum difference of 30 % between cases and controls for the occurrence of ≥ 4 sunburns during childhood. Estimates were 55 % as the minimum percentage among cases and 25 % as the maximum percentage among controls.

Exposition to risk factors in the general population

An online questionnaire, containing the same queries from the case-control study, was shared on social media during September 2019, to be completed by as many people of any age from the general population of Catalonia. Data was collected through a Google Form®. Analyses were stratified by sex and age to unveil differences.

Statistical analysis

The anonymized databases were assimilated and analyzed with SPSS v20.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA). Categorical variables were described using absolute and relative frequencies. When dealing with continuous variables, mean and standard deviation (SD) were reported. Variables were analyzed using χ^2 -test, or Fisher's exact test, when the expected observations were < 5 , and One-Way ANOVA when appropriate. Analyses were stratified by sex and age. The calculated odds ratios (OR) and 95 % confidence intervals (CI) compared the occurrence of each risk factor in the presence or absence of BCC (case-control) using multivariate logistic regression. For those variables with 0 cases among some of their conditions, we arbitrarily assigned 1 case to the empty groups to calculate OR. In all analyses, the selected *P* value for considering differences as statistically significant was *P* < 0.05 .

Results

We identified 962 BCCs newly diagnosed in 774 patients in our sanitary region (Lleida, Catalonia) in 2017. The incidence of BCC was 194.2/100,000 inhabitants. Of the 774 patients, 337 (43.5 %) were women and 437 (56.5 %) were men. Overall, the incidence in women was lower (171.4/100,000) than in men (216.4/100,000). Considering only patients < 60 years of age, the incidence in women was higher than in men, 281.7 vs. 176.5/100,000, respectively. The median age at diagnosis was 78.0 years, and the mean age was 74.5 (SD 13.7), ranging from 18 to 99 years. Using 10-year periods for the "age at diagnosis" (1–10, 11–20, ..., 81–90, > 91 years), we found the group with the highest BCC count to be "81–90 years" (249 BCC), while the group with maximum incidence was " > 91 years" (1,414.5/100,000 inhabitants).

Regarding tumor localization, 76.2 % were on sun-exposed areas such as head and neck (20.5 % on the nose), 15.2 % on the trunk, 6.4 % on the extremities, 0.4 % on the hands, and 0.3 % in the genital area. Of the 338 BCCs with available histological data, 57.1 % (193) were nodular, 19.2 % (65) pigmented, 10.7 % (36) superficial, 7.4 % (25) ulcerated and 5.6 % (19) morpheaform. The low count of superficial BCCs is likely due to the high frequency of cases treated topically, which could lead to a reduced number of histological examinations and registrations.

From the cancer register of the same sanitary region and year (where BCC is not recorded) we know that the most frequent malignancy was colorectal cancer (329 cases), followed by breast cancer (241 cases), and prostatic cancer (197 cases). BCC alone occurred 2.92 times more often than the most frequent neoplasm registered in the same region.

Comparisons were done between BCC cases classified in two age groups, ≤ 45 or ≥ 75 years, excluding the middle

ages. Data from 689 BCCs were analyzed, 133 BCCs from patients < 45 years of age and 556 BCCs from patients > 75 years of age. The group of young patients had a mean age at diagnosis of 39.0 years (SD 4.6), ranging from 26 to 45, and women were more frequent (64 %). Only 59 % of their BCCs were on sun-exposed areas such as head and neck, and 37 % on the trunk. In contrast, in the group of older patients with a mean age at diagnosis of 84.1 years (SD 5.3), ranging from 75 to 99 years, men were more frequent (59 %). In this group, up to 81 % of the BCCs were on sun-exposed areas (head and neck), and only 8.1 % on the trunk. These differences (gender and localization of the tumor) were both statistically significant ($P < 0.001$). In terms of histopathological tumor subtypes, although nodular BCC was the most prevalent in both groups with 40.5 % among the young and 58.1 % among the older, superficial subtypes accounted for 32.5 % of the BCCs in the group “ ≤ 45 years” but only for 6.4 % of BCCs in the group “ ≥ 75 years” ($P < 0.05$).

Regarding the case-control study in young patients, 133 BCCs were diagnosed in 111 patients aged ≤ 45 years, between 2013–2017. Ten patients (9 %) had multiple BCCs. Of the 111 patients, three were not included in the study because of exclusion criteria (history of holocorporal irradiation, BCC over a nevus sebaceous of Jadassohn and organ transplant recipient). Among the 108 potentially eligible cases, 39 proved ineligible during the initial attempt at contact: they either had no telephone number or did not respond to three phone calls. Finally, 69 BCC patients were enrolled and interviewed, as were 69 controls (matched for age and gender).

Of the 138 participants (69 cases, 69 controls), 63.8 % were female and 36.2 % were male. Differences between cases and controls are summarized in Table 1 and Table S1 (online Supporting Information). Three risk factors (RF) for early-onset BCCs were identified as independent RF using multivariate analyses (Table 1, 5th column); Fitzpatrick skin type (using type IV as reference), family history of keratinocyte carcinoma (KC) and ≥ 4 blistering sunburns during childhood.

Regarding sunbed use, we found no differences on the issue of “ever having done indoor tanning (yes/no)”, with 32 cases vs. 33 controls reporting sunbed use. Split by gender, the percentages remain the same. In terms of the number of sessions (1–10, 11–25, ≥ 26 sessions), we also found no differences between cases and controls, neither for men nor for women. Regarding the “age at first use”, a trend (not statistically significant, $P = 0.12$) was revealed, with 10/15 participants who used it at or below the age of 20 years being cases. Analyzing indoor tanning by skin type showed that among cases, those who used sunbeds were more likely to have type I–II, whereas among controls they were more likely to have type IV (Figure 1).

We also compared BCCs in sun-exposed areas to those in covered areas in young patients. Sun-exposed areas

include the head, the neck, the cleavage for women, and the back of the hands. Covered areas include trunk and proximal parts of the extremities. No significant differences were found regarding sunbed use. The use of sunbeds among patients with sun-exposed BCCs was 46.2 % and among patients with covered BCCs 42.9 %. There were also no significant differences between outdoor jobs, with 23.7 % of the patients with sun-exposed BCCs and 37.1 % of the patients with covered BCCs working at least half of the time outdoors. Finally, repeated sunburns (≥ 4 times) were found in 60 % of individuals with BCCs in sun-exposed areas, and in up to 85.7 % of cases with BCCs in covered areas ($P = 0.029$).

Regarding the distribution of RF among the general population, the on-line RF questionnaire was completed by 1,078 participants, 28 % males and 72 % females. Half of them (51.6 %) were aged between 30–50 years. Only 26 participants reported a personal history of KC. The data collected is summarized in Table 2 and Table S2 (online Supporting Information). Up to 20 % of the men, but only 10 % of the women, worked at least half of the time outdoors. Overall, 39.1 % of the participants reported sunbed use (50.1 % of the women, 10.9 % of the men). The 10-year age groups where sunbed use was more popular were 40–49 years (59 % overall, 71.4 % in women and 21.5 % in men) and 50–59 years (51 % overall, 63.8 % in women and 14.3 % in men). The more frequent age at first sunbed use was between 20–29 years (58.1 %), with a mean age of 26.9 years (SD 7.7). Up to 8.2 % of the participants had used a sunbed before their twenties. Comparing age groups “ ≤ 45 years” and “ > 45 years”, the more frequent age at first use was “20–29 years” in both groups (81 % and 60.6 %, respectively). Overall, 61.6 % of the participants had used a sunbed for 1–10 sessions, 21 % for 11–25 sessions, and up to 17.3 % for ≥ 26 sessions.

To study behavior trends in the general population, we performed comparisons between the age groups “ ≤ 45 years” and “ > 45 years”. Significant differences were found for sunscreen use (9.9 % non-users in the “ ≤ 45 years” group and 15.6 % non-users in the “ > 45 years” group) ($P = 0.009$) and sunbed use (34.5 % users in the “ ≤ 45 years” group and 47.2 % in the “ > 45 years” group) ($P < 0.001$). No significant differences were found for repeated sunburns (reported by 11.7 % in the “ ≤ 45 years” group and 12.7 % in the “ > 45 years” group), or for outdoor jobs (12.8 % in the “ ≤ 45 years” group and 11.3 % in the “ > 45 years” group). The female percentage among both groups was almost equal (72.9 vs. 73.7 %).

Thus, we found a significant trend in young patients (≤ 45 years of age) for more sunscreen use, but the percentage of repeated sunburns during childhood remained similar. In our Mediterranean area, regular sunscreen use started to become the norm during the 1990s. We hypothesized that

Table 1 Comparison of clinical features between cases and controls, in young participants. Data from the case-control study.

Characteristic	Cases (n = 69) n (%)	Controls (n = 69) n (%)	Bivariate analysis p-value; OR (95 % CI)	Multivariate analysis p-value; adjusted OR (95 % CI)
Mean Age, years	39.1 (SD 4.5)	39.1 (SD 4.5)	<i>P</i> = 1.00	
Female	44 (63.8)	44 (63.8)	<i>P</i> = 1.00	
Fitzpatrick skin type			<i>P</i> < 0.0001	<i>P</i> = 0.004
I	8 (11.6)	0 (0.0)	58.0 (5.7–594.3)	24.4 (2.2–270.7)
II	40 (58.0)	18 (26.1)	16.1 (4.9–52.7)	9.2 (2.6–32.9)
III	17 (24.6)	22 (31.9)	5.6 (1.7–19.0)	4.8 (1.3–17.4)
IV	4 (5.8)	29 (42.0)	Reference category	Reference category
Repeated sunburns			<i>P</i> < 0.0001	<i>P</i> = 0.003
< 4	29 (42.0)	55 (80.0)	Reference category	Reference category
≥ 4	40 (58.0)	14 (20.0)	5.4 (2.5–11.6)	3.9 (1.6–9.4)
Indoor tanning use			<i>P</i> = 0.90	
Never/No	37 (53.6)	36 (52.2)		
Ever/Yes	32 (46.4)	33 (47.8)		
Tanning sessions			<i>P</i> = 0.63	
0	37 (53.6)	37 (53.6)		
1–10	23 (33.3)	19 (27.5)		
11–25	4 (5.8)	8 (11.6)		
≥26	5 (7.2)	5 (7.2)		
Age at initiation			<i>P</i> = 0.50	
< 20 years	4 (12.5)	1 (3.0)		
20–25 years	18 (56.2)	21 (63.6)		
≥ 26 years	10 (31.2)	11 (33.3)		
Outdoor job ≥ 4 hours/day			<i>P</i> = 0.002	<i>P</i> = 0.136
Yes	20 (29.0)	6 (8.7)	4.3 (1.6–11.5)	
No	49 (71.0)	63 (91.3)		
Personal history of KC			<i>P</i> = 0.01	
Yes	7 (10.1)	0 (0.0)		
No	62 (89.9)	69 (100.0)		
Family history of KC			<i>P</i> = 0.007	<i>P</i> = 0.042
Yes	18 (26.1)	6 (8.7)	3.7 (1.4–10.0)	3.4 (1.1–11.1)
No	51 (73.9)	63 (91.3)		
History of smoking			<i>P</i> = 0.027	<i>P</i> = 0.115
Yes	42 (60.9)	29 (42.0)	2.2 (1.1–4.2)	
No	27 (39.1)	40 (58.0)		

Abbr.: CI, confidence interval; KC, keratinocyte carcinoma

Numbers in italics indicate *P* < 0.05.

our cohort “≤ 45 years” had a large number of participants who had not benefitted from sunscreen in their early years (as those aged 30–45 years). We performed further statistical analyses comparing the cohort ≤ 30 years of age (who

theoretically benefitted from sunscreen use during their childhood) vs. those > 30 years of age. We found statistically significant differences among both groups regarding repeated sunburns during childhood (8.5 % of those ≤ 30 years of

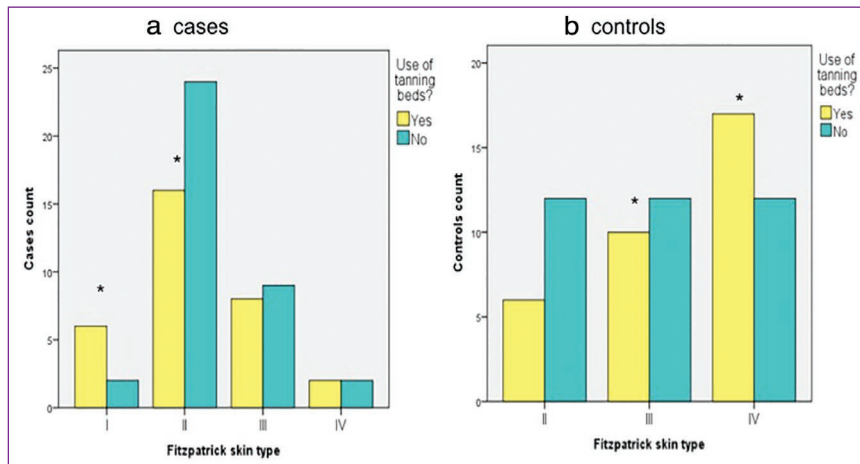


Figure 1 Sunbed use according to the Fitzpatrick skin type distribution between cases (a) and controls (b).

age vs. 13.2 % of those > 30 years of age, $P = 0.003$). This is positive reinforcement for the use of sunscreen to prevent sunburn in children and young people, who are at a highly sensitive age.

Discussion

Previous works have pointed out that histological subtypes of BCC may exhibit different behaviors and etiology [12–14]. Our data shows, consistent with previous studies [7–9], that early-onset BCCs are more prone to be located on the trunk and to be of a superficial subtype. This suggests, as previously described for melanoma [15], that the etiology of BCCs in older age groups is largely attributable to cumulative UV exposure in sun-exposed areas, while in younger age groups this is more because of intermittent UV exposure of covered areas, such as the trunk. Supporting this idea, we found a history of repeated sunburns to be more common in young patients with BCCs than in controls ($P < 0.001$), and to be more frequent for early-onset BCCs in covered areas than in exposed areas ($P = 0.029$).

A limitation of our case-control study was the 64 % response rate. Three phone calls were attempted before classifying a person as a non-responder. Some of the participants were enrolled after the first/second/third phone call and no differences were detected among them in terms of RF. Not recognizing the telephone number was the main reason why some participants did not answer the first phone call. This problem was related to the fact that some participants were reluctant to answer an unrecognized phone number, as these calls generally turn to be advertisements or scams. Therefore, we believe the low answering rate is not related to RF and does not affect the conclusions of the study. Moreover, medical records of the non-responders were reviewed to dismiss RF-related death and all patients were alive.

Age 45 was selected as the cutoff age for young people because BCC cases at 45 years of age or younger were predominantly diagnosed in women, whereas from this age onwards they were predominantly diagnosed in men, suggesting a different etiology in both groups. We found multiple significant RF for early-onset BCCs (Table 1), but, contrasting with earlier studies [8–10], indoor tanning was not one of them. We found no differences between cases and controls regarding sunbed use (yes/no) or the number of sessions. Despite this, among cases those who made use of indoor tanning were predominantly of skin type I–II while among controls the majority were of type III–IV (Figure 1), suggesting that within a population with a high frequency of sunbed use (overall use in women 50.1 % and men 10.9 %), the ones with fair skin are at higher risk of developing an early-onset BCC.

However, as previously reported by Zhang et al. [16] based on data from a large cohort of female nurses from the United States, sunbed use is associated with a higher risk of developing BCC (but not specifically at early ages) for all skin types and any tanning device (UVA, UVB). In our 2017 cohort, despite the fact that the overall incidence of BCC cases is higher in men than in women (as we report, men work outdoors twice as frequently as women, Table 2), for those below 60 years of age the incidence of BCC among women is almost doubled compared to men, 281.7 vs. 176.5/100,000, respectively. Our data supports earlier works performed worldwide [6, 7], although limited information was available on sunbed use in these populations to be contrasted for the same period [17, 18]. Sunbed use in our population is up to 50.1 % of all women and as many as 71.4 % of women aged 40–49 years. In contrast, only up to 10.9 % of all men and 21.5 % of men aged 40–49 used sunbeds. Moreover, we found that sunbed use is the only RF more predominant in women than in men (Table 2).

Thus, it seems that early exposure to tanning devices in fair-skinned people might increase the risk of developing

Table 2 Distribution of risk factors among the general population of Catalonia, and split by gender. Data from the online questionnaire.

Characteristic	General	Female	Male
Participants n (%)	1078 (100.0)	767 (72.2)	295 (27.8)
Mean age, years	41.1 (SD 13.4)	41.0 (SD 13.0)	40.8 (SD 13.7)
Fitzpatrick skin type n (%)			
I	21 (2.0)	18 (2.3)	3 (1.0)
II	191 (18.0)	133 (17.3)	57 (19.3)
III	418 (39.5)	304 (39.6)	114 (38.6)
IV	429 (40.5)	310 (40.4)	119 (40.3)
Repeated sunburns n (%)			
< 4	927 (87.3)	669 (87.2)	257 (87.5)
≥ 4	135 (12.7)	98 (12.8)	37 (12.5)
Use of sunblock n (%)			
No	124 (11.7)	57 (7.4)	67 (22.7)
Yes, SPF 30 or less	363 (34.3)	277 (36.1)	85 (28.8)
Yes, SPF 50 or more	573 (54.0)	432 (56.9)	141 (47.8)
Indoor tanning use n (%)			
Never/No	644 (60.9)	382 (50.1)	32 (10.9)
Ever/Yes	413 (39.1)	381 (49.9)	261 (89.1)
Tanning sessions n (%)			
Mean (SD)	19.4 (SD 32.7)	20.2 (SD 33.9)	10.9 (SD 10.9)
1–10	249 (61.6)	224 (60.5)	25 (73.5)
11–25	85 (21.0)	79 (21.4)	6 (17.6)
≥ 26	70 (17.3)	67 (18.1)	3 (8.8)
Age at initiation n (%)			
< 20 years	34 (8.2)	32 (8.4)	2 (5.9)
20–29 years	240 (58.1)	225 (59.4)	15 (44.1)
≥ 30 years	139 (33.7)	122 (32.2)	17 (50.0)
Mean age at initiation, years	26.9 (SD 7.7)	26.8 (SD 7.5)	29.3 (SD 8.6)
Outdoor job ≥4 hours/day n (%)			
Yes	130 (12.3)	70 (9.2)	60 (20.5)
No	927 (87.7)	693 (90.8)	233 (79.5)
History of smoking n (%)			
Yes	488 (46.1)	342 (44.8)	145 (49.5)
No	570 (53.9)	422 (55.2)	148 (50.5)
Mean years of smoking	15.5 (SD 9.7)	15.2 (SD 9.5)	16.3 (SD 10.3)

Abbr.: KC, keratinocyte carcinoma; MM, malignant melanoma; SPF, sun protection factor

early-onset BCC, and with enough lag time, may lead to a higher long-term BCC risk for any skin type, trending to change the classical male predominance of BCCs over female. Supporting this idea, a recently published work [19] on the Icelandic population, describes for the first time a higher BCC incidence among women than men, explained mainly by the increasing use of tanning devices among women. BCC

incidence among the Icelandic population is lower than in Mediterranean areas, due to the lower UV-index. Therefore, it is expected that the effects of sunbed use manifest clearly and earlier.

Recently, the prevalence of sunbed use from 30 European countries has been reported [20]. An overall prevalence of 10.6 % was found, with 19.3 % in Spain, which is lower

than the 39.1 % overall prevalence in our study. This could be partially explained by the fact that 65.2 % of their participants were female, compared to 72 % in ours. The presence of selection bias in their study, where participants were recruited from a skin cancer screening campaign, might also contribute to this difference. This could mean that actual sunbed use might be even higher than previously reported.

Ultraviolet (UV) phototherapy plays a fundamental role in the treatment of several dermatologic diseases. Previously reported data about a hypothetical relationship between these treatments and KC was inconsistent. Raoene et al. [21] reported a higher risk of KC among their patients, especially superficial BCCs and KC on the trunk, because of the whole-body intermittent exposition to phototherapy. Based on the results of that study and our own findings, we suggest that UV phototherapy should be limited for patients at high risk of developing KC, for young patients (< 20 years) with fair skin (type I–II) and a personal/family history of skin cancer [22].

To our knowledge, this is the first report to describe the incidence of BCC in the general population (and the differences among young and older patients), the RF in young patients, and the exposition to RF in the general population, with a comparison of men and women, assessed at the same time and within the same population. Thus, all the data can be readily compared, allowing a more reliable disclosure of the reasons for the recent changes observed in BCCs. Because of the increasing incidence of BCC, it is important to know the causes for the changing female predominance of these tumors, the more relevant RF driving early-onset BCCs, and the distribution of such RF in the population, in order to address preventive campaigns. These data have public health relevance for future interventions aimed at reducing the impact of BCCs on the health of patients.

Conflict of interest

None.

Correspondence to

Clara Matas-Nadal, MD
Dermatology Department
Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida
Avda. Alcalde Rovira Roure 80
25198 Lleida, Spain
E-mail: clamanadal@gmail.com

References

- 1 Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2012; 166: 1069–80.
- 2 Bath-Hextall F, Leonardi-Bee J, Smith C et al. Trends in incidence of skin basal cell carcinoma. Additional evidence from a UK primary care data base study. *Int J Cancer* 2007; 121: 2105–8.
- 3 Aguayo RS, Rafel M, Santacana M et al. β -Catenin and cyclin D1 expression in Gli1-independent basal cell carcinomas. *Eur J Dermatol* 2013; 23: 734–6.
- 4 Aguayo RS, Rafel M, Santacana M et al. Erk1/2 activation in stromal fibroblasts from sporadic basal cell carcinomas. *Dermatol Surg* 2015; 41: 677–84.
- 5 Nehal KS, Bichakjian CK. Update on keratinocyte carcinomas. *N Engl J Med* 2018; 379: 363–74.
- 6 Birch-Johansen F, Jensen A, Mortensen L et al. Trends in the incidence of nonmelanoma skin cancer in Denmark 1978–2007: rapid incidence increase among young Danish women. *Int J Cancer* 2010; 127: 2190–8.
- 7 Christenson LJ, Borrowman TA, Vachon CM et al. Incidence of basal cell and squamous cell carcinomas in a population younger than 40 years. *JAMA Dermatol* 2005; 294: 681–90.
- 8 Karagas MR, Zens MS, Li Z et al. Early-onset basal cell carcinoma and indoor tanning: a population-based study. *Pediatrics* 2014; 134: e4–e12.
- 9 Nemer KM, Bauman TM, Boyd AS. Risk factors for basal cell carcinoma in men younger than 40 years: a case-control study. *Dermatol Surg* 2018; 0: 1–6.
- 10 Ferrucci LM, Cartmel B, Molinaro AM et al. Indoor tanning and risk of early-onset basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2012; 67: 552–62.
- 11 Bakos RM, Kriz M, Muhlstadt M et al. Risk factors for early-onset basal cell carcinoma in a German institution. *Eur J Dermatol* 2011; 21: 705–9.
- 12 Yu M, Zloty D, Cowan B et al. Superficial, nodular, and morpheaform basal-cell carcinomas exhibit distinct gene expression profiles. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1797–805.
- 13 Scrivener Y, Grosshans E, Cribier B. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br J Dermatol* 2002; 147: 41–7.
- 14 de Vries E, Louwman M, Bastiaens M et al. Rapid and continuous increases in incidence rates of basal cell carcinoma in the southeast Netherlands since 1973. *J Invest Dermatol* 2004; 123: 634–8.
- 15 Matas-Nadal C, Malveyh J, Ferreres JR et al. Increasing incidence of lentigo maligna and lentigo maligna melanoma in Catalonia. *Int J Dermatol* 2019; 58: 577–81.
- 16 Zhang M, Qureshi AA, Geller AC et al. Use of tanning beds and incidence of skin cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30: 1588–93.
- 17 Choi K, Lazovich D, Southwell B et al. Prevalence and characteristics of indoor tanning use among men and women in the United States. *Arch Dermatol* 2010; 146: 1356–61.
- 18 Demko CA, Borawski EA, Debanne SM et al. Use of indoor tanning facilities by white adolescents in the United States. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2003; 157: 854–60.
- 19 Adalsteinsson JA, Ratner D, Olafsdóttir E et al. Basal cell carcinoma: an emerging epidemic in women in Iceland [published online ahead of print, 2020 Feb 7]. *Br J Dermatol*. 2020;10.1111/bjd.18937.

- 20 Suppa M, Gandini S, Njimi H et al. Prevalence and determinants of sunbed use in thirty European countries: data from the Euromelanoma skin cancer prevention campaign. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2019; 33 (Suppl 2): 13–27.
- 21 Raone B, Patrizi A, Gurioli C et al. Cutaneous carcinogenic risk evaluation in 375 patients treated with narrowband-UVB phototherapy: A 15-year experience from our Institute. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2018; 34: 302–6.
- 22 Wei EX, Li X, Nan H. Having a first-degree relative with melanoma increases lifetime risk of melanoma, squamous cell carcinoma, and basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 2019; 81: 489–99.

Evaluation of Tumor Interstitial Fluid-Extraction Methods for Proteome Analysis: Comparison of Biopsy Elution versus Centrifugation

Clara Matas-Nadal,^{*,¶} Joan Josep Bech-Serra,[¶] Marta Guasch-Vallés,
Josep Manel Fernández-Armenteros, Carla Barceló, Josep Manel Casanova,
Carolina de la Torre Gómez,[#] Rafael Aguayo Ortiz,[#] and Eloi Garí[#]

Cite This: *J. Proteome Res.* 2020, 19, 2598–2605

Read Online

ACCESS |

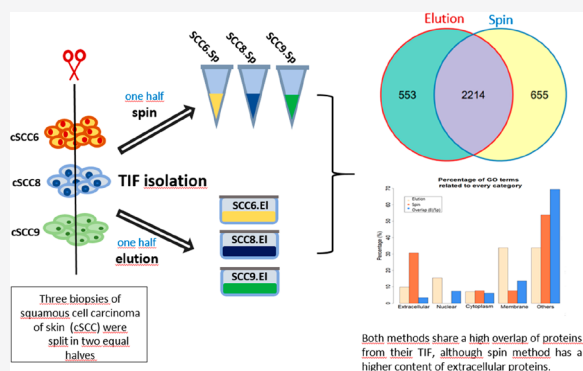
Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: The analysis of tumor interstitial fluid (TIF) composition is a valuable procedure to identify antimetastatic targets, and different laboratories have set up techniques for TIF isolation and proteomic analyses. However, those methods had never been compared in samples from the same tumor and patient. In this work, we compared the two most used methods, elution and centrifugation, in pieces of the same biopsy samples of cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC). First, we established that high G-force (10 000g) was required to obtain TIF from cSCC by centrifugation. Second, we compared the centrifugation method with the elution method in pieces of three different cSCC tumors. We found that the mean protein intensities based in the number of peptide spectrum matches was significantly higher in the centrifuged samples than in the eluted samples. Regarding the robustness of the methods, we observed higher overlapping between both methods (77–80%) than among samples (50%). These results suggest that there exists an elevated consistence of TIF composition independently of the method used. However, we observed a 3-fold increase of extracellular proteins in nonoverlapped proteome obtained by centrifugation. We therefore conclude that centrifugation is the method of choice to study the proteome of TIF from cutaneous biopsies.

KEYWORDS: tumor interstitial fluid, proteome, centrifugation, spin, elution, cutaneous squamous cell carcinoma, skin cancer



INTRODUCTION

Tumor–host interface signals are key elements to explain the induction and development of metastasis.¹ It seems clear that tumor-bearing extracellular signals are involved in most of metastatic steps such as stroma invasion and premetastatic niche preparation. This metastatic signaling is mediated by cancer-secreted metabolites and proteins. The secretome of a cell encompasses all the components secreted by this cell including metabolites, proteins, and exosome vesicles. The cancerous secretome can be obtained from the tumor interstitial fluid (TIF). This fluid bathes the tumor and stroma cells and represents the tumor milieu.² Therefore, the proteomic study of TIF is an approach of special interest that could reveal key molecules involved in the infiltrative or metastatic capacity of the neoplasia and could have potential consequences for developing biomarkers or therapeutic targets.^{3,4}

Proteomic analyses are well established methodologies for studies of molecular oncology.⁵ However, these methods require a considerable effort to set up every step of the

workflow in order to minimize preanalytical and analytical variability. The main goal is to perform reproducible experiments and to obtain reliable lists of protein candidates. The initial step in the workflow is the sample preparation. Definitely, the quality of the starting material is a major prerequisite for the final-result value. In addition, it is important to consider that sample preparation is not automated in most of the experiments.⁶ Then, this step is one of the main sources of experimental variability.⁷

Different techniques have been used for TIF isolation and proteomic analysis in different tumors.³ This is because the choice of the right method for TIF isolation is not easy, since it depends on many variables.⁸ For instance, it is important to consider such diverse issues as the analytical purpose of the

Special Issue: Methods for Omics Research

Received: November 14, 2019

Published: December 26, 2019

experiment, the amount of cell breakage, or the volume recovered. Lacking a generally accepted method for TIF sampling, in this work, we have assayed the two most used methods of TIF isolation, elution, and centrifugation, in the same biopsies of cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC). This cancer is the second most common nonmelanoma skin cancer and the second most common tumor in humans, and no proteomic study on its TIF has been conducted to date.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Samples

The study was conducted following the basic principles (respect for the individual), operational (risk-benefit), and guidelines (good clinical practice) of the Declaration of Helsinki (World Medical Association, 1964). The samples came from diagnostic tissue surplus and were collected after obtaining the written informed consent of the patient and with the approval of the Ethics Committee for Scientific Research (CEIC) of HUAV-UdL. The samples were managed by the Biobank of IRB Lleida authorized by the Department of Health of Catalonia dated 29 April 2013 and registered in the National Register of Biobanks of the Carlos III Institute of Health with B.0000682 reference number. The Biobank guarantees the conditions of traceability, quality, and safety of the samples with the proper controls.

Three surplus biopsies of cSCC from patients were obtained after surgical resection and extensively washed with a sterile dressing to eliminate blood clots. The tumor samples were from the tumor surface, in an area without any apparent necrosis or inflammation. Immediately, the tissue was collected with sterile forceps and put on a plate (6-well) with 1 mL of PBS. The forceps was used to gently shake the tissue in the PBS and the washing was repeated three times. The tissue was cut into two equal halves in volume and tissue characteristics.

Elution Method

For large biopsies (>0.2 g), the tissue was carefully cut into small pieces (0.1 g) avoiding as long as possible cell damage with minimum manipulation. The cutting of tissue was done while keeping it in a plate full of PBS, in order to avoid TIF evaporation. Then, the tissue was eluted in 750 μL of PBS containing protease and phosphatase inhibitors (PBSi) for 2 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ and 5% CO_2 . Finally, 500 μL of PBSi was collected and filtered (0.45 μm) to avoid cell contamination. The final sample was stored at -80°C until the proteomic analysis. The cocktail of protease and phosphatase inhibitors (cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail) was purchased at Roche.

Centrifugation Method

By this method, the biopsy was blotted gently with tissue paper to remove excess PBS and transferred to 2 mL centrifuge tubes (Sterile ClearLine, ref 007859ACL). These two steps were quickly carried out to avoid evaporation from the tissue. Immediately, the samples were centrifuged at 10 000g for 20 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf, 5415R), recovering 5–15 μL accumulated in the bottom of the tube. PBSi was added for a final volume of 50 μL . This final sample was stored at -80°C until the proteomic analysis.

Electrophoresis

TIF proteins from each method were separated on a 10% SDS-PAGE gel. To visualize protein bands, the gel was stained with

Coomassie Blue reagent. The protein profile of the samples was obtained with the plot profile of ImageJ program.

Proteomic Analysis of the Samples

Protein Extraction, Quantification, and Digestion.

The TIFs were mixed with 6 M urea/200 mM ammonium bicarbonate (ABC) to help the proteins solubilize, and then quantified with the RCDC Protein Assay kit (Biorad, #5000-120). Ten micrograms of protein from each sample were digested in solution using both LysC and Trypsin. Briefly, the samples were reduced with 10 mM dithiothreitol (DTT, in 200 mM ABC) for 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ and 650 rpm in the thermo-mixer, and then alkylated with 20 mM iodoacetamide (IAA, in 200 mM ABC) for 30 min at room temperature in the dark at 650 rpm in the thermo-mixer. Then, samples were diluted to 2 M urea final concentration, and the required amount of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ LysC (WAKO, #125-05061) was added to have a 1:10 ratio enzyme/protein (w/w). The digestion was performed overnight at 37 $^{\circ}\text{C}$ at 650 rpm in the thermo-mixer. After that, samples were diluted again to 1 M urea final concentration. Finally, the required amount of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ trypsin (sequencing-grade, Promega, #V5280) was added to have a 1:10 ratio enzyme/protein (w/w), and the mixture was incubated for 8 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ at 650 rpm in the thermo-mixer.

Peptide Desalting. Peptide mixtures were desalted using the commercial columns Ultra Microspin C18, 300A silica (The Nest Group, #SUM SS18 V) according to the manufacturer instructions. Finally, the samples were dried in a SpeedVac and kept at -20°C until the LC-MS/MS analysis.

LC-MS/MS Analysis. The peptides were resuspended in 45 μL of 3% acetonitrile/1% formic acid, and 4.5 μL (2 μg) was injected into the Orbitrap Fusion Lumos mass spectrometer. The sample was loaded to 300 $\mu\text{m} \times 5$ mm C18 PepMap100, 5 mm, 100 \AA (Thermo Scientific) at a flow rate of 15 $\mu\text{L}/\text{min}$ using a Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 chromatographic system (Thermo Scientific). Peptides were separated using a C18 analytical column (nanoEaseTM M/Z HSS C18 T3 (75 $\mu\text{m} \times 25$ cm, 100 \AA , Waters) with a 180 min run, comprising three consecutive steps with linear gradients from 3% to 35% B in 150 min, from 35% to 50% B in 5 min, and from 50% to 85% B in 2 min, followed by isocratic elution at 85% B in 5 min and stabilization to initial conditions (A = 0.1% FA in water, B = 0.1% FA in CH_3CN) at 250 nL/min flow rate. The column outlets were directly connected to an Advion TriVersa NanoMate (Advion) fitted on an Orbitrap Fusion Lumos Tribrid mass spectrometer (Thermo). The mass spectrometer was operated in a data-dependent acquisition (DDA) mode. Survey MS scans were acquired in the orbitrap with the resolution (defined at 200 m/z) set to 120 000. The lock mass was user-defined at 445.12 m/z in each Orbitrap scan. The top speed (most intense) ions per scan were fragmented by CID. The MS/MS was detected in the ion trap (with max injection time of 35 ms). The ion count target value was 400 000 for the survey scan and 10 000 (CID) for the MS/MS scan. Target ions already selected for MS/MS were dynamically excluded for 15 s. Spray voltage in the NanoMate source was set to 1.70 kV. The RF lens was tuned to 30%. The minimal signal required to trigger MS to MS/MS switch was set to 5000 and activation Q was 0.250. The spectrometer was working in positive polarity mode, and singly charge state precursors were rejected for fragmentation. All data were acquired with Xcalibur software v4.0.27.10.

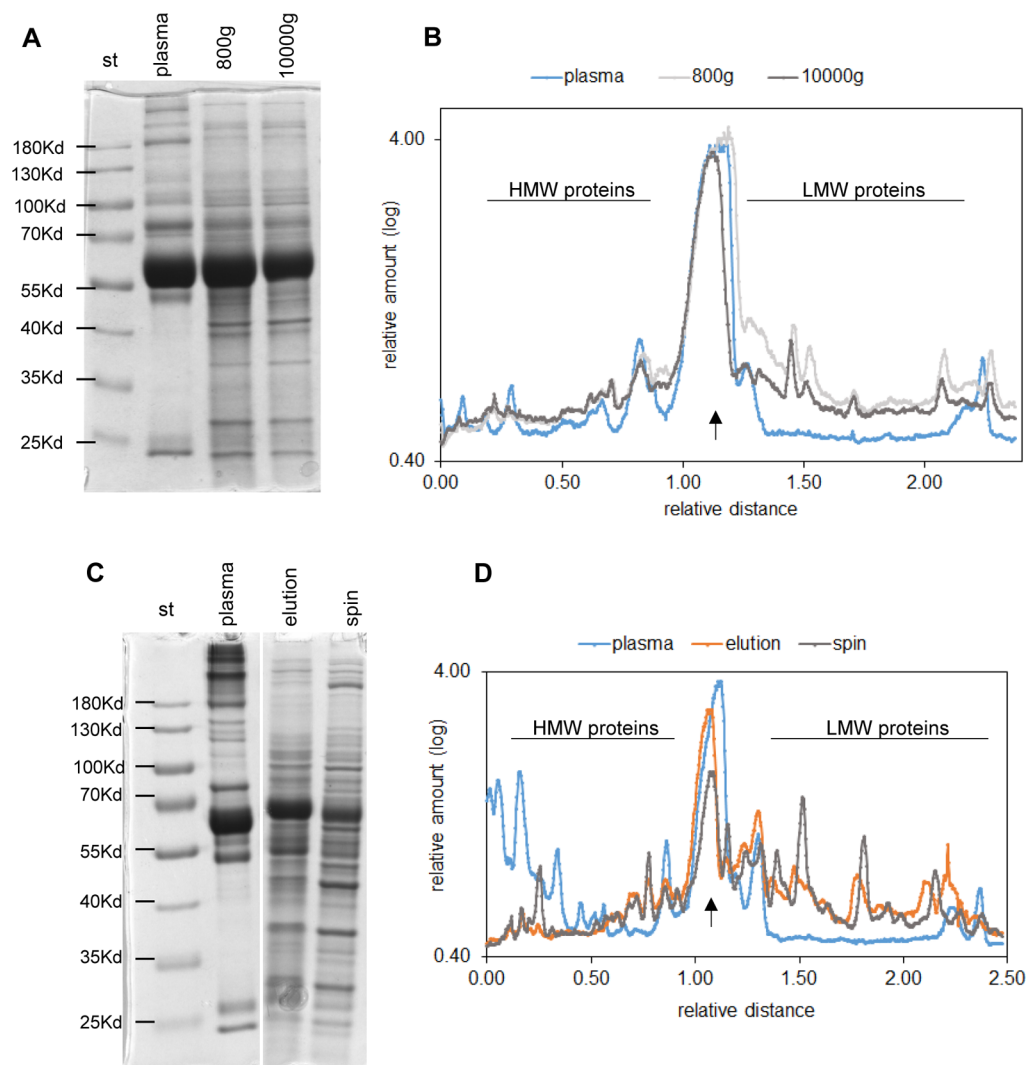


Figure 1. Sample processing. (A) TIF samples of the same biopsy SCC19 obtained by spin at 800g (5 μ L) and at 10 000g (2.5 μ L) were analyzed by SDS-PAGE in 10% polyacrylamide gel. Picture of the gel stained with Coomassie Blue. (B) Protein profile obtained from A with the ImageJ program. (C) TIF samples of the same biopsy SCC6 obtained by elution (7.5 μ L) and by spin (5 μ L) were analyzed by SDS-PAGE in 10% polyacrylamide gel. Picture of the gel stained with Coomassie Blue. (D) Protein profile obtained from C with the ImageJ program. A molecular weight standard (st) and plasma were also loaded in the gel as controls. High and low molecular weight regions are indicated as HMW and LMW, respectively. Arrow indicates albumin peak position.

Proteomic Data Analysis

Raw Data Processing and Database Search. Proteome Discoverer software suite (v2.0, Thermo Fisher Scientific) and the Mascot search engine (v2.5, Matrix Science) were used for peptide identification and quantification. Samples were searched against a SwissProt database containing entries corresponding to Human (version of March 2018), a list of common contaminants and all the corresponding decoy entries. Trypsin was chosen as enzyme and a maximum of three miscleavages were allowed. Carbamidomethylation (C) was set as a fixed modification, whereas oxidation (M) and acetylation (N-terminal) were used as variable modifications. Searches were performed using a peptide tolerance of 7 ppm and a product ion tolerance of 0.5 Da. Resulting data files were filtered for FDR < 1%. Alternatively, the data analysis of the samples described in the Supporting Information was performed with the MaxQuant software (version 1.6.7.0) searching in the human Swissprot database (Oct, 2019 version). The final list of peptides was obtained after applying

a 1% false discovery rate (FDR). For proteins, only the proteins with at least one assigned peptide after applying a 1% FDR were considered. The nonunique peptides were assigned to the corresponding protein group according to the Razor peptides rule implemented in the software (principle of parsimony). Only two missed cleavages were allowed and the carbamidomethylation in cysteines was set as fixed modification while methionine oxidation and Protein N-terminal acetylation were set as variable modifications. The option “match between runs” was also enabled. Finally, the identified peptides and proteins were filtered to remove the peptides/proteins tagged as “Reverse” (significantly identified in the reverse database), “potential contaminant” (items identified as contaminants in the “contaminants.fasta” file) and “Only identified by site” (proteins identified only with modified peptides). The raw data as well as the processed files were uploaded to the PRIDE repository with the project accession code PXD016261.

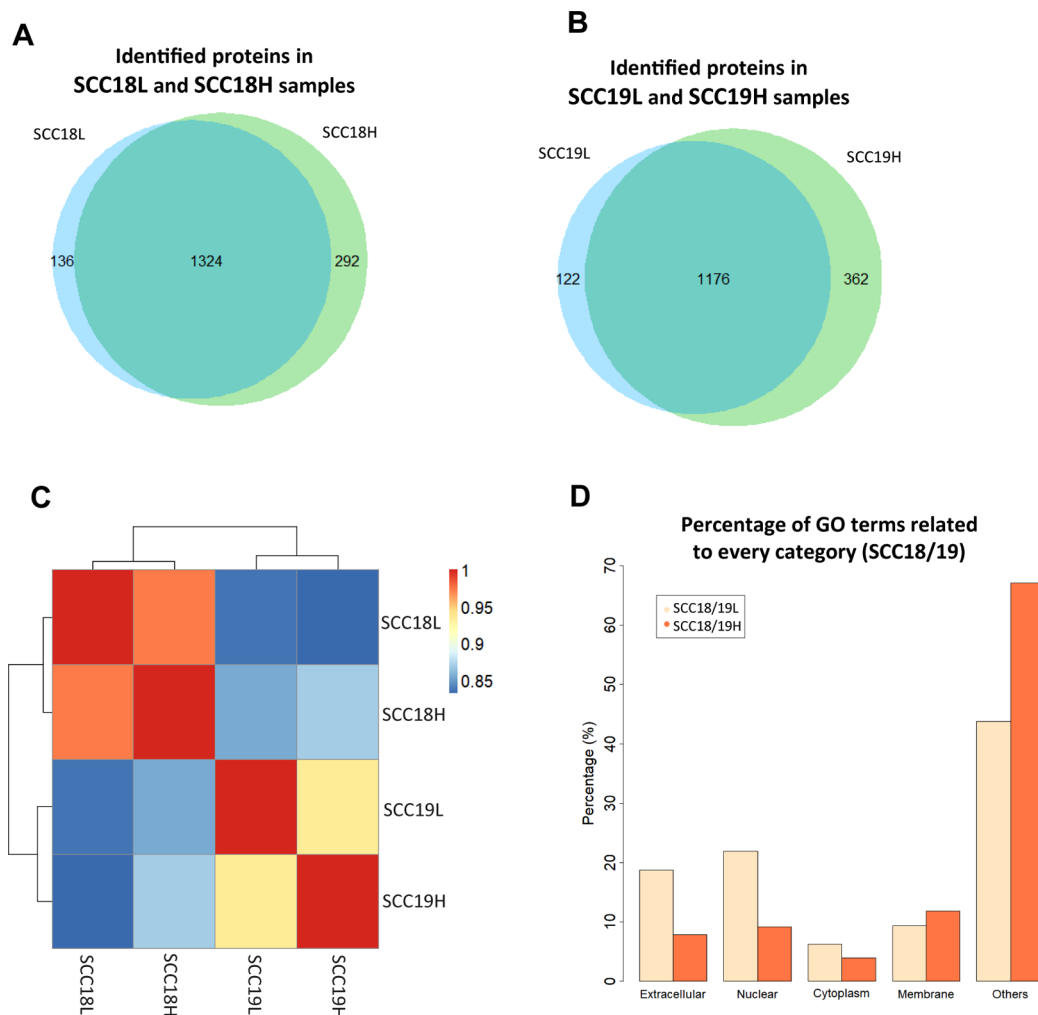


Figure 2. Characteristics of TIF samples obtained by centrifugation. (A and B) Venn diagrams representing the overlap among the TIF proteins detected by centrifugation at 800g (L) and at 10 000g (H). The numbers indicate identified proteins. (C) Heat map of Pearson correlation coefficients comparing tumor samples and methods. (D) Percentage distribution of GO terms related to subcellular categories. The graphic compares the nonoverlapping proteins obtained by centrifugation at 800g (L) and at 10 000g (H).

Bioinformatic Analysis. The handling of the protein lists created with both Proteome Discoverer and MaxQuant as well as the generation of the Venn diagrams and bar plots were performed with R (3.5.2) and R Studio (1.1.419) with the help of the “Vennerable” package. The vesiclepedia analysis was performed with the proteins identified both in the elution (2767) and spin (2869) methods. For this purpose, the database was downloaded (November, 2019 version) and interrogated for the proteins described above.

Gene Ontology Enrichment Analysis. The Gene Ontology enrichment analysis was performed with the DAVID Bioinformatics tools⁹ (<https://david.ncicfcrf.gov/>) using the “Functional Annotation” functionality. For this analysis, all the levels of specificity of the “Cellular Compartment” Ontology were selected (GOTERM_CC_ALL) and the “Functional Annotation Clustering” option was chosen for the visualization of the results. The enrichment threshold or statistical significance (EASE score) was set to 0.001. The enriched GO terms related to the different cell compartments were extracted using R (3.5.2) and R Studio (1.1.419).

RESULTS AND DISCUSSION

TIF Sample Processing by Centrifugation

The amount of tissue is typically limited for the surplus biopsies of cSCC (0.1–0.3 g). In this work, we split each tumor sample into two halves of about 0.1 g and used each one in a different procedure of TIF extraction. First, we set up the centrifugation method.^{10,11} Key steps in this method were centrifugation parameters such as G-forces and time of centrifugation. Excessive G-forces and time could cause the rupture of cells and hence the contamination of interstitial fluid with intracellular proteins. Certainly, these parameters had to be considered taking into account the particular characteristics of each tissue. In our hands, we needed high G-forces to obtain TIF from cSCC samples. Below 800g, the volume recovered was always less than 1 μ L. At 800g for 20 min, the volume of the sample was less than 5 μ L depending on the sample size. We got satisfactory volumes in all samples (5 to 15 μ L) after spinning at 10 000g for 20 min. All the samples were diluted with PBS containing protease inhibitors (iPBS) to a final volume of 50 μ L with a protein concentration ranging from 5 to 30 mg/mL.

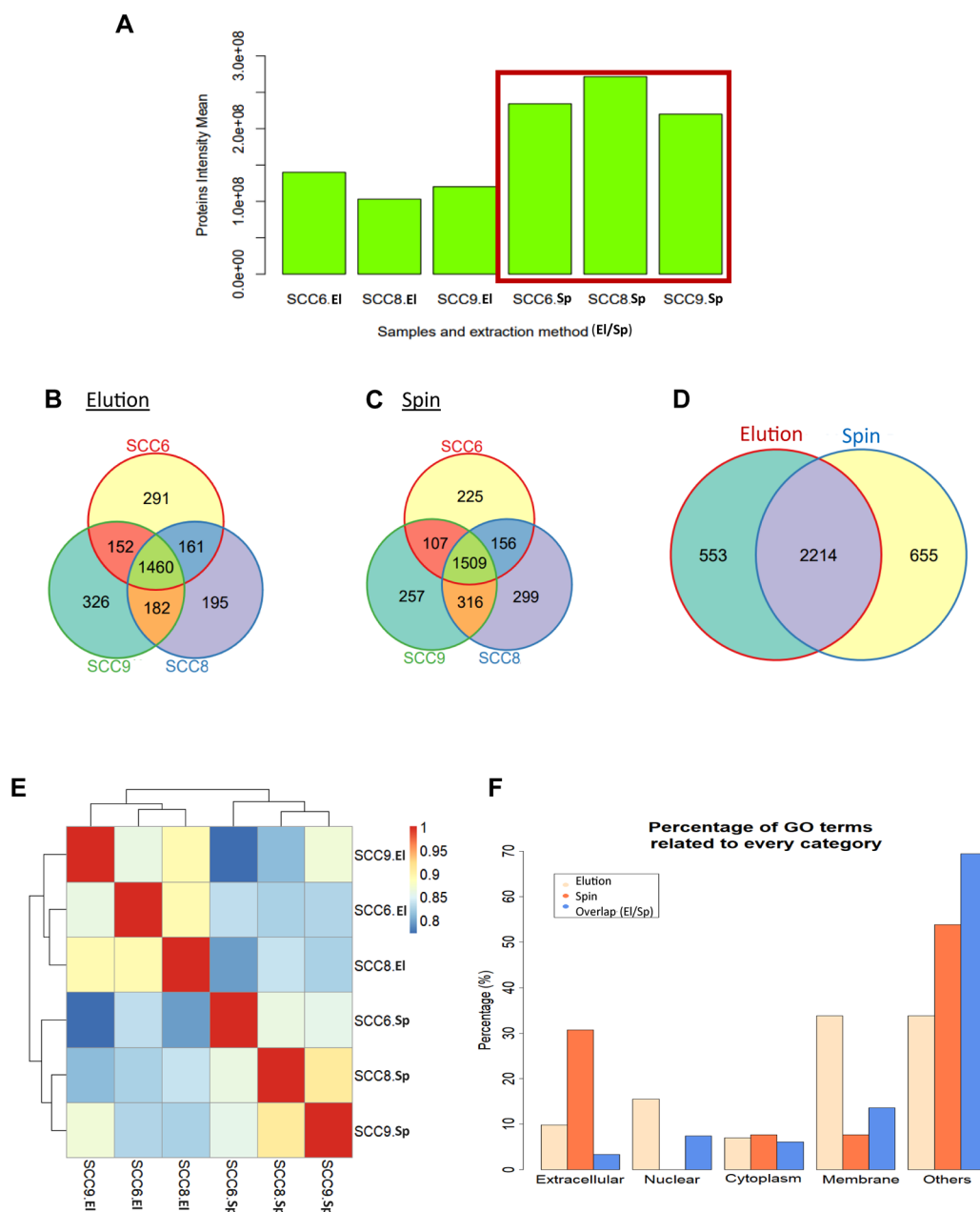


Figure 3. Comparison of the secretome obtained by elution and spin. (A) Graphic representing the proteins intensity mean in each sample for both methods, elution (EI) and spin (Sp). (B and C) Venn diagram representing the overlapping in the proteome of tumor samples obtained by elution (B) and spin (C). (D) Venn diagrams representing the overlap among the TIF proteins detected by elution and by spin. The numbers indicate identified proteins. (E) Heat map of Pearson correlation coefficients comparing tumor samples and methods. (F) Percentage distribution of GO terms related to subcellular categories. The graphic compares the nonoverlapping proteins obtained by elution and by centrifugation.

We compared the protein profiles obtained at 800g and 10 000g from one tumor sample (SCC19). Both procedures showed similar profiles enriched in low molecular weight proteins when compared to plasma (Figure 1A,B). To visualize the influence of G-force on proteome composition, two tumor samples (SCC18 and SCC19) each of them centrifuged at low and high revolutions (four samples in total) were analyzed by mass spectrometry. The Venn diagrams show the overlap of the identified proteins from the two spin conditions (Figure 2A,B). Of the proteins identified, 90% of those found at 800g were also found at 10 000g indicating that high G-force did not imply a loss of information. To analyze the variability among methods and samples, we calculated the Pearson correlation

coefficient (PCC) of the mass spectrometry results. The heat map of PCC showed that the secretomes of different samples had a larger variation than the ones from distinct centrifugation conditions (Figure 2C), meaning that the biological variability clearly exceeded the technical variability.

Finally, we considered the risk of cell breakage in the 10 000g samples. In the samples SCC18 and SCC19, there were 136 and 122 proteins only identified at 800g, whereas at 10 000g there were 292 and 362 not overlapped proteins, respectively (Figure 2A,B). We determined the percentage of GO terms related to subcellular localization of those noncommon proteins (Figure 2D). We did not detect any significant bias at the level of nuclear and membrane proteins

in the samples obtained at 10 000g that would have pointed toward an increased cell breakage at higher centrifugation speed.

Additionally, we performed a semiquantitative analysis of ribosomal proteins (based on the signal of 78 ribosomal proteins) using the PSMs detected in both extraction methods (elution and spin at 10 000g) which also show no statistical differences (Supporting Information, Table S1) indicating that the cell breakage is similar regardless of the methodology used. The list of ribosomal proteins included in the analysis are listed in Table S2.

To determine spin method and LC–MS/MS analysis variability, we have performed technical replicates. The same tumor sample was split in two halves (SPIN1 and SPIN2) and each of them were processed for TIF extraction with the same spin protocol (10 000g; 20 min). The whole proteome obtained from SPIN2 sample was injected three times for LC–MS/MS analysis. The LC–MS/MS replicates showed 96–97% overlap suggesting a very good reproducibility (Supporting Information, Figure S1). Moreover, there is a high overlap (more than 95%) among the single technical replicate injected for SPIN1 and each of the three replicates injected for SPIN2 (Figure S2).

Overall, these results indicate that the increment of G-force necessary to obtain TIF in samples of cSCC results in the identification of more proteins but it seems that does not trigger a strong generalized cell breakage, compared to lower G-forces or elution method. The requirement of this high G-force could be explained because the human skin is a very collagen-rich tissue, and the collagen alone accounts for approximately 75% of the dry weight of skin,¹² providing it with a high tensile strength not present in other tissues.

Comparison of the Proteomes Generated by Elution and Spin Methods

To obtain TIF samples by elution, we essentially used the procedure published by Celis et al.¹³ In this method, the protein composition of the fluid depends on the diffusion of the proteins from the interstitium to the PBS. Since the interstitium of the skin is very rich in collagen and therefore quite dense,¹⁴ we incubated the tissue for 2 h instead of 1 h to extend the diffusion time in iPBS. Also, we incubated pieces of about 0.1 g avoiding cutting tissue and thus reducing cell break. For all the samples, we recovered 500 μ L of final volume with a protein concentration that ranged from 3 to 10 mg/mL. We tested the quality of the samples by SDS-PAGE and coomassie blue staining (Figure 1C,D). The protein profile of the cSCC sample substantially differed from the plasma profile, and was enriched mainly with low molecular weight proteins (below albumin) independently of the method used.

To compare elution and centrifugation (10 000g) methods, three tumor samples (SCC6, SCC8, and SCC9) each of them eluted and centrifuged (six samples in total) were analyzed by mass spectrometry. The total number of proteins identified was 2767 proteins by the elution method and 2869 by the spin method. The 88–89% of the proteins identified by spin and elution methods are found in extracellular vesicles (Vesiclepedia database,¹⁵ last version¹⁶) supporting TIF samples quality (Figure S3, Tables S3 and S4). The observed mean protein intensities in every sample of spin method were significantly higher than the ones observed by the elution method (Figure 3A). As a loading control, we have compared the PSMs found for some of the most abundant plasma proteins (Table S5). As

observed, none of the PSMs comparisons are statistically significant (rows 2 to 5) suggesting that the amounts of the most abundant proteins detected in both methods are indistinguishable. However, the comparison of the mean intensities (row 1) of both methods shows differences which are statistically significant ($p < 0.005$). This would indicate that although the amount of proteins/peptides analyzed in every sample is similar, method B seems to improve the detection of proteins as observed in comparing the mean intensities.

Considering sample variability, only around 50% of proteins (52.7% and 52.6% in elution and spin method, respectively) were identified in all three samples analyzed with the same method (Figure 3B,C) (Table S6). Multiple previous studies showed similar results: by analyzing different biological samples of one tumor type other authors also found 50% of common proteins among the samples.^{17,18} The biological samples variability between different patients could be explained for multiple reasons, foremost tumor heterogeneity and characteristics of the patient. Our three patients were diagnosed of primary high risk cSCC with similar clinical and pathological characteristics, but each tumor may differ in their individual genetic and therefore also proteomic profile. All tumors were sampled from a chronically photoexposed area, but not exactly the same area: the face (SCC6), the wrist (SCC8), and the scalp (SCC9) (Table 1).

Table 1. Patients and Tumors Characteristics from the Five Analyzed Samples

sample	gender	age	tumor localization	tumor size	tumor characteristics
SCC6	male	90	wrist	3 cm	primary tumor
SCC8	male	84	scalp	2 cm	primary tumor
SCC9	male	80	face (right cheek)	3.5 cm	primary tumor
SCC18	male	80	face (left cheek)	4 cm	primary tumor
SCC19	female	64	right foot	3 cm	primary tumor

Regarding methods, the overlap among the total proteins obtained from the three samples in each method was 80.01% of proteins found by the elution method and 77.17% of total proteins found by spin method (Figure 3D). The Pearson correlation coefficients indicate that the proteomes of different samples showed higher variability than the proteomes of different methods (Figure 3E). This result suggests that the methodology used in the TIF extraction, centrifugation versus elution, does not strongly influence the proteomic profile of cSCC biopsies when the same sample is compared. However, a relatively important number of proteins (553 of eluted proteins and 655 of spin-obtained proteins) were specific for each individual method. We analyzed the subcellular localization of method-specific proteins by using GO ontology classification (Figure 3F). The GO terms related to “nuclear” and “membrane” localizations were considerably increased (more than 10-fold and 6-fold increase, respectively) in the elution method, whereas the “extracellular” localization was enriched in the spin method (around 3-fold increase). This last result suggests that centrifugation is the suitable method to obtain TIF samples from cSCC.

To our knowledge, this is the first study comparing the methodologies used to obtain TIF in samples of the same patient and tumor. We have checked in the literature for the data set of TIF of the same kind of tumor processed with

elution or centrifugation. For instance, the proteomic analysis of TIF of ovarian carcinoma obtained by Hoskins et al.¹⁶ using elution and by Haslene-Hox et al.¹¹ using centrifugation. In these studies, 569 total proteins were obtained using elution and 769 using centrifugation and 284 of the proteins were common to both methods. This means an overlap of 50% in elution and 37% in centrifugation. Although these studies are not directly comparable with our results, the number of proteins obtained with centrifugation method is also higher. Moreover, considering the differences among patients, tumors, and mass spectrometry set up, the overlap achieved with the TIF data of ovarian cancer in these independent studies seems relevant.

CONCLUSIONS

In this paper, we suggest a “workflow” to set up TIF isolation in tumor tissues that includes the comparison of different methods with pieces of the same tumor. Protocol characteristics may be set up for each tumor. The choice of a method rather depends on the consistency and the handling of the tissue, than on method quality as such. We propose that centrifugation is the method of choice to obtain TIF in cSCC biopsies. We obtained more extracellular proteins, greater sensitivity, and easier and quicker handling of samples. The spin method is very well adjustable to the mean size of the cSCC biopsies. The main concern associated with the centrifugation method is cell breaking during the spin of the biopsy at high G-forces.^{10,11} However, our data indicate that the level of cell integrity after spin (10 000g) or after elution may be very similar because the proteome profile was quite conserved. Moreover, centrifuged samples showed low levels of nuclear and membrane proteins and enrichment in extracellular proteins. Then, these data suggest that during centrifugation the cell lysis is not elevated.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.9b00770>.

Semiquantitative analysis of ribosomal proteins with p-values; list of ribosomal proteins; Vesiclepedia query for identified proteins; comparisons of PSMs found in both methods; summary of all proteins obtained (XLSX)

Summary of Supporting Information; Venn diagrams (PDF)

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

Clara Matas-Nadal – Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRB Lleida), Lleida, Spain; orcid.org/0000-0001-9911-6924; Phone: 0034-680735376; Email: clamanadal@gmail.com

Joan Josep Bech-Serra – Josep Carreras Leukaemia Research Institute (IJC), Barcelona, Spain

Other Authors

Marta Guasch-Vallés – Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRB Lleida), Lleida, Spain, and Universitat de Lleida, Lleida, Spain

Josep Manel Fernández-Armenteros – Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRB Lleida), Lleida, Spain, and Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

Carla Barceló – Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRB Lleida), Lleida, Spain

Josep Manel Casanova – Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRB Lleida), Lleida, Spain, Universitat de Lleida, Lleida, Spain, and Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

Carolina de la Torre Gómez – Josep Carreras Leukaemia Research Institute (IJC), Barcelona, Spain

Rafael Aguayo Ortiz – Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRB Lleida), Lleida, Spain, and Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

Eloi Garí – Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (IRB Lleida), Lleida, Spain, and Universitat de Lleida, Lleida, Spain

Complete contact information is available at: <https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jproteome.9b00770>

Author Contributions

[¶]C.M.-N. and J.J.B.-S. are co-authors.

Author Contributions

[#]R.A.O., C.d.T.G., and E.G. are cosenior authors.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rosa Ayala for analyzing the already published TIF dataset and the members of the dermatology department of HUAV for the collaboration for the sample collection. This work was funded by Generalitat de Catalunya (2017-SGR-569). C Matas is recipient of an intramural grant from Lleida Institute for Biomedical Research-Dr. Pifarré Foundation supported by Diputació de Lleida. M. Guasch was supported by a predoctoral fellowship from Universitat de Lleida. The proteomics analyses were performed in the IDIBELL Clinical Proteomic unit that is part of the Proteored, PRB3, and is supported by Grant PT17/0019, of the PE I+D+i 2013-2016, funded by Instituto de Salud Carlos III. This article is dedicated to Glòria Nadal Xifra and Narcís Matas Ros.

REFERENCES

- (1) Karagiannis, G. S.; Pavlou, M. P.; Diamandis, E. P. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Mol. Oncol.* **2010**, *4*, 496–510.
- (2) Gullino, P. M.; Clark, S. H.; Grantham, F. H. The interstitial fluid of solid tumors. *Cancer Res.* **1964**, *24*, 780–94.
- (3) Wagner, M.; Wiig, H. Tumor Interstitial Fluid Formation, Characterization and Clinical Implications. *Front. Oncol.* **2015**, *5*, 1–12.
- (4) Onsurathum, S.; Haonon, O.; Pinlaor, P.; Pairojkul, C.; Khuntikeo, N.; Thanan, R.; Roytrakul, S.; Pinlaor, S. Proteomics detection of S100A6 in tumor tissue interstitial fluid and evaluation of its potential as a biomarker of cholangiocarcinoma. *Tumor Biol.* **2018**, *40*, 67195.
- (5) Chen, E. I.; Yates, J. R., 3rd. Cancer proteomics by quantitative shotgun proteomics. *Mol. Oncol.* **2007**, *1*, 144–159.

(6) Bittremieux, W.; Tabb, D. L.; Impens, F.; Staes, A.; Timmerman, E.; Martens, L.; Laukens, K. Quality control in mass spectrometry-based proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* **2018**, *37*, 697–711.

(7) Bodzon-Kulakowska, A.; Bierzynska-Krzysik, A.; Dylag, T.; Drabik, A.; Suder, P.; Noga, M.; Jarzebinska, J.; Silberring, J. Methods for samples preparation in proteomic research. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *15* (849), 1–31.

(8) Haslene-Hox, H. Measuring gradients in body fluids - A tool for elucidating physiological processes, diagnosis and treatment of disease. *Clin. Chim. Acta* **2019**, *489*, 233–241.

(9) Huang, D. W.; Sherman, B. T.; Lempicki, R. A. Systemic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatic resources. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 44.

(10) Wiig, H.; Aukland, K.; Tenstad, O. Isolation of interstitial fluid from rat mammary tumors by a centrifugation method. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* **2003**, *284*, H416–H424.

(11) Haslene-Hox, H.; Oveland, E.; Berg, K. C.; Kolmannskog, O.; Woie, K.; Salvesen, H. B.; Tenstad, O.; Wiig, H. A new method for isolation of interstitial fluid from human solid tumors applied to proteomic analysis of ovarian carcinoma tissue. *PLoS One* **2011**, *6*, No. e19217.

(12) Chu, D. H. Development and structure of skin. In *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*, 7th ed.; McGraw Hill Medical, 2008; p 63.

(13) Celis, J. E.; Gromov, P.; Cabezón, T.; Moreira, J. M.; Ambartsumian, N.; Sandelin, K.; Rank, F.; Gromova, I. Proteomic characterization of the interstitial fluid perfusing the breast tumor microenvironment: a novel resource for biomarker and therapeutic target discovery. *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 327–344.

(14) Holliday, M. A. Extracellular fluid and its proteins: dehydration, shock, and recovery. *Pediatr. Nephrol.* **1999**, *13*, 989–95.

(15) Kalra, H.; Simpson, R. J.; Ji, H.; Aikawa, E.; Altevogt, P.; Askenase, P.; Bond, V. C.; Borràs, F. E.; Breakefield, X.; Budnik, V.; Buzas, E.; Camussi, G.; Clayton, A.; Cocucci, E.; Falcon-Perez, J. M.; Gabriellsson, S.; Gho, Y. S.; Gupta, D.; Harsha, H. C.; Hendrix, A.; Hill, A. F.; Inal, J. M.; Jenster, G.; Krämer-Albers, E. M.; Lim, S. K.; Llorente, A.; Lötvall, J.; Marcilla, A.; Mincheva-Nilsson, L.; Nazarenko, I.; Nieuwland, R.; Nolte-'t Hoen, E. N.; Pandey, A.; Patel, T.; Piper, M. G.; Pluchino, S.; Prasad, T. S.; Rajendran, L.; Raposo, G.; Record, M.; Reid, G. E.; Sánchez-Madrid, F.; Schiffelers, R. M.; Siljander, P.; Stensballe, A.; Stoorvogel, W.; Taylor, D.; Thery, C.; Valadi, H.; van Balkom, B. W.; Vázquez, J.; Vidal, M.; Wauben, M. H.; Yáñez-Mó, M.; Zoeller, M.; Mathivanan, S. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol.* **2012**, *10*, No. e1001450.

(16) Pathan, M.; Fonseka, P.; Chitti, S. V.; Kang, T.; Sanwlani, R.; Van Deun, J.; Hendrix, A.; Mathivanan, S. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47* (D1), D516–D519.

(17) Fijneman, R. J. A.; de Wit, M.; Pourghasian, M.; Piersma, S. R.; Pham, T. V.; Warmoes, M. O.; Lavaei, M.; Piso, C.; Smit, F.; Delis-van Diemen, P. M.; van Turenhout, S. T.; Terhaar sive Droste, J. S.; Mulder, C. J. J.; Blankenstein, M. A.; Robanus-Maandag, E. C.; Smits, R.; Fodde, R.; van Hinsbergh, V. W. M.; Meijer, G. A.; Jimenez, C. R. Proximal fluid proteome profiling of mouse colon tumors reveals biomarkers for early diagnosis of human colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 2613–2624.

(18) Hoskins, E. R.; Hood, B. L.; Sun, M.; Krivak, T. C.; Edwards, R. P.; Conrads, T. P. Proteomic analysis of ovarian cancer proximal fluids: Validation of elevated peroxiredoxin 1 in patient peripheral circulation. *PLoS One* **2011**, *6*, No. e25056.