

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía Patológica e Historia de la Ciencia

Programa de Doctorado en Biomedicina



**Validación preclínica de un nuevo sistema
terapéutico para pacientes con cáncer basado en
la radioterapia
y en las células madre estromales**

Tesis Doctoral para aspirar al Grado de Doctora presentada por

Natividad Martín Morales

Granada, 2024

Validación preclínica de un nuevo sistema terapéutico para pacientes con cáncer basado en la radioterapia y en las células madre estromales



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

Tesis doctoral presentada por **D^a Natividad Martín Morales**
para optar al Grado de Doctora por la Universidad de Granada

Directores de la Tesis Doctoral:

Dr. Francisco Javier O'Valle Ravassa
Catedrático de Anatomía Patológica
Departamento de Anatomía Patológica e Historia
de la Ciencia, Universidad de Granada

Dr. César Luis Ramírez Tortosa
Facultativo Especialista de Área
Profesor Asociado
Departamento de Anatomía Patológica e Historia
de la Ciencia y UPIGAP, Universidad de Granada

Granada, 2024

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Natividad Martín Morales
ISBN: 978-84-1195-417-4
URI: <https://hdl.handle.net/10481/94705>

Ítaca

Cuando emprendas tu viaje a Ítaca
pide que el camino sea largo,
lleno de aventuras, lleno de experiencias.
No temas a los lestrigones ni a los cíclopes
ni al colérico Poseidón,
seres tales jamás hallarás en tu camino,
si tu pensar es elevado, si selecta
es la emoción que toca tu espíritu y tu cuerpo.
Ni a los lestrigones ni a los cíclopes
ni al salvaje Poseidón encontrarás,
si no los llevas dentro de tu alma,
si no los yergue tú alma ante ti.

Pide que el camino sea largo.
Que muchas sean las mañanas de verano
en que llegues -¡con qué placer y alegría!-
a puertos nunca vistos antes.
Detente en los emporios de Fenicia
y hazte con hermosas mercancías,
nácar y coral, ámbar y ébano
y toda suerte de perfumes sensuales,
cuantos más abundantes perfumes sensuales puedas.
Ve a muchas ciudades egipcias
a aprender, a aprender de sus sabios.

Ten siempre a Ítaca en tu mente.
Llegar allí es tu destino.
Más no apresures nunca el viaje.
Mejor que dure muchos años
y atracar, viejo ya, en la isla,
enriquecido de cuanto ganaste en el camino
sin aguantar a que Ítaca te enriquezca.

Ítaca te brindó tan hermoso viaje.
Sin ella no habrías emprendido el camino.
Pero no tiene ya nada que darte.

Aunque la halles pobre, Ítaca no te ha engañado.
Así, sabio como te has vuelto, con tanta experiencia,
entenderás ya qué significan las Ítacas.

Poema de Konstantino Kavafis

A mis hijas Andrea y María

Agradecimientos

Hoy, gracias a Dios, ha llegado el momento que tantas veces rondó mi mente, dedicar unas palabras de agradecimiento a todas las personas que me han apoyado tanto y han hecho posible que este momento llegara, por lo tanto tengo que reconocer que este trabajo no es obra mía sino es un pedacito de cada uno de vosotros. Este trabajo tiene muchas horas de esfuerzo, pero también de consejo, ilusión, apoyo y sobre todo cariño. Comencé esta tesis con mucha ilusión y ganas de ayudar, y años más tarde la terminé con gran experiencia, sensatez y el corazón repleto de momentos y recuerdos marcados de personas increíbles. Gracias.

En primer lugar, agradecer a mis directores de Tesis D. Francisco O'Valle Ravassa y D. César Ramírez Tortosa por darme la oportunidad de colaborar en este gran proyecto, por depositar en mi vuestra confianza. Por vuestra paciencia, por vuestros consejos y apoyo infinito. Sois un ejemplo a seguir. Paco agradecerte de corazón la oportunidad que me diste aquel día que acudí a tu despacho diciéndote que yo quería investigar sobre el cáncer. Desde aquel día han sido muchas horas las que me has dedicado. Todo lo que se es gracias a ti, has sido mi maestro te tengo un gran respeto, admiración y cariño.

En segundo lugar agradecer a mi equipo de investigación y segunda familia el grupo de Biología oral y Regeneración, a los profesores D. Pablo Galindo Moreno y D. Miguel Padial Molina, sin vosotros esto no hubiera sido posible. Pablo infinitas gracias por hacer esto posible, siempre cuidándonos, siempre dando ánimos, eres un ejemplo a seguir para mí. Un pedacito bien grande tuyo está en esta tesis. A los profesores D. Juan Duarte y D. Pedro Hernández sois dos excelentes personas y profesionales, hacéis el mundo más bonito. Gracias Pedro por estar siempre cuando he necesitado algo, siempre con una sonrisa, gracias por tus consejos y paciencia infinita. Al resto de compañeros del equipo en especial a Allinson por sus ánimos y buenos consejos eres una amiga muy especial para mí, a Saray y José grandes compañeros, amigos y apoyo. A mis compañeras de laboratorio Gema, Ana, Nuria, Pablo, etc y tantos que han pasado por nuestro laboratorio llenándolo de alegría y trabajo excelente gracias a todos por estar siempre ahí y apoyarme.

Agradecer a los profesores y personal administrativo del Departamento de Anatomía Patológica e Historia de la Ciencia por su acogida, sus consejos y su paciencia. A los profesores D. David Aguilar Peña y D. Mariano Aguilar Peña, porque desde que llegue a vuestro laboratorio me habéis hecho sentir querida, gracias por vuestros consejos y apoyo. Gracias Montse por estar siempre ahí con tu sonrisa, dispuesta a ayudar siempre y por esos abrazos que me han reconfortado en muchos momentos. A Mikel por sus consejos y bromas aportando siempre la chispa a los

momentos más duros de la tesis. A Natalia, Alfredo, Katherine, Agatha..., etc. A mi Guadalupe que ha sido un grandísimo apoyo para mí en el departamento en todos los sentidos. A D^a María Dolores Rodríguez, no pude tener mejor profesora, gracias por tu infinita paciencia y conocimientos si estoy aquí es gracias a ti.

Al personal de la Facultad de Medicina, ya que a lo largo de esta Tesis he necesitado su colaboración cientos de veces desde el personal de conserjería hasta laboratorios, en especial a mis compañeros Serafín y Antonio gracias por todos estos años, por como os habéis adaptado siempre para echarme una mano aunque no fuera vuestra área, por vuestros ánimos, apoyo y cariño incondicional...millones de gracias, otro pedacito bien grande de este trabajo es vuestro.

A todo el personal del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Cecilio a Mercedes, Merche, Rosa, M^a Dolores, Rafa, José Garrido, Rodrigo,...y muchas más bellísimas personas que me faltaría por nombrar a las que llevo unida tantos años y a las que estoy tan infinitamente agradecida, algunos ya no están en activo pero siguen en mi mente y mi corazón siempre. Han sido muchas las veces que hemos necesitado vuestra colaboración a lo largo de esta Tesis siempre habéis estado ahí, esta investigación en gran parte es vuestra. Dentro de vuestro Servicio se encuentran los mejores profesionales y las mejores personas que he conocido. Enhorabuena por contar con tanto personal con esa gran calidad humana.

Y por último, pero no por ser menos, a mi familia "GRACIAS" por vuestra paciencia infinita, comprensión, apoyo y consejos esta Tesis es por y para vosotros. Andrea y María habéis crecido viéndome metida en los libros y la investigación creo que sabéis del tema más incluso que yo, gracias por ser mi mayor y mejor regalo de la vida os adoro. A mi marido Germán por ser apoyo en mis momentos bajos, por tus consejos y ánimos para seguir adelante. A mi padre Jacobo mi más sincero agradecimiento por estar siempre ahí, esto ha sido posible gracias a ti me animaste a comenzar y a perseverar eres un ejemplo para mí, en mi corazón tienes un espacio bastante grande y en este trabajo también. A mi hermano Pepe y a mi sobrino Alejandro gracias por desde la distancia ser ese apoyo tan grande que necesito siempre. A mis padres por darme la vida. A mi madre por ser la "inventora" de todo esto, ella fue la que sembró esta semilla, me dio la vida y me hizo ver que este era mi camino y que podía aportar mi granito de arena. Te llevo siempre conmigo en mi mente y mi corazón. Nunca olvidaremos tu sonrisa.

Resumen

El melanoma es el tumor cutáneo más agresivo, produce metástasis de forma precoz y es altamente resistente al tratamiento convencional. El melanoma supone el 3.4% del total de casos oncológicos detectados mundialmente. A pesar de representar sólo un bajo porcentaje de los casos de cáncer de piel, el melanoma es responsable del 90% de las muertes asociadas a tumores cutáneos. Las terapias convencionales frente al cáncer tienen limitaciones ya que estos tratamientos no controlan completamente las recurrencias del tumor o las metástasis después de la remisión inicial. En numerosas ocasiones el tratamiento del cáncer combina terapias adyuvantes que incluyen además de la cirugía, quimioterapia y radioterapia, la inmunoterapia y terapia con anticuerpos monoclonales.

La etiología del cáncer es multifactorial y compleja, y puede variar según el tipo específico de cáncer. En general, el cáncer se desarrolla como resultado de cambios genéticos que alteran el control normal del crecimiento y la división celular, de modo que la interacción entre los antecedentes genéticos y los factores de riesgo ambientales unido al estilo de vida es determinante en el desarrollo del cáncer. Las investigaciones recientes en genómica han permitido la identificación de un número creciente de genes y variantes genéticas que están asociadas a las vías metabólicas del desarrollo de los diferentes tipos de melanoma.

Las células madre mesenquimales (MSC) además de su capacidad reparativa pueden ser una herramienta terapéutica coadyuvante para el tratamiento de diversas neoplasias. La irradiación de las células MSC a dosis subletales modifica la expresión de proteínas que pueden tener acción antiproliferativa y capacidad para mejorar, a través del efecto *bystander*, el resultado de los tratamientos convencionales.

IMP3 es una proteína de unión a ARNm de factor de crecimiento similar a insulina II también conocida como L523S que se sobreexpresa en células neoplásicas. IMP3 se ha asociado especialmente con cánceres agresivos y avanzados, y su expresión se ha observado específicamente en tumores malignos, pero no en tejidos normales adyacentes. Investigaciones *in vitro* han revelado que IMP3 puede

promover la proliferación, adhesión e invasión de células tumorales, lo que sugiere un papel importante en la progresión del cáncer.

Aunque la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia siguen siendo las principales opciones de tratamiento para muchos tipos de neoplasias, es importante reconocer que estas terapias "tradicionales" están dirigidas principalmente a las células tumorales y no pueden abordar completamente la complejidad del cáncer y su microambiente tumoral (TME). Con el avance de la terapia dirigida y la oncología de precisión, se ha vuelto cada vez más importante identificar biomarcadores tanto en el tumor como en TME. Esto es especialmente relevante en el contexto de la inmunoterapia, donde la respuesta del paciente puede variar considerablemente y no todos los pacientes se benefician de manera igual de estos tratamientos. El inmunoperfilado es una técnica que implica la medición y caracterización del sistema inmunitario con el fin de obtener información detallada sobre cómo las células inmunitarias pueden responder a diversas enfermedades y terapias. Esta técnica proporciona una visión integral del estado y la función del sistema inmunitario, lo que puede ser crucial para comprender la dinámica de la respuesta inmune.

Hipótesis:

Las hipótesis planteadas para el estudio experimental y el clínico-patológico han sido:

Hipótesis cierta 1: Los tratamientos muestran efecto en el crecimiento, en el desarrollo de metástasis e inducen cambios en la expresión inmunohistoquímica y en posibles biomarcadores, así como en el transcriptoma en los melanomas xenoinjertados en ratones.

Hipótesis nula 1: Por el contrario la radioterapia y la aplicación de células madre no ejercen ningún papel beneficioso en el melanoma experimental ni induce cambios a nivel inmunohistoquímico, ni en el transcriptoma.

Hipótesis cierta 2: En los dos melanomas cutáneos humanos más frecuentes se pueden observar diferencias clínicas, inmunohistoquímicas y en el transcriptoma así como es posible encontrar diferencia en el perfil de expresión inmunohistoquímica y

perfil transcriptómico entre los melanomas que han producido infiltración en ganglios linfáticos en comparación con los que se encuentran confinados en la piel.

Hipótesis nula 2: No es posible detectar diferencias clínicas, inmunohistoquímicas ni en el transcriptoma en los dos melanomas cutáneos humanos más frecuentes. De igual modo no es posible encontrar diferencia en el perfil de expresión inmunohistoquímica y perfil transcriptómico entre los melanomas que han producido infiltración en ganglios linfáticos en comparación con los que se encuentran confinados en la piel.

Objetivos: En la presente Tesis Doctoral hemos planteado como objetivo general valorar el efecto que diferentes tratamientos inducen sobre un modelo experimental de melanomas xenoinjertados en ratones, identificando posibles biomarcadores y constatar los cambios en el transcriptoma y finalmente completar con un estudio clínico-patológico sobre biopsias de pacientes con melanomas cutáneos aplicando las novedosas técnicas de transcriptómica espacial.

Para ello hemos diseñados los siguientes objetivos específicos:

Desarrollar un modelo de xenoinjerto de melanoma humano en ratones inmunocomprometidos; analizar la biodistribución en los tejidos de las MSC. Identificar el efecto del tratamiento con Radioterapia y MSC y establecer las modificaciones en la expresión génica mediante transcriptómica espacial en muestras de tejido fijadas e incluidas en parafina. Identificar si IMP3 e EMP1 pueden ser candidatos como biomarcadores de mal pronóstico y su relación con el desarrollo de metástasis. Estudiar el comportamiento de los melanomas cutáneos humanos más frecuentes en su vertiente clínico-patológica y verificar las diferencias en el transcriptoma tanto en las células tumorales como en el microambiente tumoral así como identificar si el perfil transcriptómico difiere entre los melanomas cutáneos que muestran metástasis ganglionar frente a los que permanecen localizados.

Material y Métodos: La presente memoria consta de dos partes, un estudio experimental en el que empleamos 64 ratones NOD/SCID-gamma a los que se les inoculó 2×10^5 células MSC de cordón umbilical humano (UC-MSC) radiadas con 2Gy o no radiadas por vía intravenosa (IV) y alternativamente células MSC transformadas

(tMSC). Se realizaron dos experimentos diferentes, uno de biodistribución donde se valoraron diferentes ventanas temporales a 1, 2, 6 y 14 días y el segundo de toxicidad/inducción de neoplasias que se valoró a los 90 días. Se emplearon técnicas morfológicas convencionales, inmunohistoquímicas y qPCR para secuencias Alu humanas con la finalidad de valorar lesiones morfológicas tisulares, inmunolocalizar e identificar la presencia de células MSC. En un tercer experimento, las líneas de melanoma A375 y G361 fueron inoculadas a ratones NOD/SCID (n=56). Se realizaron 3 experimentos independientes estableciendo los siguientes grupos: Control (n=8), tratado con MSC (n=8), tratado con RT+MSC (n=8) y tratado con radioterapia (RT) (n=8). Sobre matrices de tejidos (TMA) Fueron valorados diferentes parámetros morfológicos (mitosis, necrosis, apoptosis, formación de metástasis) y las modificaciones en la expresión inmunohistoquímica de factores relacionados con la proliferación (Ki-67) y con el pronóstico (IMP3, HIF α , PARP-1, E-Cadherina, N-Cadherina, EMP1 y EML1) y se valoró el perfil transcriptómico completo mediante GeoMx®DSP.

La segunda parte del estudio es un análisis clínico-patológico retrospectivo de los melanomas cutáneos más frecuentes que incluyó 114 biopsias de pacientes diagnosticados de Melanoma de Extensión Superficial (n=104) o Melanoma Nodular (n=10) con al menos cinco años de seguimiento, donde se valoraron variables histopatológicas, inmunohistoquímicas y el perfil transcriptómico espacial en las células tumorales y en el microambiente tumoral, así como las diferencias en la regulación génica entre los tipos de melanomas y según la presencia o no de metástasis en ganglios linfáticos

Resultados y Conclusiones:

Los resultados obtenidos más relevantes han sido:

1. La línea celular de melanoma A357 xenoinjertada en ratones NOD/SCID gamma muestra un comportamiento más agresivo con la inducción de metástasis, mientras que la G631 no las produce en nuestras condiciones de ensayo.
2. La aplicación de radioterapia y células MSC reduce de manera significativa el crecimiento tumoral in vivo en los melanomas xenoinjertados.

3. El tratamiento con Radioterapia y radioterapia con células MSC reduce la expresión de IMP3, hecho constatado por inmunohistoquímica, western-blotting y transcriptómica espacial en el modelo de melanoma xenoinjertado. La expresión de IMP3 se correlacionó significativamente con el antígeno de proliferación Ki-67, el número de metástasis, la expresión de PARP1 y expresión reducida de E-Cadherina por lo que interpretamos esta reducción como un efecto beneficioso inducido por el tratamiento.

4. Los tratamientos aplicados en el modelo experimental de melanoma xenoinjertado inducen múltiples cambios en la expresión de sondas en las células neoplásicas como se evidencia en los estudios realizados de transcriptómica espacial mediante la plataforma GeoMx DSP sobre los melanomas.

5. El perfil de expresión de los dos melanomas xenoinjertados difieren en su expresión transcriptómica como también ocurre entre los Melanomas Nodulares y los Melanomas de Extensión Superficial en la serie clínico-patológica.

6. La expresión de IMP3 en nuestra serie clínica retrospectiva ha demostrado que está significativamente relacionada con la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos y con factores pronósticos relevantes como el espesor de Breslow y Nivel Clark. Consideramos por ello que IMP3 podría ser considerado como posible candidato a factor pronóstico en melanomas; aunque se requieren de nuevos estudios para corroborarlo.

7. A pesar que mediante inmunohistoquímica no hemos podido demostrar modificación en la expresión de EMP1, en el estudio de transcriptómica espacial hemos demostrado la expresión incrementada de EMP1 en los xenoinjertos de A375 que han tenido peor comportamiento y diseminación metastásica y En los Melanomas Nodulares. Estos resultados no nos permiten proponer EMP1 en melanoma como un candidato a biomarcador pronóstico.

8. La tecnología de Transcriptómica espacial nos ha permitido identificar en áreas de melanoma y en áreas de microambiente tumoral los genes que se encuentran regulados al alza y establecer una primera aproximación sobre las rutas metabólicas que ocurren tanto a nivel experimental como en los melanomas cutáneos más frecuentes.

ÍNDICE

<i>Poema de Konstantino Kavafis</i>	iv
Agradecimientos	vi
Resumen	viii
Abreviaturas	xviii
Lista de Tablas.....	xxiii
Lista de Figuras.....	xxv
Introducción.....	1
1.1 Neoplasias. Generalidades	1
1.1.1 Epidemiología.....	2
1.1.2 Etiología	5
1.1.3 Tumorigénesis.....	8
1.2 Carcinomas cutáneos y melanoma	13
1.2.1 Epidemiología.....	14
1.2.2 Etiología	19
1.2.3 Estadios	21
1.2.4 Melanoma, subtipos histopatológicos	24
1.3 Genética del melanoma	27
1.3.1 Mutaciones de la línea germinal	27
1.3.2 Mutaciones somáticas	29
1.3.3 Regiones no codificantes.....	33
1.4 Rutas patogénicas en neoplasias melanocíticas	34
1.5 Biomarcadores serológicos, tisulares, inmunohistoquímicos y moleculares.....	39
1.5.1 Biomarcadores serológicos de pronóstico	39
1.5.2 Productos tumorales circulantes obtenidos por biopsia líquida (PTC)	41
1.5.2.1 Células tumorales circulantes (CTC)	41
1.5.2.2 Ácidos nucleicos circulantes	42
1.5.2.3. MicroARN (miARN) y exosomas de melanoma circulantes	43
1.5.3 Biomarcadores epigenéticos en tejido	44
1.5.3.1 Biomarcadores de metilación del ADN.....	44

1.5.3.2	MicroARN (miARN) en tejidos	45
1.5.3.3	ARN largos no codificantes (lncARN) en tejidos.....	45
1.5.3.4	Biomarcadores de modificación de histonas	46
1.5.4	Biomarcadores de la vía de señalización tisular	46
1.5.4.1	Biomarcadores asociados con oncogenes, genes supresores de tumores y genes supresores de metástasis.....	46
1.5.4.2	Biomarcadores de proliferación celular.....	48
1.5.4.3	Biomarcadores de autofagia	49
1.5.4.4	Biomarcadores de respuesta inflamatoria e inmune.....	50
1.5.4.5	Biomarcadores mitocondriales	52
1.6	Biomarcadores tisulares que predicen el estado de los ganglios linfáticos en el melanoma cutáneo	52
1.6.1	Invasión linfovascular (ILV)	52
1.6.2	VEGF	53
1.6.3	Tetraspanina CD9	54
1.6.4	LYVE-1 y PODOPLANINA (D2-40)	55
1.6.5	Prueba de perfil de expresión génica (test 31-GEP).....	56
1.6.6	Subunidad 1 alfa del factor inducible por hipoxia (HIF1 α)	58
1.6.7	E-Cadherina y N-Cadherina	59
1.6.8	Proteína de unión a ARNm de factor de crecimiento similar a insulina II (IMP3).....	61
1.6.9	Poli-ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP-1)	62
1.6.10	EMP1.....	63
1.7	Tratamiento del Melanoma en modelos experimentales	65
1.7.1	Radioterapia.....	65
1.7.2	Células Madre o Progenitoras	67
1.7.2.1.1	Tipos.....	68
1.7.2.2	Seguridad en el uso de las MSC.....	71
1.7.2.3	Riesgos del uso de las MSC	73
1.7.2.4	Terapia combinada de MSC con RT.....	75
1.7.2.5	Transformación de las MSC.....	76
1.8	Xenotumores	77
1.9	Líneas Celulares	79
1.10	Plataforma de Transcriptómica espacial.....	80
1.10.1	Tecnologías de transcriptómica espacial	83
1.10.1.1	Métodos basados en secuenciación de próxima generación (NGS):.....	83
1.10.1.2	Métodos basados en imágenes	85

1.10.1.3 Perspectivas de la transcriptómica espacial sobre el desarrollo, la fisiología y la enfermedad.....	86
1.10.2 Plataforma GeoMx® DSP (Nanostring).....	87
1.10.2.1 Preparación de tejidos.....	90
1.10.2.2 Colección de Oligos.....	91
1.10.2.3 Hibridación.....	91
1.10.2.4 Salida y Análisis de datos.....	91
10.3 Perfilado de tumores con GeoMx®DSP.....	94
10.4 GeoMx®DSP y Melanoma.....	95
Hipótesis y Objetivos.....	98
2.1 Hipótesis de trabajo.....	98
2.2 Objetivos.....	101
Material y Métodos.....	103
3.1 Modelo experimental in vitro.....	103
3.1.1Células estromales mesenquimales (MSC) y líneas celulares de melanoma humano.....	103
3.1.2 Irradiación experimental de MSC.....	104
3.2 Modelo experimental en ratones.....	104
3.2.1 Experimento crecimiento tumoral in vivo.....	104
3.2.2 Experimento de toxicidad/inducción de neoplasias.....	107
3.2.3 Experimento de biodistribución.....	108
3.2.4 Métodos Morfológicos.....	111
3.2.5 Procedimiento de inmunohistoquímica para muestras de TMA embebidas en parafina.....	113
3.2.6 Métodos Moleculares.....	116
3.3 Estudio clínico retrospectivo en melanomas cutáneos.....	120
3.4 Transcriptómica espacial y Next Generation Sequencing.....	120
3.4.1 GeoMx®DSP.....	120
3.5 Análisis de enriquecimiento funcional.....	128
3.6 Análisis Estadístico.....	129
Resultados.....	131
4.1 Efecto de la radiación sobre las células UC-MSC.....	131
4.2 Experimento previo de toxicidad/inducción de neoplasias.....	132
4.2.1 Evolución del peso.....	132
4.2.2 Resultados morfológicos.....	134
4.2.3 Resultados de la identificación inmunohistoquímica de células MSC.....	136
4.2.4 Resultados de la identificación molecular de células MSC.....	138

4.3 Experimento de biodistribución de las células MSC de cordón umbilical	139
4.3.1 Resultados de la identificación morfológica de células MSC.....	139
4.3.2 Resultados de la identificación inmunohistoquímica de las células MSC.....	140
4.3.3 Resultados de la identificación molecular de las células MSC.....	141
4.4 Resultados de los experimentos de xenotumores de melanoma en ratones NOD/SCID gamma	142
4.4.1 Las líneas celulares de melanoma A375 y G361 tienen diferente capacidad de inducción de metástasis.....	143
4.4.2 Las células de melanoma A375 tienen una mayor expresión inmunohistoquímica de IMP3.....	144
4.4.3 Los tratamientos con RT y RT-MSR redujeron el tamaño de los tumores en melanomas A375 y G361 xenoinjertados en ratones NOD/SCID gamma	147
4.4.4 Resultados del estudio del microambiente tumoral.....	152
4.4.5 Resultados del estudio de transcriptómica espacial en melanomas xenoinjertados con las líneas A375 y G631 en ratones NOD/SCID gamma	152
4.4.5.1 Se observan diferencias entre la expresión del transcriptoma espacial entre las dos líneas de melanoma xenoinjertadas A375 y G631	153
4.4.5.2 Efecto de los diferentes tratamientos en la línea celular de melanoma A375 xenoinjertada.	166
4.4.5.3 Efecto de los diferentes tratamientos en la línea celular de melanoma G361 xenoinjertada.	178
4.5 Estudio clínico-patológico.....	189
4.5.1 Resultados del estudio clínico, morfológico e inmunohistoquímico de los melanomas cutáneos de la serie retrospectiva	189
4.5.2 Resultados del estudio de transcriptómica espacial en melanomas cutáneos.....	193
4.5.2.1 Comparación de la expresión del transcriptoma de los MES versus MN	196
4.5.2.2 Comparación de la serie de melanomas cutáneos en función de la negatividad o positividad del ganglio centinela.	221
Discusión	239
5.1 Hallazgos del comportamiento de las dos líneas de melanoma xenoinjertadas	240
5.2 Hallazgos del tratamiento de los xenotumores con MSR y RT	240
5.3 Hallazgos del efecto radiación sobre MSR	245
5.4 Hallazgos del estudio de transcriptómica espacial de los melanomas xenoinjertados	247
5.5 Hallazgos sobre el papel de IMP3 como biomarcador	250
5.6 Hallazgos de otros biomarcadores	252
5.7 Hallazgos de Transcriptómica espacial	256
5.8 Hallazgos del estudio de inmunohistoquímica y transcriptómica espacial en el estudio clínico-patológico retrospectivo	262

Limitaciones	266
Conclusiones	268
Perspectivas Futuras	271
Referencias	273
Anexo 1	303
Anexo 2	305

Abreviaturas

A

31-GEP. Prueba de perfil de expresión génica

AJCC. American Joint Committee on Cancer

AMBRA1. Molécula activadora de la autofagia regulada por Beclin1

AOI. Área de iluminación

AQUA. Fluorescencia cuantitativa automatizada

B

BCC. Carcinoma de células basales

bFGF. Factor de crecimiento de fibroblastos básico

BH. Corrección de Benjamini-Hochberg

C

CAF. Fibroblastos asociados al cáncer

CC. Componentes celulares

CD9. Tetraspanina

CMT1A. Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 1A

CNE2. Línea celular de cáncer de nasofaringe

CODEX. Co-detección por indexación

COX-2. Ciclooxigenasa-2

CP. Cáncer de piel

CPNM. Cánceres de piel no melanoma

CSD. Daño solar acumulativo

CTC. Células tumorales circulantes

ctDNA. ADN tumoral circulante

CTP. Productos tumorales circulantes

D

DAB. Diaminobenzidina

DAPI. Diclorohidrato de 4',6-diamidina-2-fenilindol

DCC. Archivos de conversión de recuento digital

DE. Expresión diferencial

DKK3. Dickkopf WNT inhibidor de la vía de señalización

DMD. Microespejo digital programable

ADN. Ácido desoxirribonucleico

DSP. Digital Spatial Profiler

DVI. Densidad de vasos linfáticos

E

ECP. Proteína catiónica de eosinófilos

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético

EMP1. Proteína de membrana epitelial 1

EpCAM. Molécula de adhesión de células epiteliales

F

FASTQ, Formato para secuencias de secuenciación de siguiente generación

FC. Fold change

FDA. Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU

FDR. Tasa de descubrimiento falso

FITC. Isotiocianato de fluoresceína

FFPE. Fijado en formol e incluido en parafina

FGF2. Factor de crecimiento de fibroblastos básico

FIS1. Anticuerpos antimitocondriales, proteína de fisión 1

PHH3. Fosfohistona H3

FOXQ1. Proteína Q1 de la caja Forkhead

G

GC. Ganglio centinela

G-CSF. Factor estimulante de colonias de granulocitos

GM-CSF. Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos

GO. Gene Ontology

H

HDAC8. Histona desacetilasa 8

HGB. Factor de crecimiento de hepatocitos

HIF1 α . Subunidad 1alfa del factor inducible por hipoxia

HNPP. Neuropatía hereditaria con tendencia a parálisis por presión

hTERT. Subunidad catalítica de la telomerasa humana

H&E. Hematoxilina-eosina

I

IARC. International Agency for Research on Cancer

ICI. Puntos de control inmunológico

IDO. Indolamina 2,3-dioxigenasa sérica

IF. Inmunofluorescencia

IgG. Inmonoglobulina G

ILV. Invasión linfovascular

IMP3. Proteína de unión a mRNA de factor de crecimiento similar a insulina II

ISH. Hibridación in situ

ISS. Secuenciación in situ e hibridación in situ

K

KEGG. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

L

LDH. Lactato deshidrogenasa sérica

lncRNA. ARN largos no codificantes

LOQ. Límite de cuantificación

LVI. Invasión linfovascular

LYVE-1. Receptor-1 de hialuronano endotelial de vasos linfáticos

M

MCP1. Proteína 1 quimioatrayente de monocito

MEC. Composición de la matriz extracelular

MEM. Medio mínimo esencial

MES. Melanoma de extensión superficial

mIF. Inmunofluorescencia multiplex

MF. Funciones moleculares

MFN2. Mitofusina 2

MI. Margen invasivo

MIA. Actividad inhibidora del melanoma

MIFT. Factor de transcripción asociado a microftalmia

MIR. Razón mortalidad-incidencia

mRNA. ARN mensajero

miRNA. MicroARN circulantes

MLA. Melanoma Lentiginoso Acral

MLM. Melanoma Léntigo Maligno

MN. Melanoma nodular

MSC. Células estromales mesenquimales

MV. Mimetismo vasculogénico

N

NBF. Formalina tamponada neutra al 10%

NOD/SCID gamma. Cepa de ratones inmunocomprometidos

NGS. Secuenciación de próxima generación

O

OSCC. Carcinoma oral de células escamosas

OMS. Organización mundial de la salud

P

PARP-1. Poli-ADP-Ribosa Polimerasa 1

PBS. Tampón fosfato salino

PCE. Proteína catiónica de eosinófilos

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa

PMP22. Proteína de mielina periférica de 22 kDa

Q

Q3. Normalización del recuento del tercer cuartil

QC. Control de calidad

R

REDECAN. Red Española de Registros de Cáncer

ARN. Ácido ribonucleico

ROI. Regiones específicas de interés

RT. Radioterapia

S

S100B. Proteína fijadora de calcio B de S100

SBF. Suero bovino fetal

SCC. Carcinoma de células escamosas

SD. Desviación estándar

SDF-1. Factor 1 derivado de células estromales

SEOM. Sociedad Española de Oncología

SG. Supervivencia general

SLN. Sentinel lymph node

SSP. Supervivencia libre de progresión

SW-480. Línea celular de cáncer colorrectal humano

SSC. Citrato salino-sódico

T

TERT. Transcriptasa inversa de la telomerasa humana

TLS. Estructuras linfoides terciarias

TMB. Carga mutacional tumoral

TMA. Micromatrices tisulares

TME. Microambiente Tumoral

TRAIL. Ligando inducido por apoptosis relacionado con TNF

TRPM1. Potencial receptor transitorio de melastatina-1

U

UMI. Identificador molecular único

UPAR. TGF- α receptor del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa

UV. Luz ultravioleta

V

VM. Marcadores de visualización

W

WTA. Whole Transcriptome Atlas

YB-1. Proteína de unión a la caja Y 1

Lista de Tablas

Tabla 1.1: Ejemplos de ensayos clínicos en los que se utilizaron MSC para tratar diferentes enfermedades	72
Tabla 3.1: Experimento Toxicidad/inducción de neoplasias	105
Tabla 3.2: Experimento Biodistribución	107
Tabla 3.3: Procedimiento de inmunohistoquímica para muestras incluidas en parafina	112
Tabla 3.4: Parejas de cebadores utilizados previamente por Campbell y cols. y utilizados para la detección de ADN humano en muestras de tejidos de ratones NSG en los estudios de biodistribución y tumorigénesis	115
Tabla 3.5: Secuencia de los <i>primers</i> utilizados para el estudio de los genes de interés	116
Tabla 3.6: Descripción general de los marcadores de visualización utilizados para distinguir entre el compartimento de células tumorales y las de células inmunitarias	121
Tabla 4.1: Comparación de la patología hepática en ratones del grupo tMSC inoculados con células hMSC comparadas con MSC-IR de cordón umbilical	134
Tabla 4.2: Células MSC de cordón umbilical/mm ² en diferentes ventanas temporales identificadas mediante inmunotinción frente a vimentina	138
Tabla 4.3: Comparación de los resultados morfológicos en melanomas A375 y G361 xenoinjertados en ratones NOD/SCID gamma en los grupos Control	142
Tabla 4.4: Comparación estadística de los resultados inmunohistoquímicos en melanomas A375 y G361 xenoinjertados entre los grupos Control	143
Tabla 4.5: Comparación del efecto del tratamiento sobre la expresión inmunohistoquímica de diferentes marcadores en melanoma humano A375 xenoinjertado en ratones NOD/SCID gamma	148
Tabla 4.6: Comparación del efecto del tratamiento sobre la expresión inmunohistoquímica de diferentes marcadores en melanoma humano G631 xenoinjertado en ratones NOD/SCID gamma	149
Tabla 4.7: Coeficiente de correlación de Pearson entre variables inmunohistoquímicas y morfológicas	149
Tabla 4.8: Genes sobreexpresados en A375, Log ₂ "fold change" (FC)>2	154
Tabla 4.9: Genes sobreexpresados en G631, Log ₂ "fold change" (FC)>2	156
Tabla 4.10: Genes del conjunto 31-GEP sobreexpresados en la línea A375 frente a G361	162
Tabla 4.11: Genes sobreexpresados en el grupo Control en la línea A375 de manera estadísticamente significativa	166
Tabla 4.12: De los genes sobreexpresados en grupo RT+MSC de la línea A375	168
Tabla 4.13: De los genes sobreexpresados en el grupo RT de la línea A375	171
Tabla 4.14: Genes sobreexpresados en el grupo Control de la línea A375	173
Tabla 4.15: Genes sobreexpresados en el grupo MSC de la línea A375	173
Tabla 4.16: Genes sobreexpresados en Control en la línea G361	178
Tabla 4.17: Genes sobreexpresados en RT+MSC de la línea G361	178
Tabla 4.18: Genes sobreexpresados en el grupo Control de la línea G361	180
Tabla 4.19: Genes sobreexpresados en el grupo RT en la línea G361	180
Tabla 4.20: Genes sobreexpresados en Control en la línea G361	182
Tabla 4.21: Genes sobreexpresados en el grupo MSC de la línea G361	183
Tabla 4.22: Comparación expresión inmunohistoquímica de subpoblaciones leucocitarias del	

microambiente tumoral así como del ligando y del receptor de muerte programada en ambos tipos de melanoma	188
Tabla 4.23: Comparación de los datos clínicos, morfológicos e inmunohistoquímicos entre melanomas sin infiltración o con infiltración de ganglios linfáticos	190
Tabla 4.24: Genes sobreexpresados en MN comparado con el grupo MES	195
Tabla 4.25: Genes sobreexpresados en el grupo MES comparado con el grupo MN	198
Tabla 4.26: Relación de Marcadores de la prueba 31-GEP que ha resultado significativos en el estudio en las AOIs S100+	203
Tabla 4.27: Genes sobreexpresados en el grupo MN comparado con el grupo MES en las AOIs S100+	207
Tabla 4.28: Marcadores histogenéticos de melanocitos en las AOIs S100+	210
Tabla 4.29: Genes sobreexpresados en el grupo MN comparado con el grupo MES en las AOIs CD45+	211
Tabla 4.30: Genes sobreexpresados en el grupo MES comparado con el grupo MN en las AOIs CD45+	214
Tabla 4.31: Genes sobreexpresados en el grupo GC+ comparado con el grupo GC-	219
Tabla 4.32: Genes sobreexpresados en el grupo GC- comparado con el grupo GC+	221
Tabla 4.33: Genes sobreexpresados en el grupo GC+ comparado con el grupo GC- en las AOIs S100+	226
Tabla 4.34: Genes sobreexpresados en el grupo GC- comparado con el grupo GC+ en las AOIs S100+	228
Tabla 4.35: Genes sobreexpresados en el grupo GC- comparado con el grupo GC+ en las AOIs CD45+	232

Lista de Figuras

	<u>Página</u>
Figura 1.1: A) Gráficos circulares del número estimado de casos y B) de muertes en el mundo en 2022 para ambos sexos.....	3
Figura 1.2: Tendencias futuras en las tasas de incidencias de nuevos casos de neoplasias malignas en ambos sexos de 2022 a 2045.....	4
Figura 1.3: Gráfico circular del número de nuevos casos estimados en España en 2022 en ambos sexos	5
Figura 1.4: Características distintivas del cáncer o <i>Hallmarks</i>	9
Figura 1.5: Proceso de colonización metastásica.....	11
Figura 1.6: Microambiente tumoral.....	12
Figura 1.7: A) Gráficos circulares del número estimado de nuevos casos y B) de muertes por melanoma,.....	16
en el mundo en 2022 para ambos sexos	
Figura 1.8: Gráfico dual sobre el ratio de incidencia y mortalidad en el mundo comparado por sexo.....	17
Incidencia (azul) y mortalidad (rojo)	
Figura 1.9: Mapa global del ratio estimado en el mundo en 2022 de incidencia de melanoma en ambos sexos.....	18
Figura 1.10: Etapas de la progresión del tumor en el melanoma según la AJCC.....	23
Figura 1.11: Tipos de melanoma	27
Figura 1.12: Rutas patogénicas implicadas en los distintos tipos de melanoma.....	35
Figura 1.13: Modelo hipotético de participación de tetraspanina CD9 en la diseminación metastásica de células de melanoma a los ganglios linfáticos.....	55
Figura 1.14: Rutas de activación HIF-1 α	59
Figura 1.15: Adhesión de melanocitos y células de melanoma	60
Figura 1.16: Efecto <i>bystander</i> o efecto espectador de la radiación	66
Figura 1.17: Las dos fuentes principales de MSC: fuentes adultas y perinatales.....	70
Figura 1.18: Procedimiento esquemático de la plataforma de transcriptómica espacial.....	89
Figura 3.1: Representación esquemática del protocolo de grupos y tratamientos del experimento de inducción de melanomas xenoinjertados en ratones NOD/SCID gamma.....	104
Figura 3.2: Representación esquemática del protocolo del experimento de toxicidad/inducción de neoplasias en ratones NOD/SCID gamma.....	106
Figura 3.3: Representación esquemática del protocolo del experimento de biodistribución en ratones NOD/SCID gamma.....	108
Figura 3.4: Confección de los bloques TMA.....	111
Figura 3.5: Esquema del protocolo GeoMx DSP (Nanostring).....	120
Figura 3.6: GeoMx@DSP (Nanostring).....	122
Figura 3.7: Principio experimental del perfilado espacial en GeoMx®.....	122
Figura 3.8: Profundidad de secuenciación recomendada para los diferentes ensayos de GeoMx NGS.....	123
Figura 3.9: Protocolo de secuenciación GeoMx.....	124
Figura 3.10: Housekeeping utilizados para la normalización de las muestras donde se observa su expresión en todos los AOIs estudiados.....	125
Figura 4.1: Inducción de la expresión de genes relacionados con el efecto <i>bystander</i> tras la irradiación de las MSC.....	130
Figura 4.2: Evolución del peso en los diferentes grupos.....	131
Figura 4.3: Supervivencia de los animales en cada grupo experimental.....	132
Figura 4.4: Imágenes representativas de los diferentes tejidos sin alteraciones morfológicas significativas en el grupo MSC-IR en comparación con los cortes de tejidos en el grupo tMSC.....	133
Figura 4.5: Panel de anticuerpos para inmunoidentificar tisularmente las células MSC en los diferentes parénquimas orgánicos.....	135
Figura 4.6: Expresión de vimentina en la línea celular tMSC en diferentes tejidos.....	135
Figura 4.7: Estimación del número de células detectadas por microgramo de tejido de los ratones NOD/SCID gamma tras 90 días de la inoculación por IV de células UC-MSC mediante técnica	

de qPCR.....	136
Figura 4.8: Imágenes representativas de los diferentes tejidos sin alteraciones morfológicas significativas en los grupos 1 día, 2 días, 6 días y 14 días	137
Figura 4.9: Identificación de células MSC en pulmón en varias ventanas temporales a 1, 2, 6 y a los 14 días mediante la expresión inmunohistoquímica de vimentina.....	139
Figura 4.10: Estimación del número de células detectadas por microgramo de tejido de los ratones NOD/SCID gamma tras 1, 2, 6 y 14 días de la inoculación por IV de células UC-MSC- IR.....	140
Figura 4.11: Características morfológicas de las líneas celulares de melanoma humano xenoinjertadas.....	141
Figura 4.12: Modificación de la expresión inmunohistoquímica de IMP3 citoplasmático y marcadores Ki-67 nucleares en los dos xenoinjertos de células de melanoma en los grupos Control, MSC, RT+MSC y RT	144
Figura 4.13: Tamaño del tumor en ratones representativos de diferentes grupos al final del experimento.....	146
Figura 4.14: Curvas de crecimiento tumoral de los tumores primarios.....	147
Figura 4.15: Expresión de IMP3 en melanomas xenoinjertados A375 y G361.....	148
Figura 4.16: Gráfico de control de calidad (QC) para la expresión de genes que nos ayuda a identificar genes sin señal útil.....	150
Figura 4.17: Gráfico PCA de la expresión del transcriptoma en tres ejes de coordenadas de las líneas A375 y G361 de melanoma humano xenoinjertadas en ratón.....	151
Figura 4.18: Heatmap supervisado de la expresión de transcritos que permiten diferenciar entre los tumores melánicos inducidos por las líneas A375 y G631 xenoinjertadas.....	152
Figura 4.19: Heatmap supervisado seleccionando los transcritos que fueron estudiados mediante anticuerpos por inmunohistoquímica en las dos líneas de melanoma xenoinjertados incluyendo solo los grupos Control.....	152
Figura 4.20: Gráfico de tipo volcán de las sondas expresadas en las líneas A375 y G631 xenoinjertadas.....	153
Figura 4.21: Gráfico de barras de las rutas más expresadas en la línea A375.....	154
Figura 4.22: Clustergrama de las proteínas sobreexpresadas que forman parte de ruta de proteínas con expresión alterada en metástasis combinando p-value y z-value. ENRICH.....	155
Figura 4.23: Red de los genes alterados en A375 con las vías de Gene Ontology (GO)	155
Figura 4.24: Gráfico de barras de las rutas más expresadas en la línea G361.....	156
Figura 4.25: Clustergrama de las proteínas sobreexpresadas que forman parte de ruta de proteínas con expresión alterada en metástasis combinando valor de p y valor z.....	157
Figura 4.26: Red de los genes alterados en G361 con las vías de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)	158
Figura 4.27: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes de DEG entre A375 y G361.....	158
Figura 4.28: Gráfico de tipo volcán de las sondas específicas de melanoma en las línea A375 y G631 xenoinjertadas.....	159
Figura 4.29: Diagrama de cajas de los anticuerpos estudiados mediante inmunohistoquímica.....	160
Figura 4.30: Gráfico de correlación de los marcadores de melanoma y de los anticuerpos estudiados mediante inmunohistoquímica en esta Tesis las líneas de melanoma humano A375 y G361.....	161
Figura 4.31: Diagrama de cajas de la expresión de transcritos de EMP1 e IMP3 en las dos líneas de melanoma xenoinjertadas.....	161
Figura 4.32: Gráfico de tipo volcán de las sondas específicas del grupo testado en la prueba 31-GEP en las líneas A375 y G631 xenoinjertadas.....	163
Figura 4.33: Representación gráfica de las correlaciones del grupo de genes que se detectan con la prueba 31-GEP en ambas líneas de melanoma.....	164
Figura 4.34: Heatmap supervisado de la expresión de transcritos que permiten diferenciar entre los tumores melánicos inducidos por la línea A375 en los diferentes grupos de estudio.....	165
Figura 4.35: Heatmap supervisado seleccionando los transcritos que fueron estudiados mediante anticuerpos por inmunohistoquímica en la línea de melanoma xenoinjertado A375 incluyendo los diferentes tratamientos.....	166
Figura 4.36: Gráfico de tipo volcán de los genes de la línea A375 xenoinjertada comparando el Control con el grupo tratado RT+MSC.....	167
Figura 4.37: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes de DEG entre muestras del grupo RT+MSC (naranja) y el grupo Control (azul)	169

Figura 4.38: Gráfico de tipo Volcán de los genes de la línea A375 xenoinjertada comparando el grupo Control con el tratado con RT.....	170
Figura 4.39: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes del grupo RT (naranja) y el grupo Control (azul)	171
Figura 4.40: Gráfico tipo volcán de los genes de la línea A375 xenoinjertada comparando el grupo Control con el tratado con MSC.....	172
Figura 4.41: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes de DEG entre muestras del grupo MSC (naranja) y el grupo Control (azul)	173
Figura 4.42: Diagramas de cajas seleccionando las moléculas estudiadas por inmunohistoquímica en este Trabajo	174
Figura 4.43: Gráfico de cajas de la expresión de los marcadores de melanoma en la línea A375 xenoinjertada en relación con el grupo de tratamiento.....	175
Figura 4.44: Heatmap supervisado de la expresión de transcritos ordenados por grupos de tratamiento en la línea G361 xenoinjertada.....	176
Figura 4.45: Heatmap supervisado de la expresión de transcritos ordenados por grupos de tratamiento en la línea G361 xenoinjertada.....	177
Figura 4.46: Gráfico de tipo volcán de los genes de la línea G361 xenoinjertada comparando el grupo Control con el tratado con RT+MSC.....	177
Figura 4.47: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes de DEG entre muestras del grupo RT+MSC (naranja) y el grupo Control (azul)	179
Figura 4.48: Gráfico de tipo volcán de los genes de la línea G361 xenoinjertada comparando el grupo Control con el tratado con RT.....	181
Figura 4.49: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes de DEG entre muestras del grupo RT (naranja) y el grupo Control (azul)	182
Figura 4.50: Gráfico de tipo volcán de los genes de la línea G361 xenoinjertada comparando el grupo Control con el tratado con MSC.....	183
Figura 4.51: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes de DEG entre muestras del grupo MSC (naranja) y el grupo Control (azul)	184
Figura 4.52: Diagramas de cajas de los principales marcadores analizados en esta Tesis Doctoral.....	185
Figura 4.53: Histograma de barras de la expresión de los marcadores de melanoma en la línea G361 xenoinjertada en relación con el grupo de tratamiento.....	186
Figura 4.54: Histograma de barras de la expresión inmunohistoquímica de subpoblaciones leucocitarias en MN y MES cutáneos.....	189
Figura 4.55: Expresión inmunohistoquímica de IMP3 en Melanoma cutáneo humano.....	190
Figura 4.56: Ejemplo de selección de ROI con DSP.....	192
Figura 4.57: Gráficos UMAP.....	195
Figura 4.58: Expresión de genes en las áreas S100+ y CD45+.....	195
Figura 4.59: A) Gráfico de cajas que incluye recuentos de DSP para CD45 y S100B en los compartimentos/AOI correspondientes. B) Recuentos medios de DSP \pm SEM en todos los compartimentos para cada marcador de melanoma estudiado en esta Tesis.....	196
Figura 4.60: Heatmap de los transcritos de MES y MN en nuestro estudio.....	196
Figura 4.61: Gráfico de tipo volcán comparando la expresión diferencial de sondas entre los tipos histológicos de melanoma.....	197
Figura 4.62: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes Elsevier_Pathway_Collection.....	197
Figura 4.63: Gráfico de tipo volcán de los términos del conjunto de genes Elsevier_Pathway_Collection.....	198
Figura 4.64: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca KEGG_2021_Human.....	199
Figura 4.65: Gráfico de tipo volcán de los términos del conjunto de genes KEGG_2021_Human.....	200
Figura 4.66: Heatmap supervisado con los marcadores histogenéticos de melanocitos en los melanomas cutáneos.....	201
Figura 4.67: Gráfico de tipo volcán que representa la diferencia de expresión de los marcadores relativos a melanoma y microambiente tumoral en ambos tipos de melanoma.....	202
Figura 4.68: Diagrama de cajas de los anticuerpos estudiados mediante inmunohistoquímica.....	203
Figura 4.69: Heatmap supervisado de la expresión de anticuerpos estudiados por tipos de melanoma.....	204

Figura 4.70: Heatmap supervisado de la expresión de transcritos del grupo 31-GEP en ambos tipos de melanoma.....	204
Figura 4.71: Gráfico de tipo volcán de los genes en los melanomas cutáneos de la prueba 31-GEP, comparando los MES con el MN.....	205
Figura 4.72: Gráfico de tipo volcán de los genes en los melanomas cutáneos comparando los MES con los MN en las áreas S100+.....	205
Figura 4.73: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes Elsevier_Pathway_Collection.....	206
Figura 4.74: Gráfico de tipo volcán de los términos del conjunto de genes KEGG_2021_Human.....	208
Figura 4.75: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes KEGG_2021_Human.....	209
Figura 4.76: Gráfico de tipo volcán de los términos del conjunto de genes KEGG_2021_Human.....	210
Figura 4.77: Gráfico de tipo volcán de los genes en los melanomas cutáneos comparando los MES con los MN en las áreas S100+.....	211
Figura 4.78: Diagrama de cajas de los anticuerpos estudiados mediante inmunohistoquímica comparando su expresión en MSE y MN.....	212
Figura 4.79: Gráfico de tipo volcán de los genes en los melanomas cutáneos comparando los MES con los MN en las áreas CD45+.....	213
Figura 4.80: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes Elsevier_Pathway_Collection.....	214
Figura 4.81: Gráfico de tipo volcán de los términos del conjunto de genes Elsevier_Pathway_Collection.....	215
Figura 4.82: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes MSigDB_Hallmark_2020	216
Figura 4.83: Gráfico de tipo volcán de los términos del conjunto de genes MSigDB_Hallmark_2020.....	217
Figura 4.84: Gráfico de tipo volcán de los marcadores de melanoma en área CD45+ de ambos tipos de melanoma.....	218
Figura 4.85: Diagrama de cajas de los anticuerpos estudiados mediante inmunohistoquímica.....	219
Figura 4.86: Gráfico de tipo volcán de los marcadores de la prueba 31-GEP en ambos tipos de melanoma cutáneo en las áreas CD45+.....	220
Figura 4.87: Gráfico de tipo volcán de la serie de melanomas con y sin metástasis ganglionares.....	222
Figura 4.88. Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes BioCarta_2016.....	223
Figura 4.89: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes KEGG_2021_Human.....	224
Figura 4.90. A) Heatmap supervisado de los anticuerpos estudiados en la Tesis Doctoral en ambas AOIs comparando los casos con diseminación ganglionar y los localizados B) Heatmap supervisado comparando los casos de melanoma GC+ vs. GC-.....	225
Figura 4.91: Gráfico de tipo volcán de los marcadores de melanoma en los casos con y sin metástasis ganglionares.....	226
Figura 4.92: Gráfico de tipo volcán de los marcadores de la prueba 31-GEP en los casos con y sin metástasis ganglionares.....	226
Figura 4.93: Diagrama de cajas de los transcritos en melanoma cutáneo con metástasis (GC+) y sin metástasis (GC-) en ganglios linfáticos.....	227
Figura 4.94: Gráfico de tipo volcán de la serie de melanomas con y sin metástasis ganglionares en las AOI S100+.....	227
Figura 4.95: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes MSigDB_Hallmark_2020.....	229
Figura 4.96: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes BioCarta_2016	230
Figura 4.97: Gráfico de tipo volcán de los marcadores de melanoma en los casos con y sin metástasis ganglionares en las AOI S100+.....	231
Figura 4.98: Gráfico de tipo volcán de los marcadores empleados en la prueba 31-GEP en los casos con y sin metástasis ganglionares en las AOI S100+	232

Figura 4.99: Gráfico de tipo volcán de la serie de melanomas con y sin metástasis ganglionares en las AOI CD45+	233
Figura 4.100: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes BioPlanet_2019.....	234
Figura 4.101: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes NCI-Nature_2016	235
Figura 4.102: Gráfico de tipo volcán de los marcadores de melanoma en los casos con y sin metástasis ganglionares en las AOI CD45+	236
Figura 4.103: Gráfico de tipo volcán de los marcadores empleados en la prueba 31-GEP en los casos con y sin metástasis ganglionares en las AOI CD45+.....	236
Figura 4.104: "Heatmap" supervisado comparando los casos de melanoma cutáneos GC+ vs GC- en las áreas CD45+	237

CAPÍTULO 1

Introducción

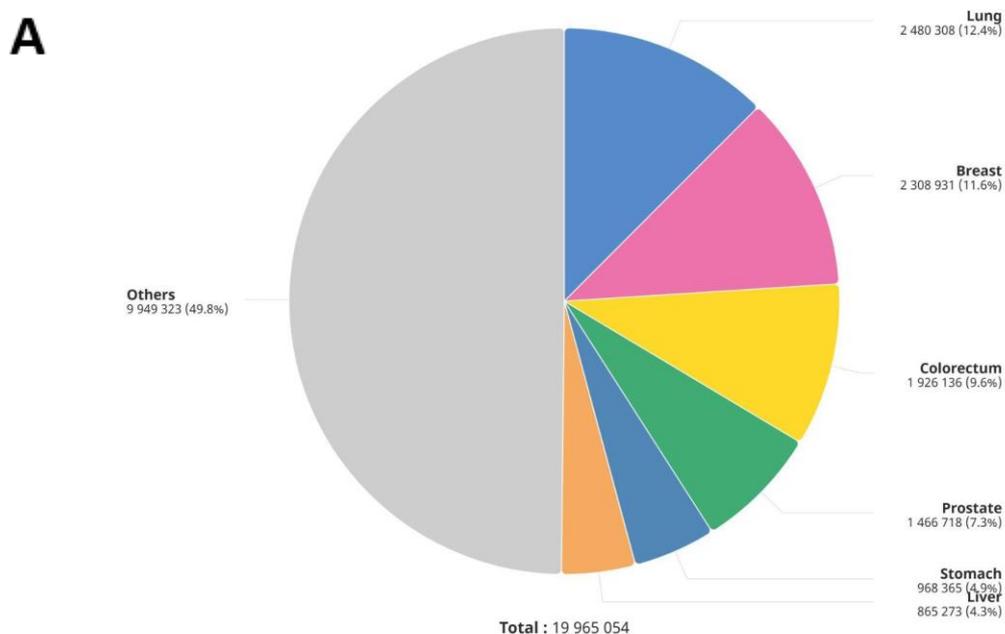
1.1 Neoplasias. Generalidades

Las neoplasias malignas están constituidas por un grupo heterogéneo de células con un crecimiento celular irregular. Las terapias convencionales (cirugía, quimioterapia o radioterapia) contra el cáncer tienen limitaciones ya que estos tratamientos no controlan completamente las recurrencias del tumor o las metástasis después de la remisión inicial. En numerosas ocasiones el tratamiento del cáncer combina terapias adyuvantes que incluyen además de la cirugía, quimioterapia y radioterapia, la inmunoterapia y terapia con anticuerpos monoclonales. Algunas de estas terapias carecen de especificidad para actuar sólo sobre las células cancerosas, y aunque haya una respuesta primaria con reducción inicial de la masa tumoral, es frecuente la recurrencia del tumor después de la terapia. Recientemente, se ha puesto de manifiesto la gran influencia ejercida por el microambiente tumoral en la progresión tumoral (1).

1.1.1 Epidemiología

La IARC (Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer) es parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS), su cometido consiste en evaluar la evidencia científica sobre agentes cancerígenos en humanos. Publica informes periódicos sobre la carga global del cáncer y la clasificación de agentes carcinógenos. En el último informe de 2022, estiman que hay 19.9 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo y 9,7 millones de muertes en 2022. Dentro de las neoplasias malignas más diagnosticadas se encuentran las de pulmón, mama, colorrectal, próstata, estómago e hígado (Fig. 1.1). Las cifras específicas pueden variar según la región, el tipo de cáncer y otros factores (1).

Absolute numbers, Incidence, Both sexes, in 2022
World



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
Data version : Globocan 2022
© All Rights Reserved 2024

International Agency
for Research on Cancer
World Health
Organization

Absolute numbers, Mortality, Both sexes, in 2022
World

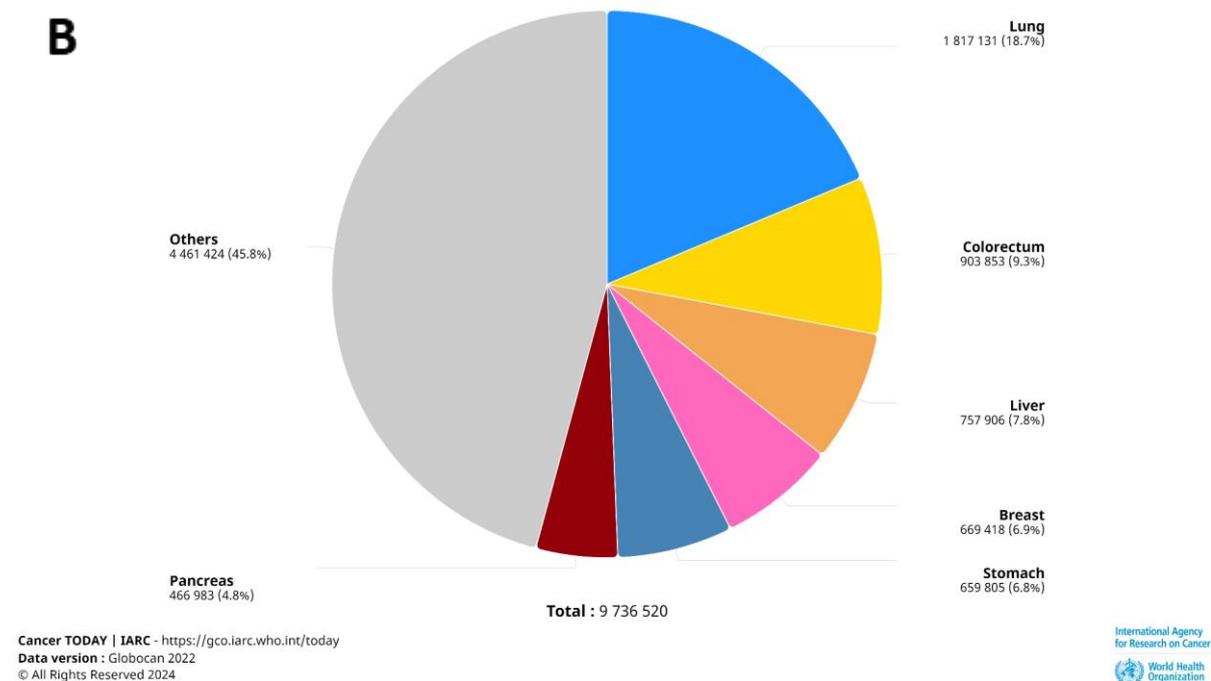


Figura 1.1: A) Gráficos circulares del número estimado de casos y B) de muertes en el mundo en 2022 para ambos sexos. Fuente: GLOBOCAN 2022.

Para 2045 se prevé un incremento en la incidencia del cáncer, pasando de 20.0 millones de casos nuevos a 32.6 millones (Fig. 1.2). Este incremento en la incidencia y el número de muertes se prevé superior en hombres con respecto a mujeres. En España este incremento se estima en un 32.8%. En el caso del melanoma cutáneo la incidencia en España está aumentando, entre 2002 y 2022, la tasa de incidencia anual ajustada por edad por cada 100.000 personas se ha incrementado tanto en hombres como en mujeres. En concreto, ha pasado de 10.5 a 16.3 casos en mujeres y de 10.8 a 14.6 en hombres, lo que supone un incremento anual del 2.5% y del 1.6% respectivamente, según refleja la infografía sobre “Melanoma cutáneo en España” elaborada, coincidiendo con la época estival, por la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) y la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) (2).

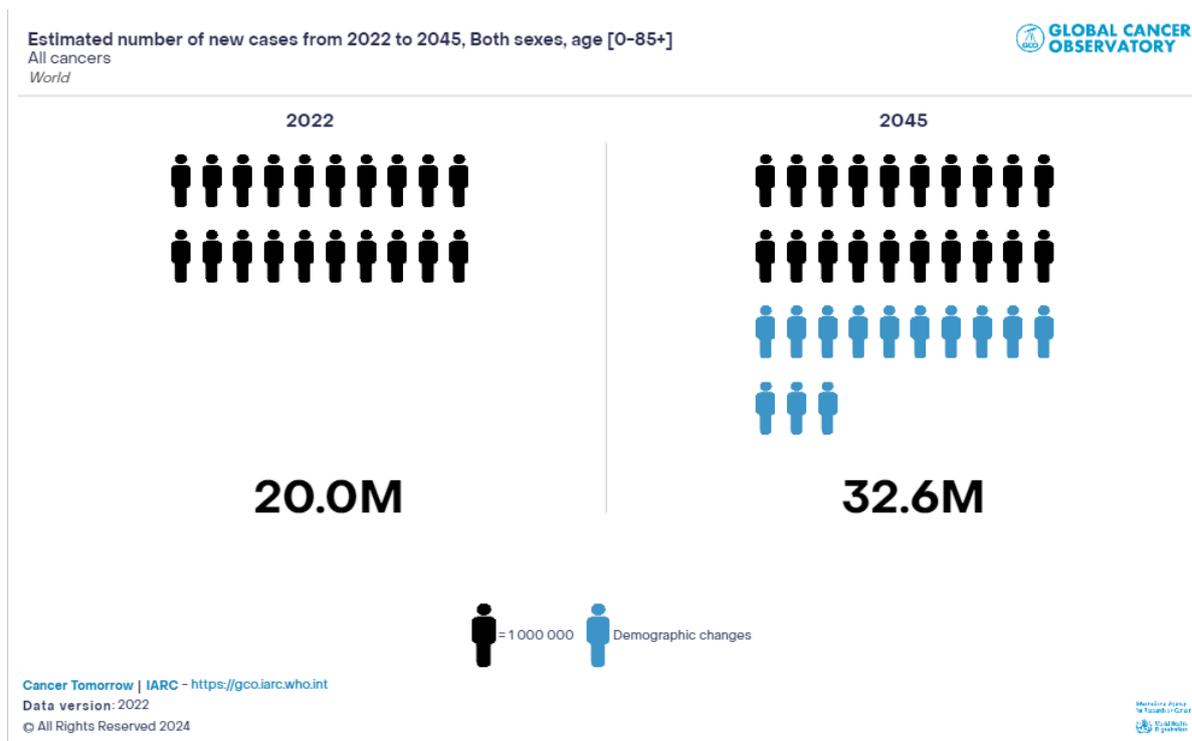


Figura 1.2: Tendencias futuras en las tasas de incidencias de nuevos casos de neoplasias malignas en ambos sexos de 2022 a 2045. Fuente: GLOBOCAN 2022.

Dentro de los cánceres frecuentes diagnosticados en España en 2022 encontramos, el carcinoma colorrectal, que representa un 14.1%, seguido por el de

mama un 12.6%, próstata un 11.8% y el de pulmón un 10.8% (Fig. 1.3).

Absolute numbers, Incidence, Both sexes, in 2022
Spain

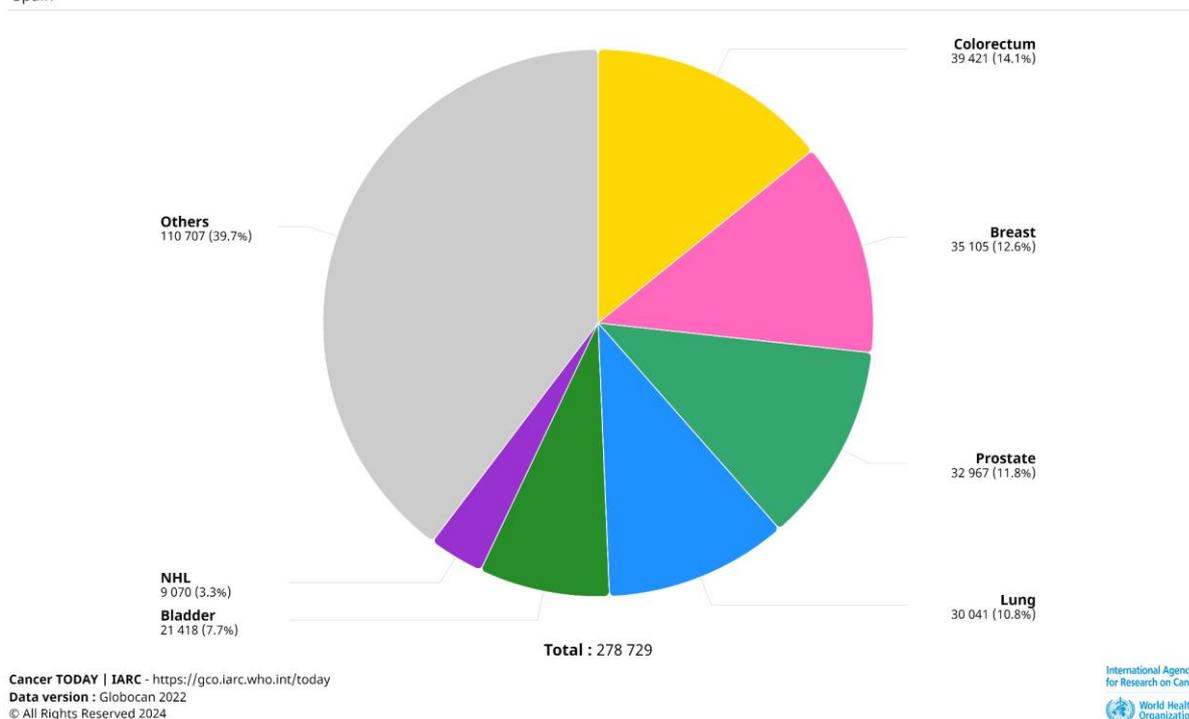


Figura 1.3: Gráfico circular del número de nuevos casos estimados en España en 2022 en ambos sexos. Fuente: GLOBOCAN 2022.

1.1.2 Etiología

La etiología del cáncer es multifactorial y compleja, y puede variar según el tipo específico de cáncer. En general, el cáncer se desarrolla como resultado de cambios genéticos (mutaciones) que alteran el control normal del crecimiento y la división celular. De modo que la interacción entre los antecedentes genéticos y los factores de riesgo ambientales unido al estilo de vida es determinante en el desarrollo del cáncer. Las investigaciones recientes en genómica han permitido la identificación de un número creciente de genes y variantes genéticas que están asociadas, o que pueden contribuir al desarrollo de tipos específicos de cáncer. La disponibilidad de nuevas tecnologías para evaluar la exposición ambiental, parcialmente basadas en la

identificación de biomarcadores de exposición desarrollados a través de "ómicas" y otras tecnologías, ha abierto nuevas posibilidades (1).

Un factor de riesgo es todo aquello que aumenta o disminuye las posibilidades de que una persona padezca una enfermedad, según el National Cancer Institute. Los factores de riesgo de cáncer se pueden dividir en cuatro grupos:

- **Factores del estilo de vida:** Hábitos de tabaco y consumo de alcohol. El tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol están asociados con un mayor riesgo de varios tipos de cáncer. Así como una dieta pobre en frutas, verduras y fibra, y rica en grasas saturadas, puede contribuir al riesgo de ciertos tipos de cáncer.
- **Factores ambientales:** Exposición a sustancias carcinogénicas: La exposición a ciertas sustancias químicas y agentes carcinogénicos en el medio ambiente puede aumentar el riesgo de cáncer. La exposición excesiva a la radiación ultravioleta (UV) proveniente del sol es un factor de riesgo importante para el cáncer de piel, incluido el melanoma. Por otro lado, la exposición a la radiación ionizante, como la radioterapia o la radiación de ciertos entornos ocupacionales, puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer.
- **Factores de riesgo biológicos:** son aquellas características físicas, como el sexo, la raza o grupo étnico, la edad y el color de la piel.
- **Factores Genéticos:** Las mutaciones en ciertos genes pueden llevar al desarrollo del cáncer. Algunas mutaciones pueden ser heredadas de padres a hijos, mientras que otras pueden ocurrir durante la vida de una persona debido a factores ambientales.

Los determinantes de la salud ambiental, sin embargo, incluyen todo lo que nos rodea, y las influencias ambientales incluyen no solo agentes químicos, físicos y biológicos, sino también hormonas, dieta y estilo de vida (3). Los factores ambientales son complejos, variables, interactivos y dinámicos. La exposición múltiple a los

mismos o diferentes factores puede ocurrir en un momento o de forma mantenida. La contribución del medio ambiente al desarrollo del cáncer humano es sustancial (4).

El término “interacción entre genes y medio ambiente” se usa a menudo para determinar la importancia de los genes y el ambiente. Se ha descrito mejor como una acción conjunta entre genes y medio ambiente. La interacción se refiere a la modificación del efecto del ambiente sobre el fenotipo por variantes genéticas, o viceversa. Si tenemos en consideración que un individuo se origina a partir de una sola célula, que al nacer son billones de células. Se ha calculado que en una célula encontramos unos 30.000 genes que codifican para 1.5 millones de proteínas. La importancia del gen radica cuando se transcribe a ARNm y se traduce a proteína. Entonces este producto proteico es el que afecta a las funciones celulares. En un tejido, el entorno intracelular y extracelular influye en la función proteica. Son necesarios para el desarrollo de un cáncer entre 6–8 mutaciones genéticas y a su vez la activación de genes por mecanismos genéticos/epigenéticos (5).

Con herencia epigenética nos referimos a cambios en la expresión génica que no implican alteraciones en la secuencia de ADN, sino modificaciones en las estructuras químicas que rodean al ADN y que afectan a su actividad. Las modificaciones epigenéticas pueden ser heredadas de una generación a otra y desempeñar un papel crucial en el desarrollo y la regulación génica. Descubrimientos recientes proporcionan una fuerte evidencia que argumenta que los mecanismos epigenéticos juegan un papel clave prácticamente en todas las etapas de desarrollo y progresión del cáncer.

Las principales modificaciones epigenéticas incluyen la metilación del ADN y las modificaciones en las histonas. La metilación del ADN implica la adición de grupos metilo a ciertas bases del ADN, lo que puede silenciar la expresión de genes. Por otro lado, las histonas son proteínas alrededor de las cuales se enrolla el ADN, y las modificaciones en estas proteínas pueden influir por consiguiente en la expresión génica. Factores ambientales, como la dieta, el estrés o la exposición a toxinas, pueden

tener un impacto en la regulación genética de los descendientes a través de mecanismos epigenéticos. Una mejor comprensión de la contribución de los mecanismos epigenéticos aberrantes inducidos por el medio ambiente pueden resultar críticos en el desarrollo de nuevas estrategias para la prevención del cáncer (3).

1.1.3 Tumorigénesis

La tumorigénesis es el proceso mediante el cual las células normales se transforman en células cancerosas. Este proceso es complejo y generalmente implica una serie de eventos genéticos y epigenéticos que alteran el control normal del crecimiento celular. Como consecuencia, los mecanismos reguladores de la división celular se ven interrumpidos, lo que lleva a una proliferación celular prematura y descontrolada, llegando a escapar de los mecanismos defensivos del sistema inmunológico y posteriormente migrar a órganos distantes y causar metástasis (6).

Los "hallmarks" o características distintivas del cáncer son un conjunto de capacidades adquiridas por las células cancerosas que les permiten crecer de manera descontrolada y evadir los mecanismos normales de regulación celular. Estas características fueron propuestas por los investigadores Douglas Hanahan y Robert Weinberg en 2011 (6). La sostenibilidad de la señalización proliferativa, resistencia a la muerte celular, la evasión de los mecanismos de supresión del crecimiento, la habilitación de la inmortalidad replicativa, la activación de la capacidad de invasión y metástasis y la inducción de la angiogénesis. Recientemente, se ha demostrado que la promoción de la inflamación y el aumento de la inestabilidad del genoma y de las tasas de mutación contribuyen a la adquisición de la desregulación del metabolismo energético celular y a la prevención de la destrucción inmunitaria (7, 8) (Fig. 1.4).

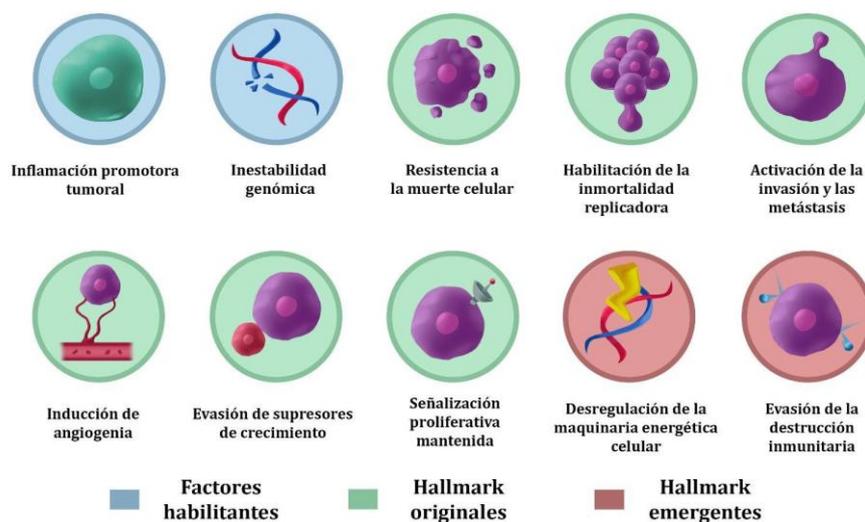


Figura 1.4: Características distintivas del cáncer o "Hallmarks".

La ciencia básica y el estudio clínico de la población en cáncer están unidos por el nexo de la investigación sobre los mecanismos de la tumorigénesis, y es por tanto un área importante de actividad en los avances en la comprensión de los procesos celulares y moleculares. Los mecanismos de carcinogénesis proporcionan conocimientos fundamentales en la interacción entre lo ambiental y lo genético que resultan en el desarrollo del cáncer (9).

Para la prevención y tratamiento del cáncer, el estudio de estos conocimientos sobre sus mecanismos subyacentes nos dirige hacia nuevas oportunidades en el descubrimiento de nuevas estrategias. Además, los resultados de la investigación mecanicista permiten la identificación de biomarcadores para la detección de enfermedades, progresión y resultados, así como biomarcadores de exposiciones ambientales que proporcionan herramientas esenciales para la investigación molecular (9).

La transformación celular es un proceso producido por la activación metabólica inducida por la mayoría de los carcinógenos químicos. El descubrimiento de la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN) por Watson y Crick (1953) ha

sido un hito fundamental en la búsqueda de los constituyentes celulares que conducen al cáncer. Resulta llamativo observar como productos químicos puedan apuntar selectivamente a regiones de genes específicos como TP53 o APC dirigiendo un nexo directo entre las exposiciones químicas y diferentes tipos de cánceres. Debemos remarcar el hecho de que muchos de estos avances en investigación fueron debidos a numerosos descubrimientos realizados durante un determinado período de tiempo, en el que una explosión de técnicas de biología molecular se estaba desarrollando, incluida reacción en cadena de la polimerasa, secuenciación de ADN, etc. Tampoco es sorprendente que el ritmo de los descubrimientos que vinculan no sólo la exposición química, sino también otros factores exógenos y endógenos que contribuyen a la etiología de la tumorigénesis, coincidiera con este período de la biología molecular moderna y la bioquímica. Ahora se sabe que la etiología de la tumorigénesis es complicada e implica muchos niveles diferentes de regulación. Las vías moleculares endógenas también pueden causar mutaciones en genes críticos a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden dañar las macromoléculas celulares, incluido el ADN. Además, también es sabido que los productos químicos ambientales pueden interactuar con genes y vías metabólicas, creando un escenario que conduce a los complicados mecanismos que subyacen tumorigénesis (10, 11).

El proceso se inicia cuando las células tumorales han adquirido capacidad de diseminación e invasión en el tumor primario, proceso conocido como metástasis. Este proceso es complejo y se divide en varios pasos. Comienza con la generación de nueva vasculatura por parte del tumor primario (neoangiogénesis), seguidamente progresa hasta que comienza la invasión local a través de la matriz extracelular y las capas celulares del estroma circundante. Dentro de los vasos sanguíneos y linfáticos se produce una intravasación de células tumorales, que se diseminan a órganos distantes, este punto corresponde al paso donde se produce su extravasación al parénquima tisular. A partir de aquí las células comienzan a formar el nicho que

conducirá a la formación de micrometástasis y, en última instancia, de tumores macroscópicos, completando el proceso de colonización metastásica (Fig. 1.5) (12, 13).

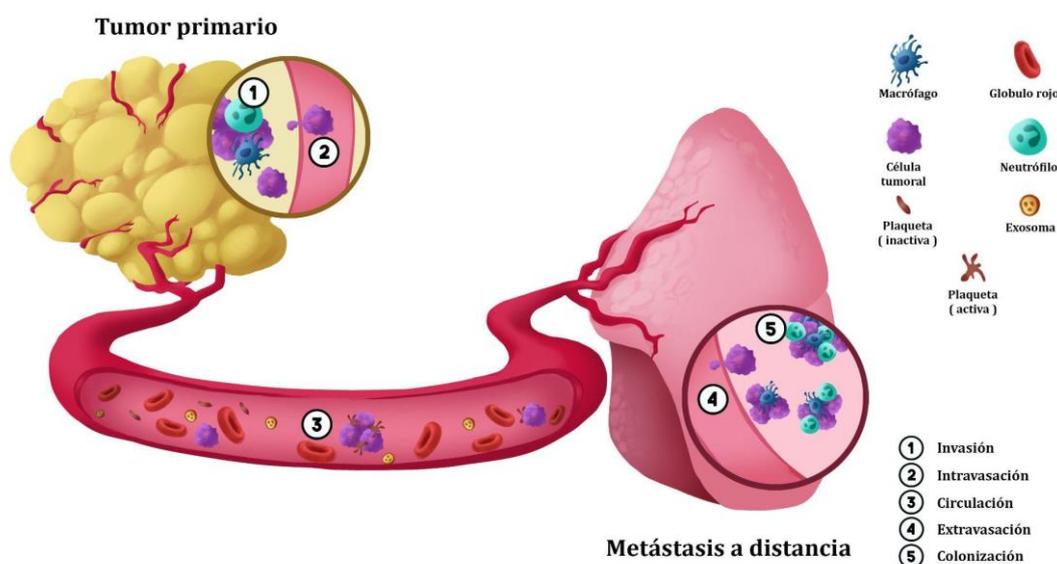


Figura 1.5: Proceso de colonización metastásica.

Las células cancerosas adquieren un potencial de replicación ilimitado en un proceso conocido como inmortalización celular (6), atribuible a ciertos daños en los mecanismos de mantenimiento y reparación del ADN, así como a la disfunción telomérica (8). Algunas células cancerosas serán destruidas con éxito por las células inmunitarias del huésped, pero otras lograrán sobrevivir por medio de varios mecanismos, el sistema inmunitario por tanto presenta dos vías de actuación diferentes en la oncogénesis, tanto en la promoción como en la prevención del cáncer (14).

Las células tumorales son capaces de evitar la apoptosis, proceso altamente regulado de muerte celular programada que ocurre en organismos multicelulares que permite a las células eliminarse a sí mismas sin causar daño a las células circundantes. La apoptosis juega un papel fundamental en muchos procesos, como el desarrollo normal y el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Su desregulación está

implicada en diversas enfermedades, como el cáncer, trastornos neurodegenerativos y enfermedades autoinmunitarias (15, 16).

Importante papel el que ejerce el microambiente tumoral (TME) o también llamado nicho, referido al entorno inmediato que rodea al tumor. Aparte de la población heterogénea de células cancerosas dentro de la masa tumoral, TME consiste en una variedad de células huésped infiltrantes y residentes, proteínas de la matriz extracelular y factores secretados. El crecimiento y la progresión del tumor se encuentran bastante influenciados por las interacciones de las poblaciones de células inflamatorias con las células tumorales y estromales del nicho, que en última instancia determinan el desarrollo del tumor, el establecimiento de metástasis o micrometástasis latentes e incluso la resistencia al tratamiento (Fig. 1.6) (6, 17).

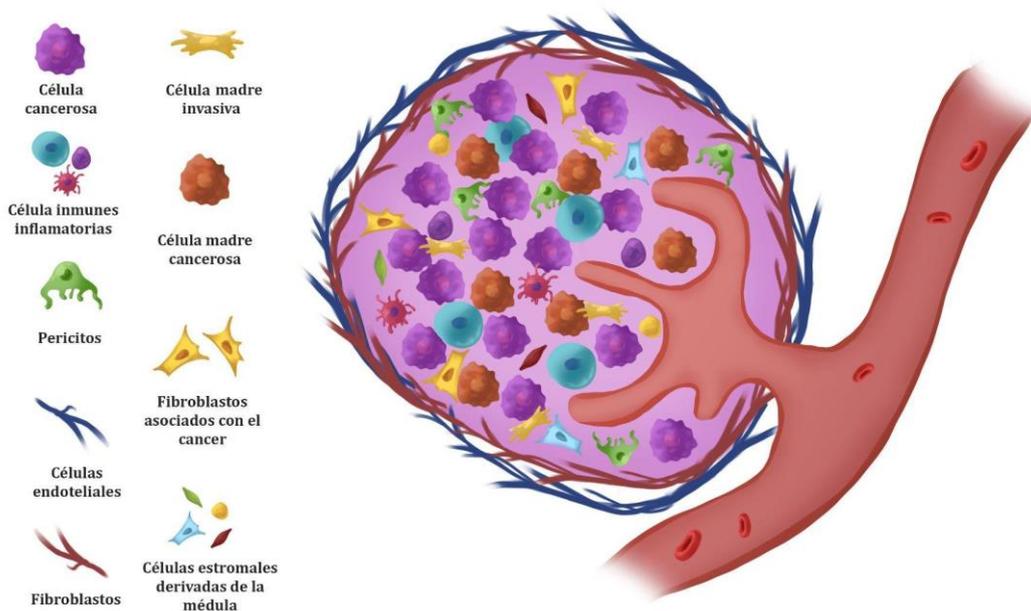


Figura 1.6: Microambiente tumoral.

1.2 Carcinomas cutáneos y melanoma

El carcinoma cutáneo es un tipo de cáncer que se desarrolla en la piel. Los cánceres de piel no melanoma (CPNM) se refieren a los tipos más comunes de cáncer de piel que se desarrollan lentamente en la epidermis, incluido el carcinoma de células basales (BCC), el carcinoma de células escamosas (SCC), así como otros tipos mucho más inusuales.

***Carcinoma de Células Basales (CCB):**

- Es el tipo más común de cáncer de piel.
- Suele desarrollarse en áreas expuestas al sol, como la cara y el cuello.
- Por lo general, crece lentamente y rara vez se propaga a otras partes del cuerpo.
- A menudo aparece como una lesión perlada o una úlcera que no cicatriza.

***Carcinoma de Células Escamosas (CCE):**

- Es menos común que el carcinoma de células basales, pero puede ser más agresivo.
- También se asocia con la exposición al sol, pero puede desarrollarse en áreas no expuestas al sol.
- Puede aparecer como una protuberancia roja, una úlcera que no cicatriza o una lesión escamosa (18).

El tratamiento del carcinoma cutáneo varía según el tipo y la etapa del cáncer. Las opciones de tratamiento pueden incluir la extirpación quirúrgica, la radioterapia, la terapia fotodinámica o, en algunos casos, medicamentos tópicos o sistémicos. La detección temprana y el tratamiento adecuado suelen tener buenos resultados en la mayoría de los casos. Además, la prevención, como el uso de protector solar y la

protección contra la exposición excesiva al sol, es crucial para reducir el riesgo de desarrollar carcinoma cutáneo (19).

El término CPNM tiene por objeto distinguir estos tipos más comunes de cáncer de piel del menos frecuente: el melanoma (19). El melanoma es una forma agresiva de cáncer de piel que se origina en los melanocitos (células productoras de melanina). Aunque es el tipo menos común de tumores cutáneos (~1%), es más agresivo y letal, y representa el mayor número de muertes causadas por cánceres de piel (16).

El melanoma cutáneo generalmente se debe a la exposición a la radiación ultravioleta de la luz solar natural y al bronceado en interiores, aunque existen varios subtipos que no están relacionados con la exposición a la radiación ultravioleta. Los melanomas primarios suelen tener una pigmentación oscura, pero pueden ser amelanóticos y el diagnóstico se basa en los resultados clínicos e histopatológicos. El melanoma primario se trata con escisión, con márgenes determinados por el grosor del tumor. El tratamiento depende del estadio de la enfermedad (después del examen histopatológico y, cuando esté indicado, de la biopsia del ganglio linfático centinela) y puede incluir cirugía, radioterapia, terapia dirigida o inmunoterapia de punto de control. Las terapias farmacológicas sistémicas se recomiendan como complemento de la cirugía en pacientes con metástasis locorregionales resecables y son la base del tratamiento en el melanoma avanzado. El tratamiento del melanoma avanzado es complejo, particularmente en aquellos con metástasis cerebral. La atención multidisciplinaria es esencial. Las terapias farmacológicas sistémicas, desde 2011 en adelante han aumentado la supervivencia en melanoma, en particular los inhibidores de puntos de control inmunológico (20).

1.2.1 Epidemiología

El melanoma cutáneo, es un problema de salud pública creciente en todo el mundo, la incidencia del melanoma cutáneo ha ido aumentando en los últimos años

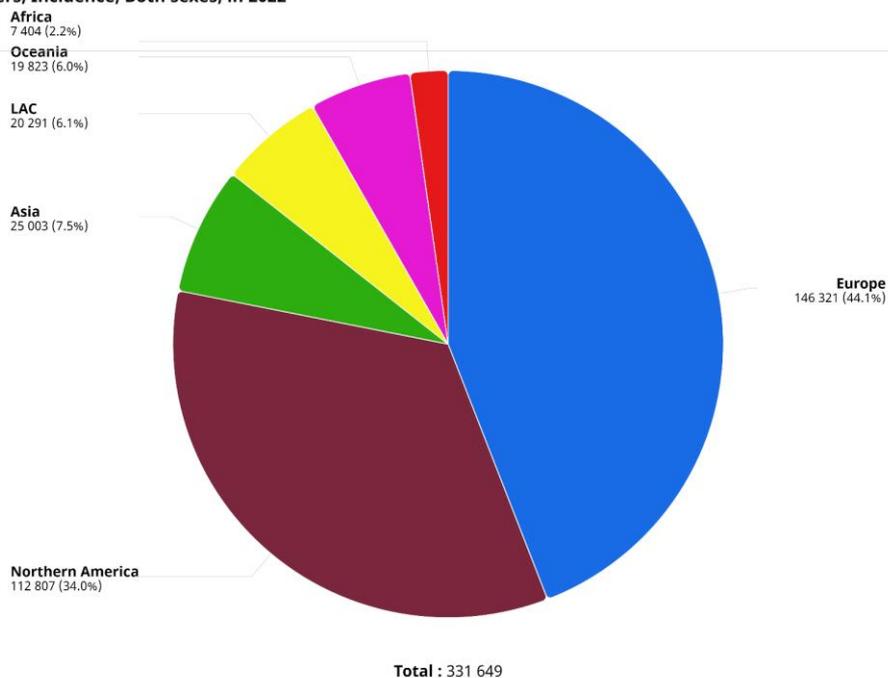
con un incremento en la incidencia del 0.6% anual entre los adultos (21), hasta convertirse en la tercera neoplasia cutánea maligna más común (22), representa el 1% de los casos de cáncer de piel y es el tumor cutáneo con el comportamiento biológico más agresivo por su alto porcentaje de mortalidad debido a su capacidad de inducir metástasis de manera precoz (23) con aproximadamente 10-25 casos por 100.000 habitantes en la población europea. En los Estados Unidos, ha experimentado un aumento considerable en su incidencia en las últimas décadas. En la actualidad, más de 100.000 personas son diagnosticadas anualmente con melanoma invasivo (24). En particular, en el año 2022 se diagnosticaron en España 7500 nuevos casos de melanoma cutáneo. A nivel mundial, el melanoma supone el 3.4% del total de casos oncológicos detectados. A pesar de representar sólo un bajo porcentaje de los casos de cáncer de piel, el melanoma es responsable del 90% de las muertes asociadas a tumores cutáneos (25).

La AIRC en su informe de 2022 estimó que el melanoma de piel fue responsable de 331.649 nuevos casos y 58.644 muertes en todo el mundo en 2022 en su registro de incidencias y mortalidad en el registro de GLOBOCAN (26) (Fig. 1.7).

Absolute numbers, Incidence, Both sexes, in 2022

Melanoma of skin
Continents

A



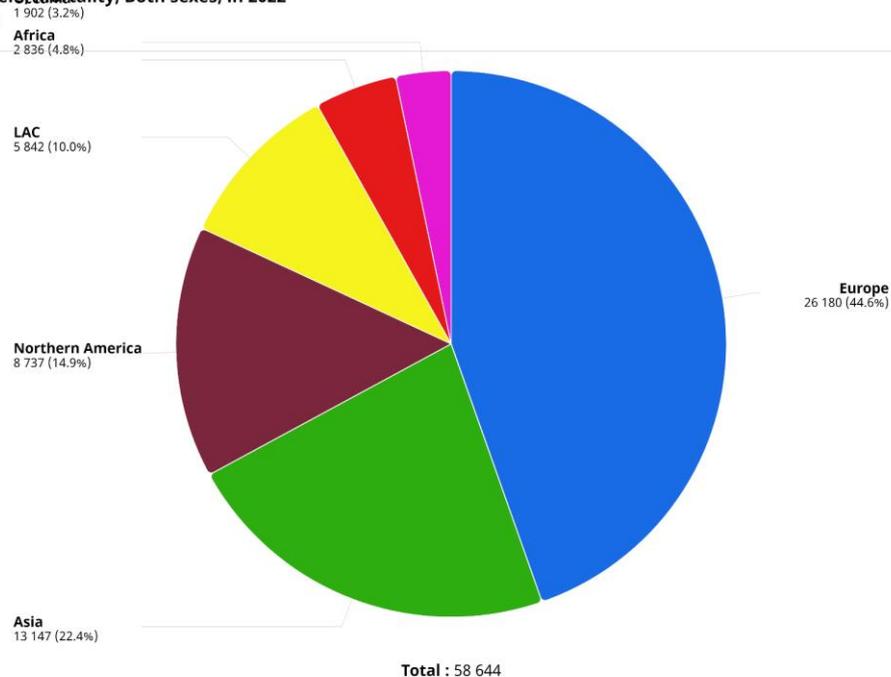
Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
Data version : Globocan 2022
© All Rights Reserved 2024



Absolute numbers, Mortality, Both sexes, in 2022

Melanoma of skin
Continents

B

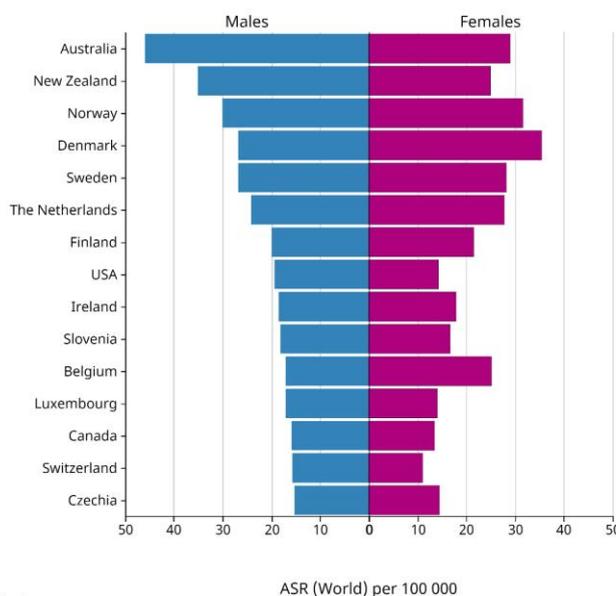


Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
Data version : Globocan 2022
© All Rights Reserved 2024



Figura 1.7: A) Gráficos circulares del número estimado de nuevos casos y B) de muertes por melanoma, en el mundo en 2022 para ambos sexos. Fuente: GLOBOCAN 2022.

Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Males and Females, in 2022
Melanoma of skin
Countries (Top 15)



Cancer TODAY | IARC - <https://gco.iarc.who.int/today>
Data version : Globocan 2022
© All Rights Reserved 2024

International Agency
for Research on Cancer
World Health
Organization

Figura 1.8: Gráfico dual sobre el ratio de incidencia y mortalidad en el mundo comparado por sexo. Incidencia (azul) y mortalidad (rojo). Fuente: GLOBOCAN 2022.

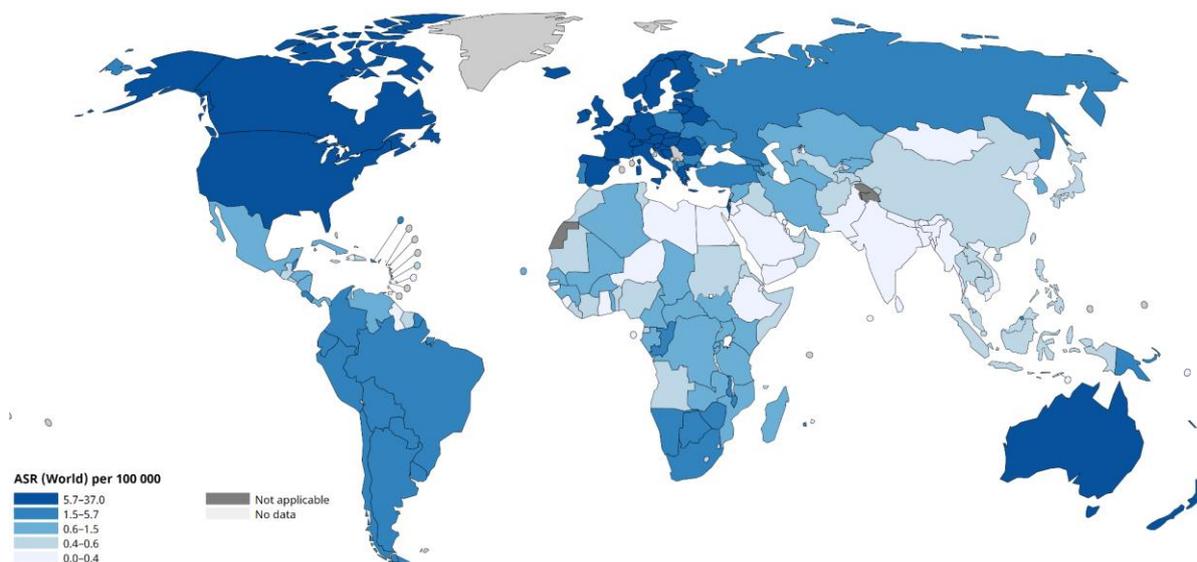
Cabe resaltar que la incidencia de melanoma también depende de la edad y el sexo. Se ha visto que aumenta exponencialmente con la edad, alcanzando los picos más altos en la séptima y octava décadas de la vida. Al observar la incidencia del melanoma en las distintas áreas geográficas esta diferencia se ve más clara entre la mayoría de las poblaciones de alto riesgo, como Australia y Nueva Zelanda, y el norte de Europa (27, 28) (Fig. 1.8). Además, a pesar de que el melanoma es menos común entre las personas menores de 40 años, se está convirtiendo en uno de los cánceres más notificados entre los adolescentes y adultos jóvenes en los Estados Unidos (29).

La melanina es un pigmento que se encuentra en la piel, el cabello y los ojos, y tiene la capacidad de absorber la radiación ultravioleta (UV) del sol. La melanina actúa como un filtro natural que proporciona cierta protección contra los daños causados por la radiación UV. Las personas con piel más clara tienen niveles más bajos de melanina, lo que significa que están menos protegidas contra la radiación

UV. La exposición crónica a la radiación UV proveniente del sol, se considera un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer de piel, incluido el melanoma (30).

Las diferencias geográficas se atribuyen a diferentes factores. Por ejemplo, los relacionados con la radiación UV incidente, la latitud o altitud así como las características atmosféricas, donde encontramos una mayor tasa de incidencia de melanoma en regiones como Nueva Zelanda, América del Norte y el norte de Europa (Fig. 1.9). De acuerdo con la razón mortalidad-incidencia (MIR), el melanoma es uno de los cánceres más tratables (MIR=21%), pero existe una diferencia entre los diferentes países en los resultados del tratamiento. En general, las personas en países con un índice de desarrollo humano (IDH) alto tienen más probabilidades de ser diagnosticadas con melanoma, pero las personas en países con un índice de desarrollo humano más bajo tienen más probabilidades de morir a causa de él (26, 31, 32).

Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Both sexes, in 2022
Melanoma of skin



All rights reserved. The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization / International Agency for Research on Cancer concerning the legal status of any country, territory, city or area or their authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate borderlines for which there may not yet be full agreement.

Cancer TODAY | IARC
<https://gco.iarc.who.int/today>
Data version: Globocan 2022
© All Rights Reserved 2024

International Agency
for Research on Cancer
World Health
Organization

Figura 1.9: Mapa global del ratio estimado en el mundo en 2022 de incidencia de melanoma en ambos sexos. Fuente: GLOBOCAN 2022.

Con respecto a la distribución anatómica del melanoma, generalmente se localizan en piel expuesta a la luz solar intensa, como cabeza y cuello, así como en extremidades. Sin embargo, también se han informado algunas diferencias dependientes de la edad, el sexo o la ubicación geográfica (33, 34).

1.2.2 Etiología

La etiología del melanoma es compleja y multifactorial. Se cree que la interacción de factores genéticos y ambientales contribuye al desarrollo de esta enfermedad. Algunos aspectos clave relacionados con la etiología del melanoma:

- Exposición al sol: La exposición excesiva a la radiación ultravioleta (UV) del sol es un factor de riesgo importante para el melanoma. La radiación UV puede dañar el ADN en las células de la piel y aumentar la probabilidad de mutaciones genéticas que pueden llevar al desarrollo de melanoma. El papel cancerígeno de los rayos UV es ampliamente conocido y representa un factor de riesgo clásico asociado con varios tipos de cáncer, incluido el melanoma. En este sentido, el daño solar acumulado (DSC) sirve de base para la actual clasificación de los melanomas de la OMS (35).
- Predisposición genética: Se ha observado que existe una predisposición genética al desarrollo de melanomas. Las personas con antecedentes familiares de melanoma tienen un mayor riesgo de desarrollarlo. Se han identificado varios genes asociados con un mayor riesgo de melanoma, como los genes CDKN2A y CDK4 (36, 37). Alrededor del 10% de las personas diagnosticadas con esta neoplasia cutánea tienen uno o más familiares de primer grado que han tenido melanoma anteriormente. Además, este tipo de SC tiende a ocurrir a edades más tempranas cuando tienen una presentación familiar.
- Fototipos de piel: Las personas con piel, ojos y cabello claros tienen un riesgo aumentado de desarrollar melanoma en comparación con aquellas con tonos de piel más oscuros. Los individuos con menor capacidad para broncearse y mayor propensión a quemarse también pueden tener un mayor riesgo (19).

- **Nevus Atípico o displásico:** La presencia de nevos atípicos o displásicos (irregulares en forma, tamaño o color) se ha asociado con un mayor riesgo de melanoma. Además, la presencia de un gran número de nevos en el cuerpo también puede aumentar el riesgo. Un 20-30% de los melanomas se originan en lesiones pigmentadas preexistentes (38).
- **Inmunosupresión:** Las personas con sistemas inmunológicos debilitados, ya sea debido a condiciones médicas o medicamentos inmunosupresores, tienen un riesgo aumentado de desarrollar melanoma (19).
- **Edad:** Aunque el melanoma puede ocurrir a cualquier edad, el riesgo aumenta con la edad.
- **Género:** En general, los hombres tienen un mayor riesgo de desarrollar melanoma en comparación con las mujeres. Sin embargo, las tasas en mujeres están aumentando más rápidamente (19).
- **Historial de quemaduras solares:** Experiencias pasadas de quemaduras solares, especialmente en la infancia, aumentan el riesgo de melanoma (19, 37). En promedio, una persona tiene el doble de posibilidades de desarrollar un melanoma si ha tenido más de 5 quemaduras solares a lo largo de su vida (37) o si solo ha sufrido una quemadura solar con ampollas durante su infancia o adolescencia (39).

Actualmente, no existe un conocimiento completo de los mecanismos moleculares que subyacen a la tumorigénesis, ni de la transformación de nevos a melanoma. Pero si se han determinado mutaciones asociadas con el desarrollo del melanoma; unas son adquiridas por la persona a lo largo de su vida y otras heredadas. La mayoría de los melanomas son debidos a mutaciones somáticas adquiridas, asociadas a la radiación UV. Algunas de las mutaciones más comunes en melanoma son:

-**BRAF:** Las mutaciones en el gen BRAF son muy frecuentes en el melanoma. La mutación V600E es la más común. BRAF es parte de una vía de señalización celular llamada MAPK, que regula el crecimiento y la proliferación celular. La activación anormal de BRAF puede contribuir al desarrollo del melanoma. Esta vía de señalización, y BRAF en particular, el interés en este oncogén es debido a que

solamente se encuentra activo en células malignas, por lo que sería fácil de abordar su tratamiento (40, 41).

-CDKN2A (p16): Las mutaciones en el gen CDKN2A, que produce la proteína p16, son comunes en el melanoma. La proteína p16 regula el ciclo celular y la estabilización de *TP53*, su pérdida de función puede conducir a una proliferación celular no controlada. Entre las mutaciones hereditarias, que representan el 5-12% de los melanomas, las más comunes se encuentran en la vía CDKN2A que está presente en el 40% de los melanomas hereditarios (41).

-NER: Las mutaciones en los genes *NER*, que están asociados con la reparación del daño del ADN inducido por la radiación, dan como resultado mutaciones acumuladas en la piel causadas por la radiación UV o los cancerígenos químicos y, por lo tanto, un mayor riesgo de CP (40, 41).

-NRAS: Las mutaciones en el gen NRAS también son comunes en el melanoma. NRAS pertenece a la misma vía de señalización MAPK que BRAF. Las mutaciones en NRAS pueden activar la vía MAPK y promover el crecimiento celular descontrolado

-KIT: Algunos melanomas, especialmente aquellos que se desarrollan en áreas del cuerpo que no están expuestas al sol, pueden tener mutaciones en el gen KIT. KIT está involucrado en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular.

-PTEN: Las mutaciones en el gen PTEN también pueden estar presentes en el melanoma. PTEN es un supresor tumoral que regula la proliferación celular y la supervivencia celular (40, 42).

1.2.3 Estadios

El American Joint Committee on Cancer (AJCC) es una organización que desarrolla y publica sistemas de estadificación para varios tipos de cáncer, incluido el

melanoma. La estadificación es un proceso que ayuda a determinar la extensión del cáncer en el momento del diagnóstico, lo que es crucial para planificar el tratamiento y prever el pronóstico del paciente.

La octava edición del sistema de estadificación del melanoma de la AJCC (2017) clasifica el melanoma en estadios según varios factores, como el grosor del tumor, la ulceración, la presencia de metástasis ganglionares y la presencia de metástasis a distancia. Estos factores se utilizan para asignar un número de estadio del I al IV al melanoma (19).

● Estadio 0: Se refiere a melanoma in situ, que implica que las células de melanoma se encuentran confinadas a la epidermis sin atravesar la capa basal. Es muy poco probable que esta etapa disemine a distancia.

● Estadio I: El tumor primario aún es muy delgado (<1 mm), localizado pero invasivo, llegando a capas más profundas de la piel. Este estadio se subdivide en 2 subgrupos, IA o IB, según el grosor (<0.8 o >0.8 mm) y se tiene en cuenta la presencia o ausencia de ulceración.

Los estadios 0 e I se consideran melanomas tempranos localizados, no diseminados (Fig. 1.10).

● Estadio II: el tumor primario es más grueso (>1 mm), se extiende a través de la epidermis y en profundidad de la dermis papilar. En estos casos, se recomienda una biopsia de ganglio centinela para verificar si las células de melanoma se han diseminado a los ganglios linfáticos locales. El estadio II se divide en 3 subgrupos, IIA, IIB o IIC, dependiendo también del grosor y la ulceración, lo que condiciona el riesgo de propagación y la pauta de tratamiento.

Los melanomas en estadio II se consideran melanoma de riesgo intermedio o alto, todavía localizados, pero con más probabilidades de diseminación.

● Estadio III: este estadio corresponde al melanoma que ha diseminado localmente en la propia piel a más de 2 cm del tumor primario, o a través del sistema linfático a uno o más ganglios linfáticos locales (ganglio centinela). Este fenómeno se denomina

metástasis en tránsito o metástasis satélite. Esta etapa también se puede dividir en 4 subgrupos (IIIA, IIIB, IIIC o IIID) según el tamaño y la cantidad de ganglios linfáticos involucrados, si el tumor primario tiene metástasis satélite o en tránsito y la presencia de ulceración.

● **Estadio IV:** esta etapa describe los melanomas que se han diseminado a través del torrente sanguíneo a áreas distantes, y también se pueden subclasificar según si ha diseminado solo a piel o tejidos blandos distantes (M1a), a otros órganos distantes como el pulmón (M1b) o a otras localizaciones no relacionadas o relacionadas con el sistema nervioso central (M1c o M1d, respectivamente).

Los estadios III y IV se consideran melanomas avanzados, se diseminan más allá del tumor primario a partes distantes del cuerpo y, por lo tanto, se asocian con un mal pronóstico y peores resultados del tratamiento (11, 20) (Fig. 1.10).

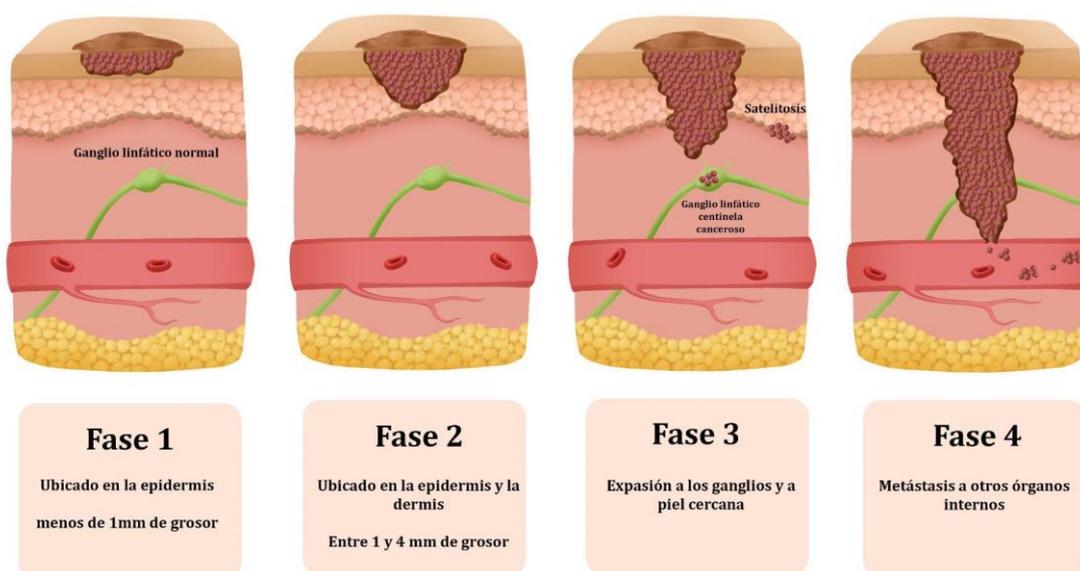


Figura 1.10: Etapas de la progresión del tumor en el melanoma según la AJCC.

Gracias a la identificación de factores moleculares implicados en la patogénesis de la transformación maligna y a los datos preclínicos del perfilado

genético de los melanocitos, están surgiendo nuevas dianas terapéuticas. En la actualidad se plantean nuevos desafíos diagnósticos, de biología molecular y genéticos, así como la búsqueda de biomarcadores del melanoma y nuevas opciones terapéuticas para estos pacientes (34).

1.2.4 Melanoma, subtipos histopatológicos

El “gold standard” para el diagnóstico del melanoma es la histopatología a día de hoy, a pesar de los rápidos y recientes avances en el análisis molecular de los tumores, que permiten el estudio genómico a gran escala y de alta resolución, en conjunto con las características clínicas y el estudio histogenético de la inmunohistoquímica. Los descubrimientos, como las mutaciones *BRAF*^{V600E} que son en su mayoría comunes en melanomas en piel expuesta al sol y los estudios seminales sobre la progresión y evolución del melanoma, fueron el fundamento para la nueva Clasificación de melanoma de la OMS (43): es una clasificación de los melanomas con criterios histológicos, epidemiológicos, clínicos y genéticos. Los melanomas se dividen en aquellos etiológicamente relacionados con la exposición crónica al sol y los que no, según sus firmas mutacionales, localización anatómica y epidemiología. Sobre la base del grado de elastosis solar asociada, los melanomas en la piel expuesta al sol se dividen según el grado histopatológico de daño solar acumulativo (DSC) de la piel circundante, en bajo y alto DSC. En el grupo de melanomas con baja DSC se incluyen los Melanomas de Extensión Superficial (MES), mientras que los melanomas con alto DSC abarcan el Melanoma Lentigo Maligno y los Melanomas Desmoplásicos. La clasificación "no CSD" incluye Melanomas Acrales, algunos Melanomas sobre Nevus Congénitos Gigante, Melanomas sobre Nevus Azules Celulares, Melanomas de Spitz, Melanomas de las Mucosas y Melanomas Uveales. El Melanoma Nodular y el Melanoma Nevoide pueden ocurrir por cualquier vía. Se propone un grupo de tumores intermedios denominado Melanocitoma para tumores que, además de mutaciones que activan la vía MAPK, albergan múltiples mutaciones conductoras y

son de bajo o alto grado, para indicar que pueden conllevar un mayor riesgo de transformación en cáncer (38).

En el diagnóstico histopatológico general de los melanomas se tiene en cuenta los siguientes criterios: La pobre circunscripción de la lesión; la asimetría; la variación tamaño, forma y confluencia de los nidos de melanocitos; la ausencia de fenómenos de maduración; la atipia celular con núcleo y nucléolo eosinófilo prominente; el incremento de la relación núcleo/citoplasmática; la actividad mitótica; necrosis individual de melanocitos y la presencia de infiltrado inflamatorio (42).

Los 4 subtipos más frecuentes de melanoma reconocidos por la Organización Mundial de la Salud (Elder et al. 2018) (39) son:

- **Melanoma de Extensión Superficial (MES)**, que es el subtipo más frecuente, representando el 70% de los melanomas. Por lo general, se desarrolla a partir de un melanoma in situ en fase de crecimiento radial, presentan el característico crecimiento pagetoide intraepitelial; variabilidad en el tamaño de los nidos tumorales en la unión dermoepidérmica, melanocitos atípicos con incremento del tamaño nuclear y prominente nucléolo; ligera pigmentación citoplasmática; posible extensión a lo largo de folículos pilosebáceos o conductos ecrinos; el melanoma puede invadir con células aisladas en la dermis papilar superficial con escasas mitosis o puede formar nidos expansivos grandes con mitosis (fase de crecimiento vertical); presencia de infiltrado inflamatorio a lo largo del frente de crecimiento y en ocasiones puede ulcerar la superficie epidérmica (43).

- **Melanoma Léntigo Maligno (MLM)**, que tiende a ocurrir en ancianos. Se encuentra comúnmente en lugares más expuestos a la luz solar, como la cara, pabellón auricular o extremidades superiores y generalmente muestra elastosis solar severa. En su historia natural comienza en una fase previa de crecimiento radial in situ (Léntigo Maligno) con proliferación de melanocitos atípicos a lo largo de la membrana basal (lentiginoso) más que pagetoide para posteriormente infiltrar a lo largo de la unión dermoepidérmica los melanocitos epitelioides o nevoides atípicos con escasas mitosis,

que producen adelgazamiento de la epidermis y pérdida de las crestas epidérmicas (43).

- **Melanoma Nodular (MN)**, que representa alrededor del 15% de todos los melanomas, el segundo en frecuencia. A menudo se desarrolla rápidamente como un nódulo en la piel y suele ser muy pigmentado adoptando un color negruzco, pero puede ser rosado o rojizo en caso de ulceración. El MN solo muestra crecimiento vertical y está compuesto por células neoplásicas pleomórficas, más a menudo epitelioides, pero también están presentes células fusiformes y/o mixtas con citoplasma pálido, núcleos escotados con nucléolo eosinófilo prominente, presencia de pseudoinclusiones nucleares y fenómenos de multinucleación dispuestas en grupos o crecimiento en sábana localizadas en la unión dermoepidérmica y en profundidad en la dermis. La presencia de melanófagos con abundante pigmento es habitual. El patrón de crecimiento pagetoide es inusual (43).

- **Melanoma Lentiginoso Acral (MLA)**, cuya localización en áreas cutáneas desprovistas de pelos como son las palmas de las manos, plantas de los pies o el lecho ungueal y no está tan relacionado con la exposición al sol como otros subtipos. Constituido por una proliferación (a lo largo de la base de la epidermis) de melanocitos atípicos con núcleos hipercromáticos que incluye diferentes tipos de células (fusiformes, epitelioides) y en ocasiones con reacción desmoplásica (Fig. 1.11) (43).

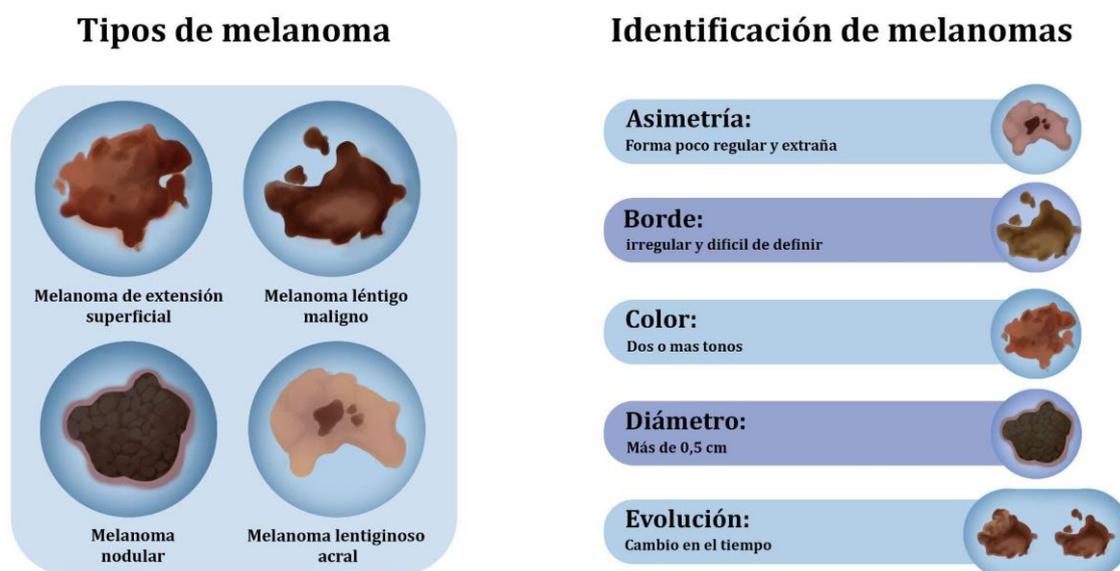


Figura 1.11: Tipos de melanoma. Los 4 subtipos más frecuentes de melanoma reconocidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

1.3 Genética del melanoma

1.3.1 Mutaciones de la línea germinal

Las mutaciones de la línea germinal son alteraciones genéticas que ocurren en el ADN de las células reproductivas (óvulos y espermatozoides) y pueden transmitirse de una generación a otra. Estas mutaciones están presentes en todas las células del cuerpo de un individuo y pueden aumentar el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades, incluido el melanoma.

CDKN2A, *CDK4* y la proteína 1 asociada a *BRCA1* (*BAP1*) son genes clasificados como de alto riesgo de susceptibilidad para el desarrollo del melanoma. Son genes autosómicos dominantes por lo que la transmisión de la enfermedad es vertical.

© *CDKN2A* (p16INK4a o p16) mencionada anteriormente, actúa como supresor de tumores regulando el crecimiento celular y evitando el desarrollo de

cáncer. Las mutaciones o cambios en el gen *CDKN2A* pueden provocar una alteración de la capacidad para suprimir el crecimiento tumoral, lo que puede aumentar el riesgo de cáncer. Se ha demostrado que las mutaciones de *CDKN2A* son más comunes en los melanomas que han diseminado (melanoma metastásico) que en los melanomas localizados que no se han diseminado. Las personas de piel clara y personas con antecedentes de exposición crónica tienen más posibilidades de portar las mutaciones *CDKN2A*. Su presencia afecta al pronóstico y al tratamiento del melanoma y determina el tratamiento a seguir. Se han encontrado variables modificadoras del huésped en familias propensas a melanoma con mutaciones *CDKN2A*: nevus atípicos/displásicos, mayor número de nevus y tendencia a quemarse por el sol. La radiación UV modifica el riesgo de melanoma en familias con mutación *CDKN2A* (36). En comparación con los pacientes sin estas mutaciones aquellos pacientes con mutaciones *CDKN2A* tienen una peor respuesta a las terapias dirigidas a *BRAF* y *MEK* o a los inhibidores de puntos de control inmunológico (anti-PD-1) (40).

© El gen *CDK4* codifica la proteína quinasa 4 dependiente de ciclina, está implicada en la regulación del ciclo celular. Cuando se encuentra sobreexpresada, puede provocar un exceso de proteínas fosforiladas, acelerando el ciclo celular y por lo tanto aumentando la proliferación de células de melanoma. (44).

© **MC1R** (receptor de melanocortina 1) es una proteína ubicada en la superficie de los melanocitos. MC1R juega un papel en la determinación del tipo y la cantidad de pigmento producido por los melanocitos y participa en la respuesta de la piel a la radiación ultravioleta. Las personas con la variación de este gen tienen un mayor riesgo de desarrollar melanoma, y más pronunciado si portan también mutaciones de *CDKN2A* (39).

© **BAP1** es una proteína codificada por el gen *BAP1*. Está implicada en la regulación del crecimiento y la división celular y también participa en la reparación del daño del ADN. *BAP1* puede interactuar con vías de señalización implicadas en la regulación del crecimiento y la división celular, como las vías MAPK y PI3K. Algunos estudios han sugerido que *BAP1* puede desempeñar un papel en el desarrollo y

progresión del melanoma, además de interactuar con otras proteínas implicadas en la reparación del daño del ADN, como BRCA1 y TP53. Los melanomas con mutación *BAP1* tienen características clínicas y patológicas distintas, incluida una edad de presentación más joven en el momento del diagnóstico, una mayor frecuencia de melanomas primarios múltiples, melanoma uveal y un perfil de expresión genética distinto (41).

© **MITF** (factor de transcripción asociado a microftalmia) desempeña un papel fundamental en el desarrollo de los melanocitos, así como en su función, supervivencia y proliferación, y se considera el gen maestro de la homeostasis de los melanocitos y un factor crítico en la biología del melanoma. MITF interactúa con la vía MAPK en melanomas, que participa en la regulación del crecimiento y la división celular. MITF también puede interactuar con otras proteínas implicadas en la regulación de la pigmentación, como MC1R, y con proteínas reparadoras de daños en el ADN, como TP53 (45). Niveles bajos de expresión de MITF se asocian con la resistencia a la quimioterapia en líneas celulares de melanoma (46).

1.3.2 Mutaciones somáticas

Además de las alteraciones de la línea germinal descritas anteriormente, pueden ocurrir muchas alteraciones somáticas. Las mutaciones somáticas son alteraciones en la secuencia de ADN que ocurren en células no reproductoras, también conocidas como células somáticas. Estas mutaciones pueden surgir de diversas fuentes, como la exposición a factores ambientales como la radiación o productos químicos, errores durante la replicación del ADN o daños espontáneos en el ADN. A diferencia de las mutaciones germinales, que ocurren en las células que dan origen a los óvulos y espermatozoides y pueden transmitirse a la descendencia, las mutaciones somáticas no se heredan y no afectan a las generaciones futuras.

Las mutaciones somáticas pueden tener implicaciones significativas para la salud de un individuo, ya que pueden contribuir al desarrollo de diversas enfermedades, incluido el cáncer. A menudo, el cáncer se asocia con la acumulación

de mutaciones somáticas en genes que regulan el crecimiento celular, la proliferación y la reparación del ADN. Estas mutaciones pueden alterar los procesos celulares normales, lo que lleva a un crecimiento descontrolado y la formación de tumores.

***BRAF*^{V600E}**, la mutación *BRAF* es la más común en el melanoma (40 a 50% de los casos). Esta mutación conduce a la activación constante de la vía RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK, (vía de señalización implicada en el crecimiento y la división celular. Se activa mediante factores de crecimiento y otras moléculas de señalización, y desempeña un papel fundamental en el desarrollo del cáncer), que se asocia con la forma más agresiva de melanoma. Los ensayos clínicos de fase III como el ensayo BRIM-3, BREAK-3, COMBI-d, COMBI-v y COLUMBUS son ejemplos importantes de la lista completa de ensayos centrados en el tratamiento del melanoma con la mutación *BRAF*^{V600E}. Combinar inhibidores de BRAF con inhibidores de MEK, conduce a mejores tasas de respuesta y resistencia retardada en comparación con la monoterapia con inhibidores de BRAF, como en los ensayos COMBI-d y COMBI-v, pero la resistencia a los inhibidores de BRAF a menudo implica la activación de vías de señalización paralelas. También la combinación de inhibidores de BRAF con inhibidores dirigidos a la vía PI3K/AKT/mTOR o la vía del receptor tirosina quinasa (como los inhibidores de EGFR o MEK) se ha mostrado prometedora en estudios preclínicos (47).

La mutación *BRAF*^{V600K} ocurre cuando la valina en la posición 600 en la proteína BRAF se reemplaza por lisina. Es menos común que la mutación V600E y ocurre en aproximadamente 5 a 10% de los melanomas. La mutación en V600E y V600K da como resultado una activación anormal de la proteína BRAF dando respuestas al tratamiento menos efectivas, con un efecto mayor en pacientes con la mutación V600K si son comparados con los que portan la mutación V600E (48).

Las mutaciones puntuales, mutaciones de inserción y deleción y amplificación en el gen *NRAS* o *KRAS*, miembro de la familia de proteínas RAS, activan factores de crecimiento y otras moléculas de señalización en el melanoma y pueden conducir a la activación constante de la vía RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK (49).

Las vías MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) son vías de señalización que transmiten señales desde estímulos extracelulares al interior de las células. Las vías MAPK se activan mediante una variedad de estímulos, incluidos factores de crecimiento, hormonas y señales de estrés, y desempeñan funciones importantes en muchos procesos celulares, incluida la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Hay varios tipos diferentes de vías MAPK, incluida la vía ERK (quinasa regulada por señales extracelulares), la vía JNK (quinasa N-terminal c-Jun) y la vía p38. Cada una de estas vías consta de una serie de proteínas que transmiten la señal desde la superficie celular al interior de la célula, lo que en última instancia conduce a cambios en la expresión genética y otras respuestas celulares. Dos mutaciones en las vías MAPK pueden desempeñar un papel en el desarrollo del melanoma. Una de estas mutaciones es una mutación en el gen *BRAF*, que codifica una proteína que es un componente clave de la vía MAPK. Esta mutación conduce a la activación de la vía MAPK, que puede promover la proliferación y supervivencia de las células cancerosas. La otra mutación está en el gen *NRAS*, que codifica otra proteína implicada en la vía MAPK. Esta mutación también activa la vía MAPK y puede contribuir al desarrollo del melanoma.

PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) es un gen que codifica la proteína PTEN, que es una proteína supresora con un papel crucial en la regulación del crecimiento, la división y la supervivencia celular. Las mutaciones puntuales, deleciones, inserciones y reordenamientos están asociadas con varios tipos de cánceres, incluido el melanoma. PTEN regula negativamente la vía de señalización PI3K/AKT, que participa en el crecimiento, la supervivencia y el metabolismo celular. La pérdida de la función PTEN conduce a un aumento de la señalización de PI3K/AKT, lo que promueve la proliferación y supervivencia celular y contribuye potencialmente al crecimiento y la progresión del melanoma y además se ha correlacionado con melanomas primarios más gruesos, estadio avanzado de la enfermedad y peor pronóstico.

KIT es un receptor tirosina quinasa. Se activa mediante la unión de un factor de crecimiento llamado factor de células madre. Se han identificado mutaciones

activadoras en el gen *KIT* en el melanoma y pueden conducir a la activación constante de la vía RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK. C-KIT es un receptor tirosina quinasa que actúa como receptor del ligando del factor de células madre (SCF), y la señalización de c-KIT-SCF es necesaria para el desarrollo melanocítico. Las mutaciones en el gen c-KIT son poco comunes en el melanoma, con una incidencia de aproximadamente 1 a 2%. Sin embargo, cuando ocurren, las mutaciones somáticas específicas más frecuentes en el gen *c-KIT* en el melanoma incluyen la mutación *KIT*^{D816V}. D816V es importante ya que esta mutación implica la sustitución de un aminoácido valina por un ácido aspártico en la posición 816 de la proteína c-KIT. Sin embargo, en el melanoma, la mutación D816V en el gen *KIT* es mucho menos común y típicamente se asocia con melanomas acrales o de las mucosas (50).

También se observan mutaciones somáticas de **NF1** (neurofibromina 1) en un subconjunto de melanoma (10-25% de los casos). En el melanoma se identificaron muchas mutaciones somáticas, como mutaciones sin sentido, mutaciones de cambio de marco, mutaciones en el sitio de empalme o grandes deleciones en el gen, lo que resulta en la pérdida de función de la proteína NF1. Esto conduce a la desregulación de las vías de señalización posteriores, como la vía Ras-MAPK que promueve el crecimiento y la supervivencia celular. Las mutaciones somáticas de NF1 a menudo coexisten con otras alteraciones genéticas, en particular las mutaciones BRAF y NRAS, que son comunes en el melanoma. La presencia simultánea de mutaciones de NF1 con mutaciones BRAF o NRAS puede influir en la progresión de la enfermedad y la respuesta a las terapias dirigidas (51).

La tasa de mutación en *ERBB4* en melanoma es relativamente baja en comparación con otras alteraciones genéticas como las mutaciones. Suelen ser mutaciones puntuales, cambios en un solo nucleótido en la secuencia del gen.

El gen *TERT*, también conocido como telomerasa transcriptasa inversa, codifica la subunidad catalítica de la telomerasa, una enzima implicada en el mantenimiento de la longitud de los telómeros. Una de las alteraciones genéticas del gen *TERT* más comunes en el melanoma es la presencia de mutaciones en la región promotora de *TERT*. Estas mutaciones dan como resultado un aumento de la

expresión de TERT y la activación de la telomerasa, lo que lleva al mantenimiento de la longitud de los telómeros y a una mayor proliferación celular. Múltiples estudios han informado una alta prevalencia de mutaciones del promotor *TERT* en el melanoma, particularmente en casos con características clínicas agresivas y mal pronóstico (52).

1.3.3 Regiones no codificantes

Las técnicas como la secuenciación por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP-seq) y la secuenciación de ARN (RNA-seq) han sido fundamentales para investigar estas regiones no codificantes y su implicación en el melanoma. Por ejemplo, la ChIP-seq permite identificar las regiones de unión del ADN a proteínas específicas, como factores de transcripción, lo que proporciona información sobre cómo se regulan los genes en las células de melanoma. Mientras que la RNA-seq permite analizar la expresión de ARN no codificante y codificante, lo que ayuda a comprender cómo los cambios en la expresión génica pueden influir en la progresión del melanoma y en la respuesta al tratamiento.

En el contexto del melanoma, los miARN han ganado una atención significativa como posibles biomarcadores y objetivos terapéuticos debido a su participación en el inicio, la progresión y la metástasis del melanoma. La desregulación de los miARN en el melanoma puede ocurrir a través de varios mecanismos, incluidas alteraciones genéticas, modificaciones epigenéticas y cambios en su maquinaria de procesamiento. Se han observado perfiles de expresión de miARN alterados en el melanoma en comparación con la piel normal, y se han identificado miARN específicos como oncogenes o supresores de tumores en función de sus efectos sobre el crecimiento, la invasión y la respuesta inmunitaria de las células del melanoma.

Los miARN en el melanoma participan en la regulación de varias vías de señalización clave y pueden modular la expresión de genes diana involucrados en estas vías, afectando procesos celulares críticos para el desarrollo y la progresión del

melanoma. Además, los miARN se han implicado en los mecanismos de evasión inmunitaria del melanoma, así como en la regulación de la expresión de moléculas de puntos de control inmunitarios como PD-L1, CTLA-4 y TIM-3, modificando de esta forma la respuesta inmunitaria contra las células de melanoma. Los miARN desregulados en el melanoma también pueden afectar el microambiente del tumor, incluida la regulación de la angiogénesis, la inflamación y la remodelación de la matriz extracelular (53).

Los melanomas suelen tener una patogenia genómica limitada, que afecta a un grupo reducido de vías moleculares siendo las principales:

1. *La vía MAPK/ERK* (quinasas MAP, también conocidas como ERK), que comprende varias quinasas MAP2K1, MAP3K, MAP2K o TRK reguladas por factores extracelulares. En esta ruta, la señal es transmitida hasta el núcleo a través de proteínas como RAS o RAF y factores de transcripción como MYC.
2. *La vía PI3K/AKT/mTOR* de la fosfatidilinositol-3-quinasa.
3. La vía del oncogén p53.
4. La vía del MITF.
5. La vía del NFκB.
6. La vía del ciclo celular (Punto G1/S).
7. La vía WNT y la regulación apoptótica.
8. La vía de la remodelación de cromatina SWI/SNF. (54–58)

1.4 Rutas patogénicas en neoplasias melanocíticas

A pesar de que los nevus son tumores con mutaciones, estas son insuficientes para transformar a la célula en invasiva o metastásica. Por el contrario, los nevus melanocíticos tienen un crecimiento limitado debido al proceso de senescencia, mediante el cual una célula fracasa en su reingreso en el ciclo celular, no perpetuando, por lo tanto, el proceso mitótico (59). Varios mecanismos se encargan de inducir senescencia, los mecanismos más conocidos son el representado por los genes supresores de tumores p53 y p16 (60).

Si un nevus experimenta cambios genéticos y epigenéticos adicionales, puede escapar a los mecanismos de senescencia, convirtiéndose en una lesión intermedia con bajo o alto riesgo de progresar o, finalmente, en un melanoma. Mediante esta interpretación se han identificado varias rutas patogénicas (60, 61). Algunas de las rutas están relacionadas con la exposición solar como causa etiológica, pero otras no. El surgimiento *de novo* de un melanoma que posea directamente propiedades infiltrantes es difícil de explicar genéticamente, ya que requeriría un cúmulo de eventos genéticos catastróficamente ocurridos de golpe, como la cromoptosis o la cromoplexia (62) ambas infrecuentes. Alternativamente, algunos autores han sugerido que melanocitos histológicamente normales, podrían, sin embargo, tener mutaciones iniciales que no induzcan proliferación (p. ej., en *CDKN2A* o en el promotor de *TERT*) (62,63).

Las rutas reconocidas por la OMS se detallan a continuación (Fig. 1.12) (64).

Rutas patogénicas simplificadas identificadas por la OMS en la formación de los distintos tipos de melanoma

Ruta	Precursores benignos	Formas intermedias de la ruta	Tipo de melanoma	Alteraciones genéticas implicadas en la ruta
I	Nevus melanocítico	Displasia melanocítica	De extensión superficial	<i>BRAF, NRAS, CDKN2A</i>
		Melanocitoma con inactivación de <i>BAP1</i>	Melanoma por inactivación de <i>BAP1</i>	<i>BRAF, NRAS, BAP1</i>
		Melanocitoma penetrante profundo	Melanoma penetrante profundo	<i>BRAF, NRAS, CTNNB1, APC</i>
		Melanocitoma epitelioide pigmentado	Melanoma epitelioide pigmentado	<i>BRAF, PRKARIA, PRKCA</i>
II	¿Proliferación intraepidérmica benigna sin atipia?	Lentigo maligno	Melanoma lentigo maligno	<i>NRAS, BRAF, KIT, CDKN2A</i>
III	¿Proliferación intraepidérmica benigna sin atipia?	Melanoma in situ	Melanoma desmoplásico	<i>NF1, ERBB2, MAP2K1, BRAF, MET, TERT, NRAS, PIK3CA</i>
IV	Nevus de Spitz	Melanocitoma de Spitz	Melanoma de Spitz	<i>HRAS, ALK, ROS1, RET, NTRK1, NTRK3, BRAF</i> (reordenamientos), <i>MET, CDKN2A</i>
V	¿Nevus acral?	Melanoma in situ acral	Melanoma acral	<i>KIT, NRAS, BRAF, NTRK, ALK, NF1, CDKN2A, CCDN1</i>
VI	¿Melanosis de mucosas?	Melanoma in situ de mucosas	Melanoma lentiginoso de mucosas	<i>KIT, NRAS, KRAS, BRAF, NF1, CDKN2A, CCDN1, MDM2</i>
VII	Nevus congénito	Melanocitoma en nevus congénito	Melanoma en nevus congénito	<i>NRAS, BRAF</i> (mutaciones y reordenamientos)
VIII	Nevus azul	Melanocitoma del tipo nevus azul celular	Melanoma en nevus azul	<i>GNAQ, GNA11, BAP1</i>
IX	¿Nevus uveal?	¿?	Melanoma uveal	<i>GNAQ, GNA11, BAP1</i>

Figura 1.12: Rutas patogénicas implicadas en los distintos tipos de melanoma.

Tomado de (59) Fernández-Flores y colaboradores han resumido las rutas en el melanoma:

● *Ruta I (baja exposición solar)*: acaba en el melanoma tradicionalmente conocido como «de extensión superficial». El 90% de los tumores melanocíticos de esta ruta presentan mutaciones en el gen *BRAF*, siendo la más frecuente la mutación V600E. Las mutaciones en *NRAS* son mucho menos frecuentes.

A este tipo de melanoma se puede llegar por distintos caminos:

- A través de una displasia de bajo grado primero y de alto grado después.
- A través de la inactivación del gen *BAP1*.
- A través de un nevus penetrante profundo.
- A través de un melanocitoma epitelioides pigmentado,

A estas tres situaciones previas le seguirían mutaciones adicionales después.

En esta ruta no es infrecuente que en las fases próximas a la malignidad pierda la expresión de p16 por alteraciones del gen *CDKN2A* (65). Sin embargo, la evaluación de p16 requiere algunas consideraciones. Aunque p16 se considera un marcador de senescencia y, por lo tanto, tranquilizador cuando se expresa (66, 67) no está, sin embargo, expresado, en melanocitos normales. Su expresión puede inducirse frente al estrés celular (67). Puede haber nevus que expresen poco p16, sin que eso signifique una inactivación de *CDKN2A*.

● *Ruta II (alta exposición solar)*: acaba en el melanoma de tipo lentigo maligno, iniciándose en el lentigo maligno o en otros tipos de melanoma *in situ*.

● *Ruta III (también de alta exposición solar)*: acaba en el melanoma desmoplásico, iniciándose como melanoma *in situ*.

● *Ruta IV*: acaba en el melanoma de Spitz, iniciándose en el nevus de Spitz benigno (68,69). Suele tener mutaciones activadoras de *HRAS*, reordenamientos de los genes

del receptor de las tirosin-cinasas o reordenamientos de los genes de las serin/treonin-cinasas involucradas en la ruta MAPK. En ocasiones, en los genes adyacentes a las zonas reordenadas de los tumores de Spitz, incluso benignos, pueden producirse cambios numéricos, sin necesidad de que impliquen mayor riesgo de progresión.

Una característica peculiar de la ruta de los tumores de Spitz, es que pueden presentar inactivación del gen *CDKN2A* (en muchos casos como única alteración genética), con pérdida de la expresión de p16, un hecho que sería preocupante en tumores melanocíticos de cualquier otra ruta (70). Se necesitan, por lo tanto, mutaciones adicionales a la inactivación de *CDKN2A* para la transformación maligna.

Otra característica común de este grupo es que las lesiones malignas pueden conservar las mutaciones previas de las lesiones benignas precursoras. Por lo tanto, aunque las mutaciones *HRAS* son típicas de los nevos de Spitz, demostrarlas no es garantía de benignidad: un melanoma de Spitz puede también tenerlas (71). Sin embargo, puesto que las mutaciones en *HRAS* están presentes en menos de un 1% de melanomas (63) su evidencia resulta tranquilizadora en un tumor de morfología Spitz.

Ha habido intentos de correlacionar las alteraciones genéticas evidenciadas en los tumores de Spitz, con los hallazgos histopatológicos en la hematoxilina-eosina (72) empezando por la sugerencia de que las mutaciones *HRAS* activan con más vigor la vía PI3K/AKT/mTOR que las mutaciones *BRAF* o *NRAS* y, por lo tanto, inducen células tumorales de mayor tamaño y menos pigmentación que las vistas en los nevos comunes o congénitos (63). Aunque esas correlaciones no son siempre fáciles de evaluar, se sabe que las mutaciones en *HRAS* están asociadas con caracteres desmoplásicos; los reordenamientos en *MAP3K8*, con predominio de células epiteloides, células multinucleadas y ulceración; los reordenamientos en *RET* con un patrón tumoral en placa y con nidos celulares poco cohesivos; los reordenamientos en *NTRK3*, con tumores pigmentados; los reordenamientos e *NTRK1* con presencia

de pseudorrosetas; los reordenamientos en *ROS1*, con abundancia de cuerpos de Kamino, y los reordenamientos en *ALK*, con tumores grandes polipoides o cupuliformes, muchas veces con un hábito arquitectural fasciculado y en ocasiones con prominente depósito mixoide. Sin embargo, estas correlaciones no son completas. Así, por ejemplo, un fenotipo desmoplásico puede encontrarse sin asociación a mutación de *HRAS* o amplificación 11p y, por el contrario, asociarse a fusiones de cinasas como *ROS1*.

● *Ruta V*: acaba en el melanoma acral, iniciándose quizá en nevus acrales o en lesiones precursoras acrales malignas in situ.

● *Ruta VI*: se inicia en la melanosis con displasia y acaba en el melanoma lentiginoso de mucosas. Se desconoce si la melanosis no displásica podría ser el inicio de la ruta.

● *Ruta VII*: esta ruta se refiere a los melanomas originados sobre nevus congénito. Sobre estos últimos pueden aparecer nódulos de crecimiento, debidos a mutaciones adicionales a las del nevus, por lo que se consideran melanocitomas de riesgo bajo/intermedio de evolución a melanoma. La ruta acaba en el melanoma sobre nevus congénito.

● *Ruta VIII*: se inicia con el nevus azul, pasando por el nevus azul celular (incluido dentro de los melanocitomas de riesgo bajo/intermedio de evolución a melanoma), el nevus azul celular atípico y, finalmente, el melanoma sobre nevus azul, una entidad rara. En las últimas fases de malignización puede mostrar mutaciones en el gen supresor de tumores *BAP1*.

● *Ruta IX*: esta es la ruta del melanoma uveal. Se desconoce cuáles puedan ser los pasos histológicos previos hasta su transformación en melanoma. Puede presentar mutación del gen supresor de tumores *BAP1*.

1.5 Biomarcadores serológicos, tisulares, inmunohistoquímicos y moleculares

Los biomarcadores del cáncer se pueden clasificar en tres grandes categorías: diagnósticos, pronósticos o predictivos. Los biomarcadores diagnósticos se utilizan para identificar y confirmar la aparición del cáncer y pueden facilitar la detección precoz de la recurrencia. Los biomarcadores pronósticos se utilizan para predecir el curso probable y los resultados esperables de la enfermedad. Por último, los biomarcadores predictivos se utilizan para evaluar la posible respuesta de un tratamiento específico y personalizado (73, 74).

Hasta la fecha, no disponemos de un biomarcador adecuado para el melanoma, y los biomarcadores circulantes aunque son tendencia no han cubierto todas las expectativas (132). Diferentes trabajos demuestran modificaciones en la expresión de proteínas que regulan los procesos de proliferación, invasión y metástasis en melanoma (75, 76). Un factor que es esencial en la progresión del tumor y metástasis es la neoangiogénesis donde se ha visto que una gran variedad de factores de crecimiento tienen esta actividad (135).

1.5.1 Biomarcadores serológicos de pronóstico

Los biomarcadores pronóstico no histológicos del melanoma cutáneo son los biomarcadores tumorales serológicos para evaluar la presencia de enfermedad residual y la carga tumoral (74). Los marcadores serológicos pronósticos más estudiados son la proteína fijadora de calcio B de S100 (S100B), el antígeno de melanoma inhibidor de la migración (MIA), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), la proteína catiónica de eosinófilos (PCE), la indolamina 2,3-dioxigenasa sérica (IDO), los nivel de vitamina D y el lactato deshidrogenasa sérica (LDH).

● **MIA** es una proteína secretada por células tumorales de melanoma de masa molecular 12 kDa. Se ha demostrado que la MIA es un marcador pronóstico independiente para pacientes con melanoma cutáneo con mayor sensibilidad y especificidad para la predicción de recurrencias y metástasis más que otros marcadores (77, 78).

● La **S100B** es una proteína perteneciente a la familia de proteínas de unión al calcio. La S100B específicamente ha demostrado jugar un papel en la progresión y diferenciación del ciclo celular (79), se ha relacionado con la carga y la progresión tumoral. La medición de S100B en suero puede servir para monitorizar la respuesta o la progresión del melanoma (80).

● El **HGF** es una citoquina que facilita la tumorogénesis del melanoma y la progresión del tumor mediante la activación de la vía MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), una cascada de señalización regulada positivamente en la mayoría de los pacientes con melanoma. Se ha demostrado que en melanomas metastásicos HGF guarda relación significativa con la supervivencia libre de progresión (SSP) y la supervivencia general (SG) (78).

● Los niveles séricos de **PSE** más bajos se han asociado con una mayor SG en los melanomas metastásicos (81). La enzima **IDO** (indolamina 2,3-dioxigenasa), la actividad elevada de IDO se ha asociado con un mal pronóstico en muchos tipos de tumores. En melanoma, De Lecea y colaboradores. encontraron que los niveles séricos de IDO más bajos presentaban mejor SG (82).

● Se ha demostrado que **los receptores de vitamina D** tienen un papel potencial en la regulación del sistema inmunológico y en la carcinogénesis (83). Los pacientes con niveles deficientes de vitamina D a lo largo del proceso tienen un peor pronóstico con mayor riesgo de fallecimiento (84).

Ninguno de los marcadores séricos comentados tienen el aval de la comunidad científica y hasta la fecha, solo la deshidrogenasa láctica (LDH) sigue siendo el único

biomarcador sérico de pronóstico que se ha incorporado al sistema de estadificación del American Joint Committee on Cancer (AJCC) para el melanoma señalando que los pacientes con niveles elevados de LDH muestran una supervivencia significativamente peor y tiene utilidad para establecer el pronóstico y la progresión de la enfermedad en pacientes con melanoma metastásico (85).

1.5.2 Productos tumorales circulantes obtenidos por biopsia líquida (PTC)

Los productos tumorales circulantes (PTC) mediante biopsia líquida, constituyen una herramienta emergente de pronóstico que pueden tener importancia en la monitorización y respuesta al tratamiento del melanoma y otros tipos de cáncer. Los PTC son macromoléculas de ADN, ARN, MiARN o células procedentes de los tumores y liberadas en la circulación sanguínea. A diferencia de algunos marcadores séricos que pueden tener otro origen, los PTC son específicos de las células tumorales y pueden proporcionar información relevante y más precoz sobre la biología y la progresión del tumor. Se dividen en tres subgrupos principales:

1.5.2.1 Células tumorales circulantes (CTC)

Las CTC son células que se desprenden del tumor sólido primario y circulan por el torrente sanguíneo. Se ha establecido el papel de las CTC como biomarcadores diagnósticos, pronósticos y de respuesta al tratamiento aprobado por la FDA americana utilizando moléculas de adhesión de células epiteliales (EpCAM) en tumores de próstata, mama y colorrectal. Los melanomas tienen origen en la cresta neural y no expresan el marcador de superficie EpCAM y constituye un reto técnico poder diferenciar entre las propiedades físicas de las células de melanoma circulantes (86). Datos a favor de su posible utilidad han sido aportados en melanomas: En

pacientes con melanoma metastásico menos de 2 CTC/7.5 mL se asocia a mejor supervivencia global (87); las subpoblaciones de CTC de melanoma utilizando citometría de flujo con marcadores específicos de melanoma y marcadores de células madre son más adecuadas para fines pronóstico que el número total de CTC (88). Asimismo el empleo de tecnología “Cytophone” en melanoma, que tiene un límite de detección de 1 CTC/litro, parece una herramienta más eficaz para detectar con éxito CTC de melanoma (89).

1.5.2.2 Ácidos nucleicos circulantes

Además de las células tumorales, también se ha demostrado que los ácidos nucleicos circulantes derivados de tumores tienen importancia pronóstica. Estos marcadores incluyen ADN tumoral circulante (ctADN), ADN libre de células (cfADN) y ARNm, ARN y microARN circulantes (miARN).

El ADN tumoral circulante puede llegar a tener un papel esencial en el pronóstico y la estratificación de los pacientes con melanoma. La detección de ctDNA se asocia significativamente con una disminución de la supervivencia específica del melanoma (90). La mitad de todos los casos de melanoma cutáneo presentan mutaciones *BRAF* (protooncogén serina/treonina quinasa B-Raf) y entre 15% y 20% de los casos tienen mutaciones *NRAS* (91). En un estudio de cohorte con melanomas la presencia de niveles detectables de ctADN *de BRAF* o *NRAS* mutado por PCR se asociaron a menor intervalo libre de metástasis, menor intervalo libre de enfermedad y menor SG y fueron factores pronósticos independientes en el análisis multivariado (92).

El cfADN circulante son fragmentos cortos de ADN y sus niveles elevados están asociados con el cáncer, pero no son totalmente específicos de él. Un estudio realizado por Valpione et al. demostraron que el cfDNA puede servir como un marcador sustituto de la carga tumoral en pacientes con melanoma metastásico, de

hecho los niveles iniciales de cfDNA se correlacionan positivamente con la carga tumoral y negativamente tanto con el riesgo de muerte como con la SG (93).

Dos estudios han mostrado resultados consistentes con la detección de ARNm de células tumorales circulantes y el pronóstico en melanoma en estadio IV. En el estudio de Hoshimoto et al., se encontró que los pacientes que expresaban al menos uno de tres biomarcadores de ARNm asociados al melanoma (MART-1, MAGE-A3 y PAX3) generalmente tenían una supervivencia libre de enfermedad y una SG menores. Y en otro estudio independiente se demostró que los niveles elevados de biomarcadores de ARNm (MART-1, MAGE-A3, PAX3 y GalNAc-T) se correlacionaron negativamente con la supervivencia libre de recaídas y la SG. Esto avala la idea de que la detección de células tumorales circulantes y la expresión de biomarcadores de ARNm podrían ser indicadores útiles para la predicción del pronóstico en pacientes con melanoma en estadio avanzado (94).

1.5.2.3. MicroARN (miARN) y exosomas de melanoma circulantes

Los miARN son pequeñas moléculas de ARN no codificantes que desempeñan un papel importante en la regulación postranscripcional de la expresión génica al unirse a secuencias específicas de ARN mensajero (ARNm) y regular su estabilidad y traducción (95, 96). Los microARN son muy estables y pueden ser fácilmente detectados en tumores y circulando en la sangre. Los niveles séricos de miR-16 disminuyeron en casos de melanomas con mayor espesor de Breslow, ulceración y altas tasas de mitosis (97) y es un factor de pronóstico independiente para la SG del melanoma (98). Los niveles séricos de miR-221 están relacionados con el estadio y aumentan significativamente durante la progresión y recurrencia del melanoma lo que sugiere que miR-221 puede servir como un biomarcador potencial para el pronóstico del melanoma (98, 99). Friedman et al. (100) examinaron 355 miARN en sueros de 80 pacientes con melanoma primario; una firma de cinco miARN (miR-150,

miR-15b, miR-199a-5p, miR-33a y miR-424) permitía clasificar a los pacientes con melanoma de alto y bajo riesgo de recurrencia con diferencias significativas.

Los exosomas son vesículas extracelulares de 30 y 150 nm de diámetro con una membrana bicapa lipídica que contienen componentes de ácido nucleico de la célula (101). En una serie de casos/control de melanomas avanzado, las concentraciones de exosomas con los dos biomarcadores séricos MIA y S100B, estaban significativamente elevadas en pacientes con melanoma metastásico en comparación con pacientes libres de enfermedad y estaban relacionadas con una mediana de supervivencia más corta. Estos hallazgos sugieren para la MIA exosomal una mayor sensibilidad y especificidad para distinguir a los pacientes con melanoma avanzado (102).

Los exo-miARN-532-5p y exo-miARN-106b encapsulados en exosomas están aumentados en los melanomas metastásicos. Estos hallazgos sugieren que los miARN exosomales en sangre podrían tener un valor diagnóstico y pronóstico para identificar la presencia de metástasis y predecir el curso del melanoma (103). Sin embargo, aún no se ha investigado todo el potencial de los exosomas como factores pronósticos.

1.5.3 Biomarcadores epigenéticos en tejido

La modificación epigenética como un mecanismo regulador puede contribuir a la transformación celular maligna, y la metilación del ADN, los miARN, los ARN largos no codificantes (lncRNA) y los biomarcadores de modificación de histonas son objetivo de identificar biomarcadores emergentes.

1.5.3.1 Biomarcadores de metilación del ADN

La metilación del ADN es una alteración epigenética frecuentemente estudiada en el melanoma. El gen supresor de tumores INK4A (p16) está hipermetilado en un porcentaje significativo de melanomas, lo que contribuye a la inactivación de su función y el grado de metilación del ADN del gen PON3, se han

sugerido como biomarcadores pronósticos independiente del melanoma primario por su relación con el grosor del tumor y la presencia de ulceración y la supervivencia del paciente (104). En el melanoma primario, la hipermetilación de *RAR-β2* y los niveles de metilación de genes relevantes como *PTK7*, *ABCB4*, *HOXA9* e *IRAK3* han mostrado correlaciones positivas con el espesor de Breslow y son posibles biomarcadores alternativos (105). Sigalotti et al. (106) identificaron una firma de metilación de 17 genes que se correlacionaron con la SG en pacientes con melanoma cutáneo en estadio avanzado.

De manera similar a la metilación, la hidroximetilación del ADN es una modificación epigenética que conduce a la formación de 5-hidroximetilcitosina (5-hmC). Lian et al. (107) observaron una correlación negativa entre los niveles de 5-hmC y la profundidad de Breslow en 98 pacientes con melanoma primario; sin embargo, son insuficientes los estudios hasta el momento para determinar feacientemente si los niveles de 5 hmC pueden servir como un factor pronóstico independiente.

1.5.3.2 MicroARN (miARN) en tejidos

Los miARN también desempeñan un papel importante en la tumorigénesis y la progresión tumoral en diferentes neoplasias, incluido el melanoma (108).

La expresión aumentada de miR-182 durante la progresión del melanoma primario a metastásico sugiere que miR-182 puede desempeñar un papel importante en la promoción de la invasión y la metástasis en el melanoma. La comprensión de cómo los miARN, incluido miR-182, regula los procesos asociados con la progresión del melanoma puede tener implicaciones importantes en el desarrollo de terapias dirigidas y en la identificación de biomarcadores pronósticos y predictivos (109).

1.5.3.3 ARN largos no codificantes (lncARN) en tejidos

Los ARN largos no codificantes (lncRNA) con longitudes superiores a los 200 nucleótidos. Recientemente se les ha atribuido un papel esencial en la regulación del desarrollo y la progresión neoplásica. El lncRNA activado por BRAF (BANCR) es un

ARN oncogénico que promueve la migración y proliferación y se ha asociado con una peor tasa de supervivencia en melanomas (110).

1.5.3.4 Biomarcadores de modificación de histonas

La acetilación y desacetilación son modificaciones postraduccionales epigenéticas de las histonas que desempeñan un papel crucial en la represión de la expresión génica y, por lo tanto, en la historia natural de los tumores. En un estudio realizado por Wilmott et al., se evaluó la expresión de las proteínas HDAC clase 1 y sus reguladores en muestras de melanoma en estadio IV con mutación BRAF o NRAS. Se observó que la histona HDAC8 estaba metilada solo en melanoma con mutación BRAF. Además, en un análisis multivariado, se encontró que el aumento de la expresión citoplasmática de HDAC8 se correlacionó de forma independiente con una mejor supervivencia sin enfermedad (SSE) y supervivencia específica del melanoma (111).

1.5.4 Biomarcadores de la vía de señalización tisular

La cuarta categoría de biomarcadores de pronóstico consiste en biomarcadores de vías de señalización en el tejido tumoral. Es conocido que el melanoma es una neoplasia heterogénea que puede resultar de la alteración de múltiples vías y redes reguladoras como hemos comentado anteriormente.

1.5.4.1 Biomarcadores asociados con oncogenes, genes supresores de tumores y genes supresores de metástasis

Las mutaciones de los oncogenes *BRAF* y *NRAS* son las alteraciones genéticas más comunes en el melanoma cutáneo, mientras que las mutaciones en *NRAS* están asociadas a un comportamiento más agresivo las mutaciones de *BRAF* se asocian a una mejor supervivencia (112). En un estudio de cohorte de 677 pacientes con melanoma, las mutaciones *BRAF* o *NRAS* son más propensas a metástasis cerebrales

(113). La proteína de unión a la caja Y 1 (YB-1) es un factor de transcripción oncogénico y un regulador de la transición epitelial-mesenquimatosa (EMT), la proliferación celular y la metástasis (114). Kosnopfel y colaboradores, han demostrado que la mayor expresión de YB-1 en una cohorte de 270 melanomas se correlaciona con una disminución en la supervivencia global (SG) de los pacientes (115).

El factor de transcripción de microftalmia (*MITF*) es un gen maestro melanocítico regulador de la supervivencia, proliferación y diferenciación celular, y puede desempeñar un papel oncogénico en un subgrupo de melanomas (116). Entre los objetivos posteriores de *MITF*, sólo *TRPM1* (potencial receptor transitorio de melastatina-1) tiene importancia pronóstica conocida en el melanoma cutáneo (117). El melanoma primario y metastásico se asocian con pérdida focal de ARNm de *TRPM1* y pérdida focal o completa de ARNm de *TRPM1*, respectivamente (118). Los niveles y patrones de expresión de *TRPM1* pueden ayudar a diferenciar los nevus de melanomas (119). Duncan y colaboradores (117) encontraron que la regulación negativa del ARNm de *TRPM1* en lesiones de melanoma cutáneo primario es un marcador pronóstico adverso e independiente de metástasis en pacientes con melanoma I. Un microARN (miR-211) dentro de un intrón del gen *TRPM1* es el responsable de la actividad supresora de tumores (120).

FOXQ1 (proteína Q1 de la caja Forkhead) desempeña un papel importante en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la tumorigénesis. *FOXQ1* actúa como un supresor de tumores en el melanoma inhibiendo la invasión y metástasis al reprimir el gen de la N-Cadherina lo que sitúa a *FOXQ1* como protector en la progresión del melanoma al regular negativamente la expresión de genes asociados con la invasión y la metástasis (121). Además, *FOXQ1* inhibe la transformación neoplásica de los melanocitos a través de la represión de *MITF* inducida por *BRAF V600E* (116).

Las mutaciones presentes en el promotor del gen *TERT* que codifica para la telomerasa han sido recientemente descritas en el melanoma como responsable de la tumorigénesis (122). Las mutaciones inducidas por los rayos UV en el promotor

TERT se encuentran entre las alteraciones genéticas más frecuentes en el melanoma (123). Griewank y colaboradores (120) evaluaron 410 biopsias de melanoma para investigar las mutaciones del promotor *TERT* mediante secuenciación tipo Sanger observando que están presente con mayor frecuencia en melanomas cutáneos no acrales y estas mutaciones se asociaron de forma independiente con una disminución de la SG en estos pacientes (123). En un estudio de cohorte reciente de 194 pacientes con melanomas nodulares primarios, se encontró que las mutaciones del promotor de *TERT* se correlacionan con lesiones de más espesor, con recuentos mitóticos más elevados que aquellos en los casos de *TERT* no mutado. La expresión de la proteína *TERT* en el melanoma primario se asoció con una supervivencia reducida del paciente y no se ha relacionado con el estado de mutación del promotor del gen *TERT* (124).

1.5.4.2 Biomarcadores de proliferación celular

En la práctica clínica se utilizan múltiples marcadores de proliferación para evaluar la actividad proliferativa, como Ki-67, fosfohistona H3 (PHH3), proteína de mantenimiento de minicromosomas 4 (MCM4) y mitosina.

El más popular es el antígeno Ki-67 una proteína nuclear que está asociada con la proliferación celular y con la transcripción del RNA ribosómico y a la fase de síntesis de ADN. Ki-67 es un marcador de proliferación celular expresado durante las fases G1, S, G2-Mitosis del ciclo celular y ausente en fase G0. Es un contrastado marcador para medir la fracción de células proliferantes en los tumores con un indudable valor pronóstico. Ki-67 sigue siendo la herramienta complementaria más útil para distinguir tumores melanocíticos benignos y malignos (149).

Recientes estudios indican que Ki-67 controla la organización de la heterocromatina y la expresión génica (150). La proliferación celular está correlacionada con la progresión del melanoma. El estudio de Nielsen y colaboradores incluyó 153 melanomas en estadio I/II y demostró que la expresión de Ki-67/MART1 tuvo un riesgo aumentado para la supervivencia libre de tumor y para la muerte específica por melanoma (125).

En un estudio de melanomas cutáneos nodulares, una mayor positividad de Ki-67 se correlacionó con mal pronóstico en el análisis multivariado. Además, se descubrió que la expresión de Ki-67 era un indicador de pronóstico más eficiente que los recuentos mitóticos. También otros marcadores de proliferación celular, incluidos PHH3, MCM4 y mitosina (128) y la proteína de mantenimiento de minicromosomas 3 (MCM3) han demostrado tener valor pronóstico en el melanoma primario. En una evaluación inmunohistoquímica de MCM3 en 224 casos de melanoma primario, el aumento de la expresión de MCM3 se asoció en un análisis multivariado con una reducción significativa de la SSE y de la supervivencia específica del melanoma (127).

1.5.4.3 Biomarcadores de autofagia

La autofagia es un proceso celular fundamental que actúa para eliminar componentes celulares dañados, defectuosos o no deseados, como proteínas mal plegadas, orgánulos disfuncionales o cuerpos extraños. La autofagia es esencial para la adaptación de las células a condiciones de estrés, como la privación de nutrientes, la hipoxia o el daño celular. La autofagia puede tener efectos tanto supresores como promotores del tumor dependiendo de las etapas específicas del desarrollo tumoral. La acumulación de p62 está involucrada en la regulación de la degradación selectiva de proteínas y orgánulos y se cree que contribuye a la tumorigénesis. La expresión de p62 aumenta significativamente en el melanoma en comparación con los nevus; sin embargo, la expresión de p62 es mayor durante los estadios I/ II d que en los estadios III/IV del melanoma (128).

AMBRA1 (*activating molecule in Beclin1-regulated autophagy*), es una proteína esencial para la regulación de la autofagia y la diferenciación celular. La reducción o pérdida completa de la expresión de AMBRA1 en la epidermis que recubre los melanomas cutáneos se asocia con una disminución de la tasa de SSE (129). AMBRA1 se comporta como marcador de diferenciación en la epidermis; Además la pérdida combinada de expresión de AMBRA1/loricrina es un predictor negativo significativo de SSE en melanomas en estadio precoz. En un estudio de cohorte retrospectiva de 379 pacientes con melanoma se encontró en el análisis multivariado que el índice de

riesgo de pérdida de AMBRA1/loricrina es superior a la profundidad de Breslow como predictor de SSE, lo que sugiere que la expresión epidérmica de AMBRA1/loricrina es una herramienta de pronóstico prometedora en los melanomas en estadio I (129).

1.5.4.4 Biomarcadores de respuesta inflamatoria e inmune

La inflamación crónica se reconoce cada vez más como un factor importante en el desarrollo y la progresión del cáncer. Se estima que la inflamación crónica puede contribuir hasta el 25% de los cánceres humanos. La ciclooxigenasa-2 (COX-2) es una enzima clave involucrada en la cascada de la síntesis de prostaglandinas, que son mediadores importantes de la inflamación y juegan un papel crucial en numerosos procesos fisiológicos y patológicos. Kuźbicki et al. (130) encontraron que una mayor expresión de COX-2 en melanomas primarios está relacionada con un mal pronóstico.

CD74 es una proteína de tráfico y procesamiento de HLA clase II con funciones proinflamatorias. Debido a su expresión específica en ciertos tipos de cáncer y su función en la presentación de antígenos, CD74 se ha considerado como un objetivo terapéutico potencial para el desarrollo de terapias dirigidas contra el cáncer, como la inmunoterapia y la terapia dirigida. La inhibición de CD74 puede ayudar a modular la respuesta inmune contra las células tumorales y potenciar la eficacia de la inmunoterapia en el tratamiento del cáncer (131).

CD2 es una molécula de adhesión celular que se encuentra en la superficie de los linfocitos T y las células asesinas naturales (NK). El recuento de CD2 en melanomas cutáneos se correlaciona con la cuantificación de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL)(132) En el análisis multivariado, los recuentos más bajos de CD2 en tumores primarios podrían predecir de forma independiente la recurrencia de la enfermedad locorregional y sistémica y la disminución de la SG. Sivendran y colaboradores. desarrollaron un panel de 53 genes relacionados con el sistema inmune que predijo la supervivencia específica de la enfermedad y la supervivencia libre de recurrencia en pacientes con melanomas cutáneos, confirmando el papel pronóstico del CD2 en los melanomas cutáneos (133).

CD10 es una metaloproteasa multifuncional de la superficie celular que desempeña un papel fundamental en el desarrollo de los linfocitos B. Se considera que CD10 puede promover la progresión del melanoma al estimular la proliferación celular, la supervivencia celular y la angiogénesis. La expresión de CD10 es significativamente mayor en el melanoma metastásico que en los melanomas primarios (134).

Thomas-Pfaab y colaboradores investigaron el papel pronóstico del CD10 (135), y demostraron que la expresión de CD10 en melanomas se asociaba con una reducida SG y una progresión más rápida de la enfermedad. Oba y colaboradores encontraron una correlación positiva significativa entre la expresión de CD10 y parámetros pronósticos como el espesor de Breslow, el nivel de Clark y la presencia de ulceración. Además, la expresión de CD10 en el melanoma cutáneo fue un factor pronóstico independiente de mala evolución en un análisis multivariado (136).

El Immunoscore, descrito inicialmente por Galon et al., es un sistema de puntuación basado en la cuantificación de dos poblaciones de linfocitos (CD3/CD45RO, CD3/CD8 o CD8/CD45RO) intratumorales, en la superficie del tumor y el margen invasivo (MI) (137). No existe consenso sobre la definición de Immunoscore en el melanoma, debido a la compleja reacción inmune intratumoral. Así, la infiltración densa de células B, células T activadas y células dendríticas en el melanoma cutáneo se ha correlacionado con un pronóstico favorable, mientras que la infiltración mayoritaria de neutrófilos, macrófagos y mastocitos muestra un pronóstico adverso; por ello se han incorporado biomarcadores adicionales, como CD20, FOXP3, IL17, CD68 y GZMB en la evaluación de Immunoscore en melanoma. Un metanálisis reciente revela que el aumento de linfocitos infiltrantes de tumores CD3+, CD4+, CD8+, FOXP3+ y CD20+ podría predecir una supervivencia general favorable de los pacientes con melanoma (138). La carga mutacional tumoral (TMB), definida como mutaciones somáticas por megabase (Mb) del área codificante de un genoma tumoral, es un marcador pronóstico emergente asociado con el desarrollo de inmunidad antineoplásica y la respuesta a la terapia con inhibidores de puntos de control inmunitarios (139).

Los datos publicados, hasta el momento, son contradictorios, Edwards y colaboradores (140) demostraron que la TMB no está relacionada con la inmunidad antitumoral protectora en el melanoma sin tratamiento previo. En el melanoma avanzado, el TMB-alto se correlaciona con mejor SG después del tratamiento con bloqueo anti-PD-1/PDL-1 y/o CTLA-4 (141). Sin embargo, algunos melanomas con TMB-alto no responden a la terapia, lo que sugiere que TMB por sí solo puede no ser suficiente para ser un biomarcador independiente en la práctica clínica (142).

1.5.4.5 Biomarcadores mitocondriales

Principalmente son tres marcadores mitocondriales (anticuerpos antimitocondriales, proteína de fisión 1 [FIS1] y mitofusina 2 [MFN2]) en melanomas cutáneos. Los resultados del estudio de Soares revelaron que un alto contenido mitocondrial es un factor pronóstico independiente negativo para la supervivencia sin enfermedad (SSE) en pacientes con melanoma cutáneo (143).

1.6 Biomarcadores tisulares que predicen el estado de los ganglios linfáticos en el melanoma cutáneo

Estos biomarcadores de posible utilidad en melanoma han sido ampliamente revisados en 2022 por Rizzetto y colaboradores (25).

1.6.1 Invasión linfovascular (ILV)

La invasión linfovascular (ILV) consiste en la observación histopatológica de células neoplásicas en el interior de vasos linfático o hemáticos en el seno del melanoma lo que guarda relación con unas expectativas clínicas peores (144). La combinación de biomarcadores específicos y sensibles para melanoma (S-100, Mart-1), para proliferación celular (Ki-67, PCNA) y para vasos linfáticos (LYVE-1, Podoplanina) permite una mejor evaluación de la ILV en el melanoma cutáneo. Los

biomarcadores de vasos linfáticos (Prox-1, LYVE-1 y Podoplanina) permiten además establecer la densidad de vasos linfáticos (DVL) y la formación de nuevos vasos linfáticos peritumorales (144,145). La inmunolocalización de estructuras linfáticas incrementa un 50% la identificación de ILV con respecto a la valoración con tinción de hematoxilina/eosina (146-148).

Algunos estudios sugieren que la ILV y la DLV intratumorales o peritumorales pueden correlacionarse con la metástasis del ganglio centinela y de ganglios linfáticos locorregionales, así como con la supervivencia del paciente, pero los resultados no son concluyentes (97, 125, 149).

1.6.2 VEGF

Las glicoproteínas de la familia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) desempeñan un papel crucial en el proceso de linfangiogénesis estimulando la formación de nuevos vasos linfáticos y la propagación tumoral (150). Gallego y colaboradores (151) se centraron en el papel de VEGF-C en relación con la positividad del ganglio centinela en melanoma (SLN). Se ha publicado que la detección de VEGF-C, VEGF-D y VEGFR-3 mediante inmunohistoquímica y PCR puede ser un buen predictor de la positividad de SLN (152). Contrariamente, otros estudios no han encontrado una asociación consistente entre la expresión de receptores y la positividad del ganglio centinela en melanoma (153, 154).

Recientemente, en el estudio de Toberer y colaboradores. (155) demostraron de manera estadísticamente significativa en una serie de 58 pacientes con melanoma que la expresión de VEGFR-3 era un predictor independiente de la positividad del GC y podría usarse en el futuro para seleccionar a los pacientes a los que someter a la técnica de GC. También se demostró de forma estadísticamente significativa que VEGF-A se expresaba más en el tejido tumoral de pacientes con GC positivo; sin embargo, en la regresión logística, no resultó ser un factor independiente para el

resultado del GC. Los resultados ambiguos requieren más estudios prospectivos multicéntricos para aclarar mejor el papel de VEGF y VEGFR en la predicción de la invasión del GC.

1.6.3 Tetraspanina CD9

La tetraspanina CD9 es una proteína transmembrana que juega un papel clave en la progresión tumoral ya que funciona como un supresor de metástasis (156). Una expresión reducida se correlaciona con la progresión metastásica y mal pronóstico. CD9, cuando se sobreexpresa puede causar en parte la actividad de invasión de las células de melanoma (157, 158).

Un estudio reciente (159) realizado en melanomas cutáneos evaluaron la expresión de CD9 mediante inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, y demostraron que CD9 no se expresaba en melanomas delgados, mientras que en el 46% de los melanomas intermedios y gruesos se observa en áreas de invasión dentro de estructuras vasculares o vasos linfáticos. Todos los melanomas inmunoteñidos con CD9 mostraron un GC positivo, lo que sugiere que la expresión de CD9 puede un excelente biomarcador para evaluar el estado de GC.

Aunque CD9 se expresa uniformemente en los nevus melanocíticos, en el melanoma invasivo, como ya se ha visto en otros tumores (160-163), un aumento de CD9 se correlaciona con metástasis en los ganglios linfáticos, metástasis a distancia y una peor evolución (159). Esto puede explicarse considerando que las tetrasparinas pueden actuar como supresores y promotores de metástasis dependiendo del estado de la membrana celular y las estructuras vesiculares (164). Algunos estudios in vitro sobre la migración transendotelial de células de melanoma mostraron un papel importante de CD9 en la interacción tumor-célula endotelial/linfática y la diseminación vascular de las células tumorales (165). Por lo tanto, el papel de CD9 en la determinación del estado del GC parece interesante, como también confirmaron

Erovic y colaboradores (166) demostrando que esta tetraspanina es capaz de promover la trans migración de las células tumorales a través de la adherencia a los vasos linfáticos (Fig. 1.13). No obstante, se necesitan más estudios para evaluar su papel como biomarcador del GC, especialmente en melanomas intermedios y gruesos.

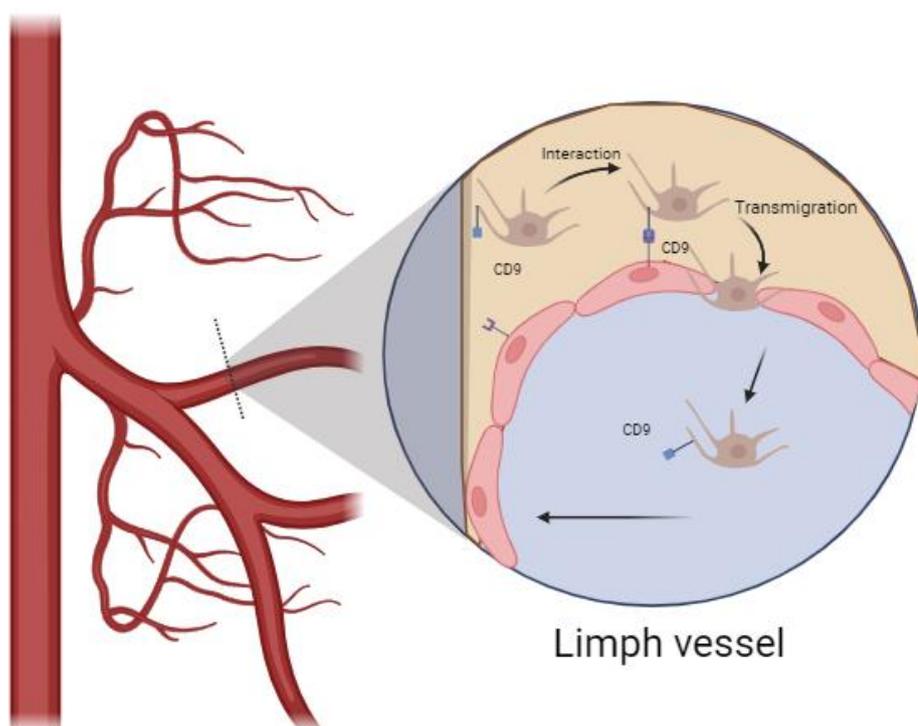


Figura 1.13: Modelo hipotético de participación de tetraspanina CD9 en la diseminación metastásica de células de melanoma a los ganglios linfáticos. CD9, localizado en el área de contacto de la célula del melanoma con la célula endotelial/linfática durante la trans migración activa de las células tumorales a través de los vasos endoteliales/linfáticos, facilita la invasión de los ganglios linfáticos (modificado de Rizzetto y cols., 2023).

1.6.4 LYVE-1 y PODOPLANINA (D2-40)

El receptor-1 de hialuronano endotelial de vasos linfáticos (LYVE-1) y Podoplanina (D2-40), son marcadores selectivos de vasos linfáticos, de utilidad para

evaluar LVI en melanomas cutáneos. Usando estos dos biomarcadores, no se encontró correlación entre ILV y la positividad de GC (167). Sin embargo, si la ILV se asociaba con la presencia de vasos linfáticos intratumorales, aumenta la posibilidad de predecir el estado del GC, con un valor predictivo positivo del 80% y un valor predictivo negativo del 72%.

D2-40 se ha usado solo para evaluar ILV mostrando una buena capacidad predictiva para GC positivo en melanomas cutáneos >2 mm (168). Estos datos apoyan que la evaluación de ILV implementada con LYVE-1 y D2-40 puede ser un indicador del estado de GC

1.6.5 Prueba de perfil de expresión génica (test 31-GEP)

“Decision Dx-Melanoma 31-gene expression profile test” (31-GEP) es una prueba utilizada para estratificar el riesgo de positividad del ganglio centinela (GC), identificando pacientes de alto riesgo (>5%) que son candidatos para una biopsia de GC. 31-GEP permite la evaluación de firmas de expresión molecular para guiar la estadificación en pacientes con melanoma y estratifica a los pacientes según su riesgo de morir por melanoma (169-174).

31-GEP se realiza en una muestra de melanoma primario normalmente fijado en formalina e incluido en parafina. Está basado en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la evaluación de los genes expresados. Desde un punto de vista clínico, este método se puede utilizar al mismo tiempo que el examen histológico. 31-GEP se basa en evaluar, directamente sobre la muestra de tejido de melanoma, la expresión de los niveles génicos de un panel que contiene un número muy limitado de genes. En concreto, podemos encontrar marcadores de migración celular/quimiotaxis/metástasis, moléculas secretoras, adhesión, invasión de linfocitos, factores de transcripción, proteínas estructurales de diferenciación/proliferación y receptores de superficie (*CXCL14*, *SPP1*, *CLCA2*,

S100A9, S100A8, BAP-1, MGP, GJA1, DSC1, PPL, LTA4H, TRIM29, KRT6B, KRT14, CRABP2, SPRRIB, TACSTD2, CLCA2, ROBO1, CST6, SAP130, ID2, EIF1B, ARG1, AQP1, RBM23) (175).

Las pruebas genéticas pueden identificar un riesgo bajo de clase 1 de positividad de GC o un riesgo alto de clase 2. Se considera que la clase 1 tiene un riesgo muy bajo tanto de metástasis como de mortalidad (173).

31-GEP se ha propuesto recientemente como un parámetro de evaluación de riesgo adicional para la positividad de GC, integrando la prueba 31-GEP con otros aspectos clínicos/patológicos para la evaluación de GC en pacientes con melanoma delgado (64,176). Esto podría, en un futuro próximo, introducir una nueva variable a tener en cuenta, destacando los grupos de población con un riesgo >5% de positividad del GC, optimizando el tratamiento.

Los biomarcadores en melanoma se pueden clasificar en diferentes categorías de las mencionadas anteriormente. En general, la mayoría de ellos se están utilizando como biomarcadores de diagnóstico, ya que se encuentran sobreexpresados en las células del melanoma. Otros biomarcadores muestran una mayor expresión en estadios avanzados de la enfermedad y sirven como indicadores de respuesta a la terapia o riesgo de recurrencia, por lo que se consideran pronósticos o predictivos. Algunos marcadores serológicos e histológicos típicamente asociados con melanoma incluyen lactato deshidrogenasa (LDH), tirosinasa, la familia S100 de proteínas de unión a calcio, ciclooxigenasa-2 y metaloproteinasas de matriz. En realidad, algunos marcadores de melanoma también se utilizan para identificar algunas subpoblaciones de células que muestran un potencial significativo para impulsar la carcinogénesis, la metástasis y la resistencia a los medicamentos (75, 177-179).

A pesar de todos los avances significativos realizados en los últimos años con el fin de proporcionar información sobre el comportamiento y el resultado del melanoma, esta neoplasia sigue siendo impredecible. Por lo que se deben realizar más

esfuerzos para encontrar biomarcadores adecuados para la detección temprana, la estadificación correcta, evitar el sobrediagnóstico y la discriminación de otras neoplasias malignas de la piel, y también beneficiar el pronóstico de los pacientes y los tratamientos personalizados.

1.6.6 Subunidad 1 alfa del factor inducible por hipoxia (HIF1 α)

La subunidad 1 alfa del factor inducible por hipoxia (HIF1 α) es una proteína codificada por el gen del mismo nombre (HIF1 α). La hipoxia induce la expresión de numerosos cambios en la expresión de genes que contribuyen a la progresión de muchos tipos de cáncer, incluyendo el melanoma. El factor de transcripción HIF1 α es un regulador crítico de la respuesta de hipoxia celular, sin embargo, los genes que responden a la hipoxia y la señalización de HIF1 α son altamente específicos del tejido. Hay cambios de expresión de genes que ocurren bajo hipoxia y son regulados directamente por HIF1 α en los melanocitos. Los tumores no pueden crecer más de 1-2 mm³ en ausencia de angiogénesis debido a la falta de suministro de oxígeno, por lo que el centro del tumor entra en apoptosis y las respuestas a la hipoxia están mediadas principalmente por HIF1 α , el cual es el principal mediador de las respuestas a la hipoxia debido a la regulación de muchas proteínas inducibles por hipoxia aunque este hecho sigue estando en controversia. Se ha visto también que la expresión de HIF1 α se expresa más en los melanocitos de los alrededores de las áreas necróticas. El gen HIF1 α de señalización directa de tejido específico y la hipoxia son unos de los responsables de la regulación de la progresión del tumor, la invasión y la metástasis. Se ha demostrado que HIF1 α aumenta la capacidad de invasión del tumor mediante la regulación negativa de E-Cadherina, ya que esta reduce la invasión tumoral. Con respecto a la relación con la E-Cadherina se ha visto que una sobrerregulación de HIF1 α provoca una disminución en la expresión de la E-Cadherina tanto transcripcional como en la traducción (180) (Fig. 1.14).

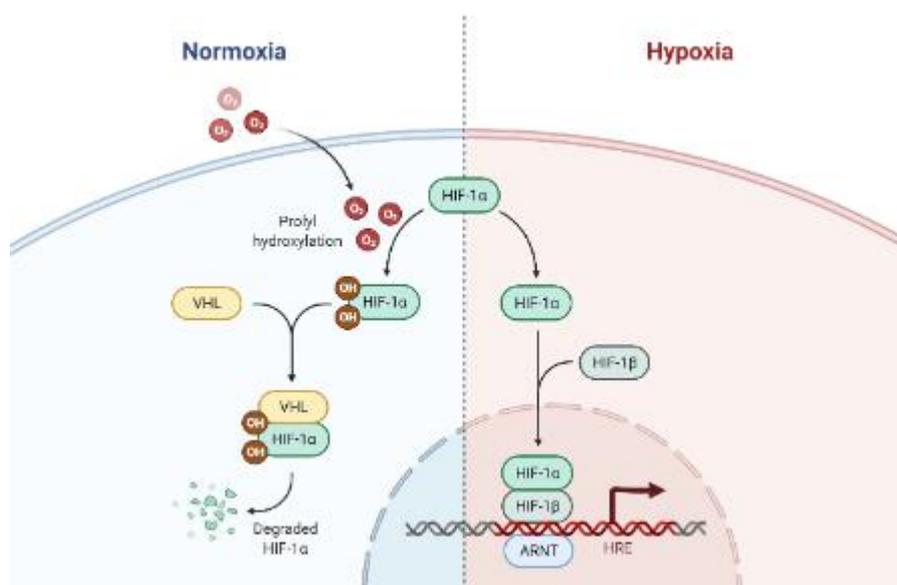


Figura 1.14: Rutas de activación HIF-1α. A la derecha en condiciones de normoxia y a la izquierda en condiciones de hipoxia. Imagen diseñada en Biorender.com.

1.6.7 E-Cadherina y N-Cadherina

La adhesión celular tiene un papel muy importante en la progresión del melanoma. En la piel normal, los melanocitos se adhieren alrededor de los queratinocitos en la epidermis. Sin embargo, en el melanoma y sus metástasis, las células de melanoma se separan de la epidermis y se adhieren a las células estromales y endoteliales. Estos cambios son probablemente debidos por la alteración de la expresión de moléculas de adhesión celular como las cadherinas, que participan en la adhesión célula-célula y señalización celular. En melanoma hay dos cadherinas de especial atención. En primer, lugar la E-Cadherina, que es expresada por queratinocitos y melanocitos y media las interacciones queratinocito/queratinocito y queratinocitos/melanocitos. En segundo, lugar N-Cadherina, que normalmente no se expresa en los melanocitos de la epidermis. La N-Cadherina interviene en las interacciones célula a célula, entre las células de melanoma y células de melanoma, fibroblastos y células endoteliales (181). La fosfatidilinositol 3-quinasa/ Akt (PI3K) es la vía, mediante la cual se lleva a cabo la regulación de funciones celulares críticas mediadas por Akt activada. La pérdida de expresión de PTEN conduce a reducción

de la apoptosis y la activación constitutiva de la vía PI3K, que es el interruptor de la N-Cadherina en líneas celulares de melanoma (182). La regulación a la baja de la expresión o función de la E-Cadherina es un factor crítico de la progresión del tumor, así como la interrupción de la E-Cadherina mediada por la adhesión celular está vinculado con la invasión tumoral lo que fuerza la reexpresión resultado de la reversión del fenotipo tumorigénico. Hay un interruptor entre la E-Cadherina y la N-Cadherina, ya que la primera se deja de expresar en melanoma y la segunda aumenta su regulación en melanoma por lo que se relaciona con la progresión del tumor (Fig. 1.15) (183).

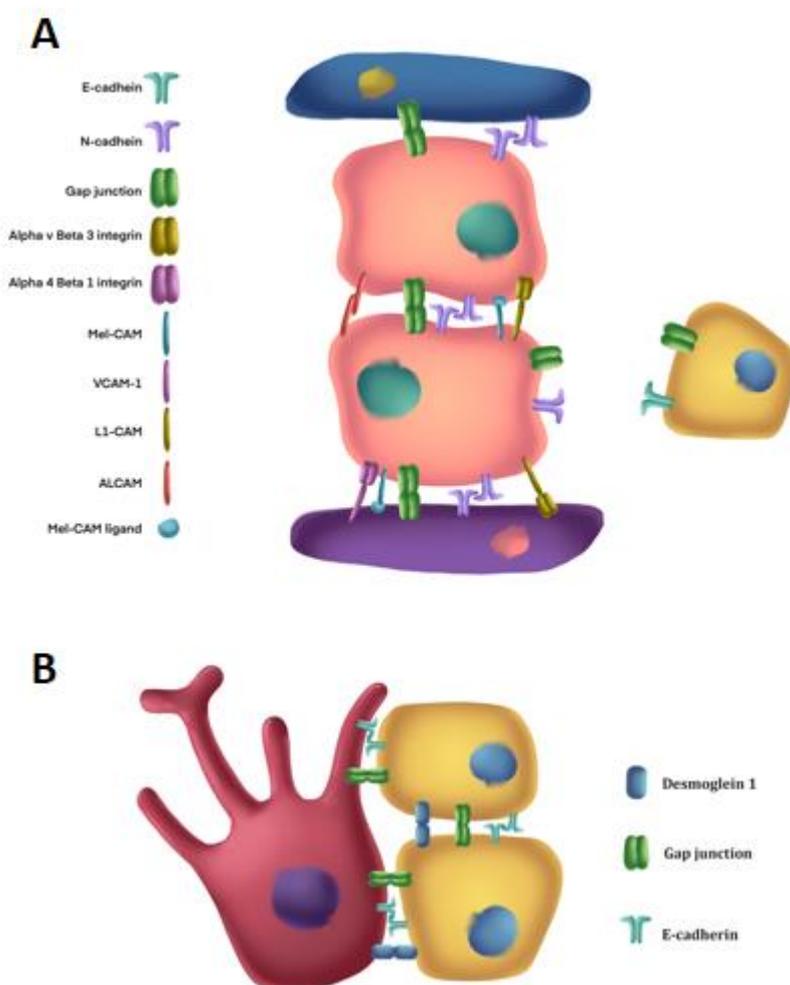


Figura 1.15: Adhesión de melanocitos y células de melanoma. A) Unión de los melanocitos a los queratinocitos mediante la E-Cadherina y desmogleína 1, comunicándose entre sí a través de las uniones específicas con las células en su entorno. (B) La E-Cadherina, en las células de melanoma está

regulada negativamente. A través de la N-Cadherina interactúan entre sí varios ligandos y conexinas. Imagen modificada de (183).

1.6.8 Proteína de unión a ARNm de factor de crecimiento similar a insulina II (IMP3)

Es una proteína de unión a ARNm de factor de crecimiento similar a insulina II (IMP3) también conocida como L523S que se sobreexpresa en células neoplásicas (184). IMP3 es una proteína oncofetal de 580 aminoácidos con dos motivos de reconocimiento de ARN y cuatro dominios de homología K que están codificados por un transcrito de mRNA de 4350 pb producido por el gen *IGF2BP3* en el cromosoma 7p11.5 (185). Se le considera una proteína oncofetal debido a su participación en la embriogénesis y su sobreexpresión en una variedad de neoplasias malignas. Los estudios han encontrado que IMP3 se asocia especialmente con cánceres agresivos y avanzados, y su expresión se ha observado específicamente en tumores malignos, pero no en tejidos normales adyacentes. Investigaciones in vitro han revelado que IMP3 puede promover la proliferación, adhesión e invasión de células tumorales, lo que sugiere un papel importante en la progresión del cáncer (186).

Chen y colaboradores en un metaanálisis donde se incluyeron un total de 53 estudios que contenían 8.937 pacientes con tumores sólidos encontraron una asociación significativa entre la alta expresión de IMP3 con una peor supervivencia general (SG) de los tumores sólidos (HR=2.08, IC del 95%: 1.80-2.42, $p<0.001$); en la supervivencia específica del cáncer; en la supervivencia libre de enfermedad; en la supervivencia libre de recurrencia; en la SSP y la supervivencia libre de metástasis. Un análisis de subgrupos adicional estratificado por tipo de tumor mostró que la expresión elevada de IMP3 se asociaba con una SG deficiente en el carcinoma de células renales, el cáncer de pulmón, el cáncer oral, el carcinoma urotelial, el carcinoma hepatocelular, el cáncer colorrectal, el cáncer de páncreas, el cáncer gástrico y colangiocarcinoma intrahepático, concluyendo que la evidencia actual sugiere que la alta expresión de IMP3 se asocia con un mal pronóstico en la mayoría

de los tumores sólidos. IMP3 es un factor pronóstico potencialmente valioso y podría servir como un biomarcador prometedor para guiar las decisiones clínicas en tumores sólidos humanos (187).

En el estudio de Pryor et al. (186) sugieren que IMP3 es un nuevo biomarcador de progresión en el melanoma maligno. IMP3 se expresa en mayor proporción en melanomas que en nevus y en melanomas metastásicos más que en melanomas delgados. IMP3 parece estar involucrado en la progresión del melanoma maligno y puede desempeñar un papel importante en la regulación del comportamiento biológico de este tumor (185, 186).

1.6.9 Poli-ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP-1)

El enzima poli-ADP-ribosa polimerasa 1 (PARP-1), también conocido como ADP-ribosiltransferasa-1, ADPRT-1, o poli (ADP-ribosa) sintasa-1 es uno de los enzimas nucleares más abundantes presentes en células eucariotas. Desempeña diversos papeles en muchos procesos moleculares y celulares, incluidos detección y reparación del daño en el ADN. PARP-1 es un sensor interruptor molecular de daño de ADN. Como resultado de la inestabilidad inherente de la cadena sencilla de ADN bien por causas endógenas como productos tóxicos del metabolismo o exógenas, además si estas roturas persisten pueden convertirse en daño permanente en la doble hélice (188).

El alelo rs321090 T está asociado con un menor riesgo de melanoma (189). Law y colaboradores han estudiado la variación de PARP-1 y la supervivencia del melanoma (190) y señalan coincidiendo con el trabajo previo de Davies et al. (191), que alelos protectores de PARP-1 se asocian significativamente con reducción de la supervivencia específica del melanoma. Según se ha demostrado en estudios la inhibición de PARP-1 puede inducir efectos antineoplásicos cuando se utilizan como monoterapia o en combinación con quimioterapia o radioterapia; sin embargo, la base para las actividades anti-metastásicas resultantes de la inhibición de PARP-1 sigue siendo desconocida. Los inhibidores de la PARP-1 pueden también actuar como

moduladores de la angiogénesis tumoral. En las células del melanoma, la inhibición de la PARP reduce los marcadores pro-metastásico (192).

1.6.10 EMP1

EMP1, también conocida como proteína 1 epitelial de membrana, es una proteína que desempeña un papel en la formación y mantenimiento de las membranas celulares. Se encuentra principalmente en células epiteliales. Aunque EMP1 no ha sido tan extensamente estudiada como otras proteínas de unión a ARN como IMP1, IMP2 e IMP3, se ha encontrado que está implicada en diversos procesos biológicos y patológicos como la regulación de la proliferación celular, la adhesión celular y la migración celular en diversos contextos (192).

Incluye varias isoformas, EMP1, EMP2 y EMP3, que corresponden a los genes funcionales 1, 2 y 3 respectivamente. Pertenecen a la familia de genes de la proteína de mielina periférica de 22 kDa (PMP22), que codifica un grupo de proteínas con una homología de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 40%, cuatro dominios putativos asociados a la membrana y una cadena unida a carbohidratos en el dominio extracelular. El miembro más destacado de esta familia de genes es el gen *PMP22*, que está implicado en la formación y el mantenimiento de la mielina y se ha propuesto participar en el control del crecimiento celular (193).

Tanto EMP1 (proteína de membrana epitelial 1) como PMP22 (proteína de mielina P22) son proteínas de membrana que contienen dominios extracelulares que están sujetos a glicosilación ligada a N. La glicosilación ligada a N en el dominio extracelular de estas proteínas puede ser comparable en términos de su naturaleza y función, aunque pueden haber diferencias específicas dependiendo de las secuencias de aminoácidos y la estructura tridimensional de los dominios extracelulares de EMP1 y PMP22 (154). EMP1 lleva la glicosilación ligada a N en la misma posición que PMP22, lo que implica que EMP1 interviene en la proliferación y diferenciación celular. EMP1 se ha aislado de tejidos de humanos, de conejos, ratas, y ratones y se ha etiquetado con varias denominaciones: EMP1, Tmp, PAP, CL-20 y B4B. Aunque

ambas proteínas están implicadas en la formación y mantenimiento de las membranas celulares, y se expresan en tejidos que contienen células epiteliales y nervios periféricos, existen diferencias en cuanto a su distribución tisular específica y sus funciones específicas (194).

Similar a PMP22, el perfil de expresión de EMP1 en el cáncer es mixto, con resultados contradictorios entre estudios de ARNm y proteínas. Por ejemplo, se analizó el perfil de expresión génica de 50 gliomas humanos utilizando una plataforma de micromatrices de cADN. El ARNm de EMP1 se reguló positivamente y se correlacionó con un aumento en el oncogén *MYC* (195). En otros tipos de cáncer se han observado resultados similares como en el cáncer de mama, las células epiteliales luminales mamarias humanas inmortalizadas que expresan niveles moderados y altos del receptor ERBB2 y se observó que la expresión del gen *EMP1* estaba significativamente elevada en las células que sobreexpresaban ERBB2 (196). La sobreexpresión de EMP1 se investigó también como un nuevo factor de mal pronóstico en leucemias que puede regular la resistencia a la prednisolona, la proliferación celular, la migración y la adhesión (197). Los pacientes con BCP-ALL con altos niveles de EMP1 mostraron una supervivencia libre de eventos de cinco años significativamente más pobre en comparación con los pacientes con baja expresión con un análisis de vía que sugiere que EMP1 emite señales a través de las quinasas de la familia Src (197).

Algunos estudios han encontrado evidencia de que EMP1 puede actuar como un supresor tumoral en ciertos tipos de cáncer. Por ejemplo, se ha demostrado que EMP1 inhibe la proliferación, la invasión y la migración celular en modelos experimentales de cáncer de mama, cáncer de colon, así como en carcinoma oral de células escamosas (OSCC), el carcinoma nasofaríngeo y el cáncer de próstata (194, 198, 199).

1.7 Tratamiento del Melanoma en modelos experimentales

1.7.1 Radioterapia

La radioterapia (RT) es una herramienta fundamental para tratamiento y control efectivo del cáncer. Se estima que alrededor de la mitad de los pacientes con enfermedad localizada (200) y en fase paliativa (201) se tratarán con radioterapia (RT). El éxito de la RT en la erradicación de los tumores depende de la dosis de radiación total que se aplica (202). Sin embargo, hay dosis límites de RT que se pueden aplicar de forma segura, dependiendo de la tolerancia de los tejidos normales que rodean el tumor (203, 204) y la elevada sensibilidad intrínseca de los tejidos normales a las radiaciones ionizantes a menudo impide la aplicación de dosis de radiación curativa (205, 206). Los avances tecnológicos en el suministro de radiación han sido fundamentales para el desarrollo de protocolos de tratamiento de alta precisión en radioterapia. Estos avances han mejorado significativamente la precisión y la eficacia de la radioterapia, al tiempo que reducen al mínimo los efectos secundarios y la toxicidad en los tejidos sanos circundantes (207), y el mismo progreso se ha logrado en el desarrollo de modelos predictivos en los resultados del tratamiento (208).

Sin embargo, la recurrencia local y las metástasis a distancia son las principales causas de muerte en muchos pacientes con cáncer. Además, la radioterapia y la cirugía no curan los cánceres metastásicos. Por lo tanto, existe una creciente necesidad de desarrollar terapias más eficaces y menos tóxicas, y cualquier mejora en la eficacia de la radioterapia, particularmente en cáncer metastásico, sin duda beneficiará a un número significativo de pacientes (209–211).

Los mecanismos a través de los cuales la radiación induce la muerte y sobre las consecuencias que este daño genera a nivel celular en tumores y en tejidos normales (203, 212) se han extraído de los datos de la supervivencia y el daño celular después de la radiación. Los modelos actuales para explicar el resultado del crecimiento tumoral y los efectos adversos de la RT han evolucionado para reconocer que no solo el daño directo del ADN en las células irradiadas es relevante, sino que también los

procesos de señalización celular en las células no irradiadas pueden desempeñar un papel crucial en el efecto de la RT. Este fenómeno se conoce como el efecto "*bystander*" o efecto espectador de la radiación (212) (Fig. 1.16).

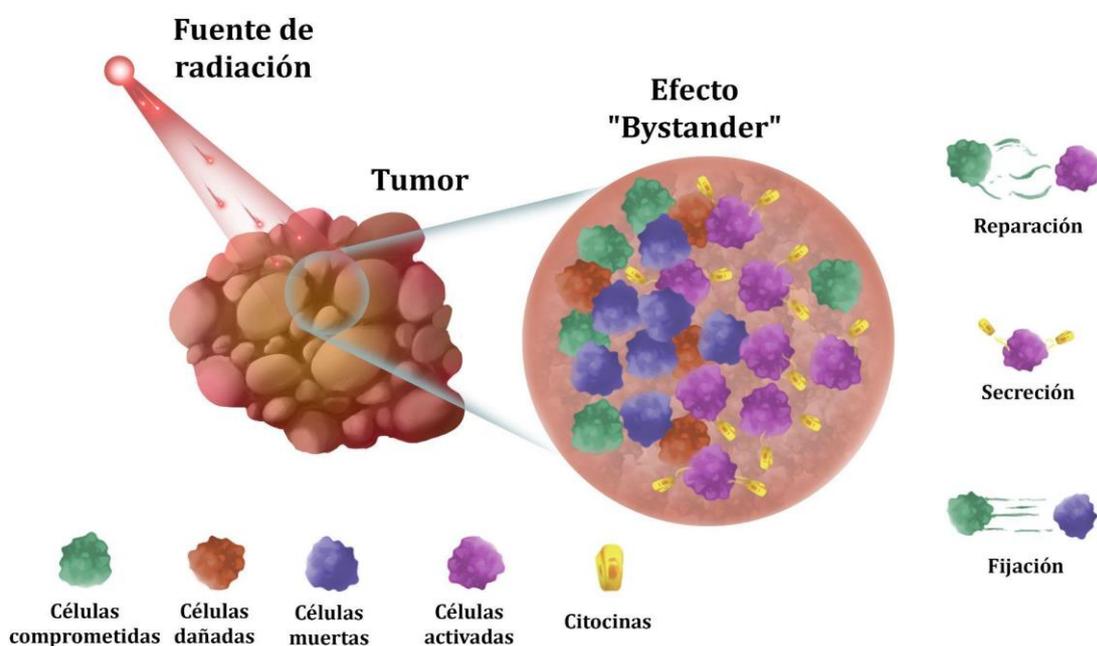


Figura 1.16: Efecto *bystander* o efecto espectador de la radiación. Esquema modificado de Lara y cols. (213).

Los nuevos modelos deberían combinar los factores predictivos y pronósticos de datos clínicos, moleculares y otras fuentes para lograr la mayor precisión predictiva de la respuesta del tumor y el seguimiento de las tasas de recidiva (208, 210). En consecuencia, modelos que incluyen el efecto *bystander* parecen ser necesarios (213). De hecho, la comunicación célula-célula entre las células dañadas subletalmente, que sobreviven después de la RT conduce a una reducción de las células cancerosas viables restantes (214). Por lo tanto, los efectos de radiación a distancia podrían considerarse como la respuesta del tumor (215) y los tejidos normales a la tensión inducida por la radiación en la zona diana (216).

Los mecanismos a través de los cuales la radiación induce la muerte y sobre las consecuencias que este daño genera a nivel celular en tumores y en tejido normal (203, 210) se han extraído de los datos de la supervivencia y el daño celular después de la radiación (217–219). Los modelos que se proponen hasta ahora para explicar el

resultado del crecimiento tumoral y los efectos adversos de la radioterapia han llevado a los conocimientos actuales de que no sólo el daño del ADN, sino también los procesos de señalización celular en las células no radiadas (efecto *bystander* o espectador) pueden ser cruciales para el efecto de la radioterapia. Los nuevos modelos deberían combinar los factores predictivos y pronósticos de datos de la clínica, molecular y otras fuentes para lograr la mayor precisión para predecir la respuesta del tumor y el seguimiento de las tasas de recidiva (208, 210, 212).

1.7.2 Células Madre o Progenitoras

Las células madre o progenitoras se denominan así debido a que a partir de las mismas se pueden generar todos los tipos celulares que encontramos en un organismo. Son las madres y progenitoras de su descendencia celular dirigida hacia la formación de tejidos y órganos hasta la formación de un individuo completo. Por lo tanto, una célula madre tiene la función de convertirse en célula de la piel, neurona o célula del pulmón, dependiendo de su camino hacia la especialización. A esta capacidad de ser cualquier célula es conocida como pluripotencialidad y podría ser una característica exclusiva de las células madre embrionarias. Por lo tanto, pueden formar cualquier tipo celular, desde un adipocito hasta un glóbulo rojo pero no generar al individuo completo.

El paso a la diferenciación implica especialización y en este punto reducen su capacidad de ser potentes. La especialización no es fruto del azar por lo tanto cada paso hacia la diferenciación se controla hasta en el más mínimo detalle a través de complejas combinaciones de sustancias químicas y señales genéticas. A medida que avanzan en su ciclo de diferenciación, su plasticidad se va viendo disminuida y pasan de ser células pluripotenciales a multipotenciales. Las células multipotentes pueden convertirse en diferentes tipos celulares, pero no en todos, y serían por tanto potentes o capaces para ciertos fines. Podríamos llamarlas células organoespecíficas, es decir, que pueden originar cualquier tipo de células pero de un órgano concreto (de hígado, riñón o el cerebro). El término de la diferenciación es el momento en el que se

especializan y pasan a ser una célula con una función determinada dentro de un tejido o de un órgano concreto. En este instante ha finalizado su ciclo de diferenciación y ya no disponen de ninguna plasticidad. Son, sencillamente, células especializadas (220).

1.7.2.1 Tipos

Las células madre se pueden clasificar de distintas formas:

a) Según su potencialidad o capacidad de diferenciación (220):

a.1) Totipotentes: Pueden diferenciarse en tejido embrionario (por ejemplo: corazón, pulmón, etc.) como en tejido extraembrionario (placenta y anejos placentarios). Solo las células en estadio inicial de desarrollo como el cigoto, blastómeros y células de la mórula).

a.2) Pluripotentes: Dentro de este grupo tenemos a aquellas que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo celular de los tejidos del individuo adulto correspondería a los tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) y las células germinales.

a.3) Multipotentes: Son aquellas capaces de llevar a cabo la diferenciación a distintos tipos celulares, dentro de una misma capa embrionaria nos encontraríamos con los tejidos derivados del ectodermo, mesodermo o endodermo.

a.4) Unipotentes: Tienen capacidad para diferenciarse solamente en un único linaje celular.

b) Según su origen, se pueden dividir en:

b.1) Embrionarias: en sus primeras fases de desarrollo (células madre de origen embrionario) (221-223),

b.2) Adultas: En el caso de las células madre adultas pueden obtenerse bien a partir de las reservas que el organismo adulto mantiene con el fin de reparar los daños que se producen en los tejidos, o bien de las células presentes en el cordón umbilical (221-223).

Dentro de las células madre adultas, nos encontramos con las células madre mesenquimales, también llamadas células progenitoras mesenquimales, las cuales se

encuentran repartidas en el tejido conectivo de diversos órganos, como la médula ósea (224), la sangre periférica (225), el cordón umbilical (226), el hueso trabecular (227), el tejido adiposo (228), el tejido sinovial (229), en los dientes deciduales (230), en el músculo esquelético (231) y en algunos tejidos del feto (232). Hasta el momento, y desde un punto de vista terapéutico, las células mesenquimales de la médula ósea han sido las más estudiadas en diversas enfermedades, ya sea en la reparación de distintos tejidos dañados (233) o en la terapia génica (234); e incluso, en la práctica clínica se utilizan como tratamiento de algunas enfermedades hematológicas y oncológicas tales como la anemia aplásica (235), y el linfoma maligno (236). Sin embargo, desde un punto de vista práctico, estas células presentan dos inconvenientes fundamentalmente: 1) el método de obtención es invasivo y doloroso para el donante, 2) su capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación decrece con la edad (237, 238). Por esos motivos, es necesario estudiar otras fuentes de células mesenquimales que no tengan esas desventajas, como son las células madre del cordón umbilical objeto de esta tesis.

1.7.2.1.1 Células Madre Mesenquimales

Entre las poblaciones de células madre, las células madre mesenquimales (MSC) son las más estudiadas y consiguen resultados óptimos para la investigación médica regenerativa. Las MSC son ubicuas y no están limitadas a los tejidos de origen mesodérmico, como tejido medular, adiposo, óseo y muscular (239) (Fig. 1.17). Estas poblaciones han sido caracterizadas en base a que son adherentes, son capaces de diferenciarse a osteoblastos, condrocitos y adipocitos en cultivo, y expresan los marcadores característicos de las células MSC como son CD73, CD90 y CD105, siendo negativas para marcadores de células del linaje hematopoyético y epitelial (239, 240).

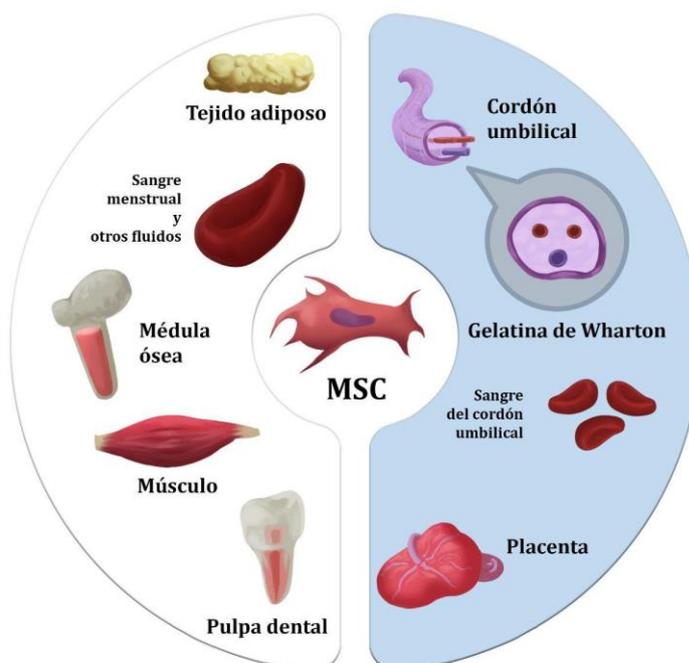


Figura 1.17: Las dos fuentes principales de MSC: fuentes adultas y perinatales. Las fuentes adultas de MSC son tejidos específicos del cuerpo humano donde se pueden aislar MSC, incluida la médula ósea, el tejido adiposo, la pulpa dental, la sangre periférica, la sangre menstrual, los músculos, etc. Las fuentes perinatales de MSC consisten en componentes derivados del cordón umbilical, como cordón umbilical, gelatina de Wharton, sangre de cordón umbilical y estructuras placentarias, como membrana placentaria, amnios, membrana corion, líquido amniótico, etc. La figura creada con BioRender.com (241).

Las MSC tienen capacidades de autorrenovación y diferenciación hacia diferentes tipos celulares (242). Las MSC del cordón umbilical (UC-MS) en comparación con otro origen, pueden ser una fuente de MSC interesante debido a que se pueden aislar de manera no invasiva, tienen menos limitaciones éticas, mayor accesibilidad y disponibilidad, mayor capacidad de expansión, capacidad inmunomoduladora, no producen teratomas *in vivo*, son consideradas como la población más primitiva de MSC, que las derivadas de tejidos más maduros, por lo que podrían tener propiedades intermedias entre las células madre embrionarias y las células madre adultas (243, 244). El cordón umbilical contiene dos arterias umbilicales y una vena umbilical, ambas están rodeadas de un tejido mucoso conectivo llamado gelatina de Wharton de donde se extraen estas células UC-MS.

Las células destinadas a la terapia celular pueden provenir del mismo origen que el receptor (origen autólogo) o de un donante diferente al receptor (origen alogénico). Las opciones de terapia autóloga son ideales porque aseguran la histocompatibilidad y hacen que el rechazo sea muy improbable. Por otro lado, las MSC alogénicas conllevan un riesgo mínimo de rechazo ya que expresan bajas cantidades de MHC-I (245), se consideran inmunes privilegiadas porque son también negativas para HLA de clase II, CD80 y CD86 y son capaces de modular la reacción inmune *in vitro* e *in vivo*, a través del contacto célula-célula y la secreción de citocinas solubles (246,247). Por lo tanto las MSC tienen el potencial para ser utilizadas en nuevas terapias para el tratamiento de una amplia gama de enfermedades sin tratamiento eficaz hasta el momento (246).

1.7.2.2 Seguridad en el uso de las MSC

Las MSC se han utilizado en diversos ensayos clínicos de diferentes patologías neoplásicas y no neoplásicas. En el año 1995, Lazarus y cols. demostraron que la utilización de MSC era segura y efectiva para reducir las neoplasias malignas hematológicas (248). En este estudio se infundieron con MSC autólogas de médula ósea cultivadas, a 23 pacientes con neoplasias hematológicas, y se detectó una reducción completa y ningún efecto adverso en la administración de las MSC. En otro estudio, se utilizó MSC con éxito para tratar a niños con osteogénesis imperfecta. Tres meses después del injerto de los osteoblastos, las muestras representativas del hueso trabecular mostraron cambios histológicos indicativos de la formación de hueso nuevo. Todos los pacientes presentaron aumentos en el contenido mineral total óseo. Estas mejoras se asociaron con aumentos en la velocidad de crecimiento y reducción en la frecuencia de fractura ósea (249). Desde entonces se han utilizado MSC autólogas y heterólogas de diversos orígenes para el tratamiento de diversas enfermedades (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Ejemplos de ensayos clínicos en los que se utilizaron MSC para tratar diferentes enfermedades.

Tejido de origen Donante Condición Referencia
-Médula ósea Heterólogo Enfermedad grave de injerto contra huésped (200,201).
-Médula ósea Autólogo Cardiomiopatía isquémica (202).
-Cordón umbilical Heterólogo Rechazo agudo tras trasplante de hígado (203).
-Médula ósea Autólogo Lesión cerebral traumática (256).
-Médula ósea Autólogo Infarto del miocardio antiguo (257).

La capacidad de las MSC de acumularse en los tumores las hace extremadamente atractivas para la terapia dirigida contra el cáncer. Se han observado migración dirigida e incorporación de MSC hacia el microambiente tumoral primario y metastásico con casi todos los tipos de cáncer examinados, incluidos cáncer de pulmón (248), cáncer S.N.C. (250), cáncer de mama (251), cáncer de colon (252), cáncer de páncreas (253) y cáncer de ovario (254). Estos estudios demuestran un tropismo evidente de las MSC hacia el microambiente tumoral, pero los mecanismos subyacentes responsables del potencial migratorio de las MSC están poco estudiadas y deberían conocerse por completo antes de su paso a la práctica clínica como cita Hong, Lee y Kang. Por lo que, aunque el uso de MSC para la terapia del cáncer se considera como una herramienta útil, se ve limitado por la variabilidad de los donantes, su limitada capacidad de expansión y en algún caso por su potencial inducción de neoplasias al modular la vigilancia inmunológica, pudiendo favorecer la metástasis y mediando en la transición epitelio-mesenquimal (255). Además, como las MSC no son simples vectores inertes, el posible efecto directo de las MSC sobre el crecimiento tumoral no puede ser descartado. El desarrollo de una terapia nueva

generalmente requiere prudencia y un diálogo constante entre los científicos básicos y los médicos, para llevar a cabo ensayos clínicos cuidadosamente diseñados (256).

1.7.2.3 Riesgos del uso de las MSC

En la actualidad, la terapia con MSC se está utilizando en numerosos ensayos clínicos en los campos de la medicina regenerativa, la inmunoterapia y el trasplante de órganos (256). Los medicamentos basados en células se deben fabricar de acuerdo con las normas de las autoridades reguladoras, que evalúan los datos de calidad y seguridad antes de su uso en humanos (14, 257). En cuanto a la calidad del producto, la Sociedad Internacional de Terapia Celular ha establecido una serie de criterios mínimos para definir la identidad y la potencia de las MSC humanas (258). Sin embargo, los lotes de MSC difieren en sus características como resultado del tipo de tejido de origen, de la variabilidad del donante y por último de la diversidad existente de procedimientos para su aislamiento, expansión, almacenamiento y formulación final (259-261). Se debe garantizar la seguridad y eficacia de las MSC, cualquiera que sea la fuente de células, y por lo tanto, los estudios de dosis y biodistribución son fundamentales en las pruebas de seguridad. Es importante el hecho de demostrar que las MSC no tengan un efecto no deseado y que puedan conducir a una diferenciación anómala en algún órgano o propiciar el desarrollo de alguna neoplasia.

Con respecto a la forma de administrar las MSC se ha visto que la inyección intravenosa (IV) de MSC está limitada por el atrapamiento de las células en los pulmones (254). Esto podría limitar la biodisponibilidad de las células, su tráfico a los tejidos y, posiblemente, sus efectos terapéuticos (262). Otros estudios demuestran claramente la supervivencia a corto plazo de las MSC infundidas y la falta de distribución viable más allá de los pulmones (263, 264). Estos datos sugieren que este proceso puede a partir de los pulmones y convertirse en una respuesta inmunológica en las zonas de inflamación y lesión. La investigación futura tendrá que revelar qué señales conducen esta respuesta a través del organismo (262).

Varios estudios demuestran que la biodistribución de MSC xenogénicas inyectadas por vía intraarterial (IA) permite la mejor biodistribución cuando es

comparada a la inyección por vía IV (265, 266). En modelos en los que se utiliza la inyección local, por ejemplo, intraarticular (267) e intramuscular (268), las células permanecen durante más tiempo en el lugar de la inoculación (265). En humanos hay pocos datos disponibles sobre la biodistribución de MSC infundidas. Los resultados pueden ser similares a los encontrados en los modelos de roedores en términos de atrapamiento pulmonar, con diferencias que podrían estar relacionadas con la enfermedad o especie (269).

La influencia de la irradiación en la migración y la biodistribución de MSC en un estudio en ratones de François y cols. mostraron que tanto la irradiación corporal total como la irradiación local afectaron la distribución de UC-MSc infundidas por vía IV en ratones NOD/SCID en comparación con animales no tratados. Las MSC infundidas por vía IV se encontraron en cantidades mínimas exclusivamente en el pulmón, la médula ósea y los músculos en animales control no irradiados. En los ratones después de la irradiación corporal total el número de MSC en cerebro, corazón, médula, ósea y músculos se ve incrementado, además, la radiación selectiva de las extremidades o el abdomen produjo mayor presencia de MSC en la piel o los músculos expuestos, que con la irradiación corporal total sola. La presencia de MSC fuera de las regiones localmente irradiadas también se incrementó, lo que sugiere los efectos locales y sistémicos de la irradiación en el tropismo de las MSC (270). Sémont y cols. estudiaron el tropismo y la eficacia de las MSC trasplantadas en un modelo de ratón inmunodeficiente de falla del tracto gastrointestinal inducida por la radiación. Demostrando recuperación acelerada en el grupo que recibió MSC, con disminución de la apoptosis de células epiteliales y mayor proliferación dentro de la mucosa del intestino delgado. Sin embargo, las MSC trasplantadas no se detectaron en cantidades significativas (271, 272).

De las metodologías utilizadas para la detección de MSC en tejidos, la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) muestra detección específica y la sensibilidad más adecuada. La combinación de qPCR y análisis histopatológico para obtener información del posicionamiento espacial en muestras positivas resultantes de análisis de qPCR es lo más recomendable (272, 273).

1.7.2.4 Terapia combinada de MSC con RT

Las células MSC pueden ser reclutadas por los tumores y una vez en su interior, las MSC se incorporan al estroma y podrían permanecer en el nicho de los pericitos, en las paredes de los vasos que nutren el proceso neoplásico (216). Las MSC migran al tejido dañado o focos de inflamación en respuesta a citoquinas secretadas. Del mismo modo, el entorno del tumor consiste en un gran número de células inmunes, que junto con las células tumorales secretan factores solubles tales como VEGF, PDGF, IL-8, IL-6, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF2), derivadas de células estromales factor 1 (SDF-1), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), proteína 1 quimioatrayente de monocito (MCP1), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), TGF- β receptor del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (UPAR), que atrae a las MSC. Aunque, las rutas moleculares exactas que gobiernan este tropismo no se conocen en su totalidad (274).

Se ha descrito que el tropismo tumoral de MSC aumenta con la RT (275). Araújo Farias y cols. han demostrado, recientemente, que la combinación de la terapia con células MSC y RT reduce significativamente el tamaño de melanomas xenoinplantados en ratones NOD/SCID-gamma (NSG) y de los tumores distantes que no recibieron irradiación. Además de conocer que las MSC tras exposición con radiación *in vitro*, secretan citoquinas y proteínas supresoras de tumores como TRAIL y DKK3 (276). TRAIL es una citoquina, producida y secretada por la mayoría de las células de tejido normales, implicada en la apoptosis principalmente en células tumorales, y la proteína DKK3 cuya expresión está disminuida en numerosas líneas celulares de cáncer y está relacionada con la supresión de tumores (277). La mejora significativa del efecto de la radiación que se obtiene *in vivo*, probablemente se deba al efecto de la activación por radiación de las MSC inyectadas a los ratones. Según Klopp y cols. la radiación aumenta la expresión de mediadores inflamatorios que podrían mejorar el reclutamiento de MSC en el microambiente tumoral. En su

experimento, carcinomas de mama 4T1 se inyectaron bilateralmente en modelo de ratón (expresando luciferasa de renilla) se irradiaron unilateralmente (1 ó 2 Gy). Veinticuatro horas después, se inyectaron 2×10^5 MSC por vía IV. Se monitorizaron los ratones con imágenes bioluminiscentes para la expresión de renilla luciferasa de luciérnaga tanto en el tumor como en MSC. Cuarenta y ocho horas después de la irradiación, los niveles de injerto de MSC fueron un 34 % más alto en los tumores que recibieron 2Gy que en la rama contralateral no irradiada. La tinción inmunohistoquímica de secciones tumorales de ratones tratados unilateralmente con 2Gy reveló niveles más altos de MSC en el parénquima de tumores irradiados, mientras que una mayor proporción de MSC permaneció asociada a la vasculatura en tumores no irradiados. Los ensayos de migración *in vitro* mostraron un aumento del 50% al 80% en la migración de MSC hacia medios acondicionados de 1 a 5 células Gy 4T1 irradiadas en comparación con células 4T1 no irradiadas. Las células 4T1 irradiadas tenían expresión aumentada de las citoquinas, TFG1ff, VEGF y PDGF-BB (278).

1.7.2.5 Transformación de las MSC

El uso potencial de las MSC para aplicaciones terapéuticas implica un cultivo *in vitro* a gran escala, aumentando la probabilidad de inestabilidad y transformación genética, lo que aumenta la probabilidad de una transformación maligna. Algunos investigadores han descubierto que las células madre pueden sufrir una transformación maligna de forma espontánea durante un período de tiempo en cultivo de más de 5 semanas (279). Por lo tanto, para la aplicación clínica de MSC en diferentes campos de la medicina, su bioseguridad debe ser cuidadosamente investigada. La ausencia de potencial de transformación en MSC cultivadas debe documentarse antes de que estas células puedan ser consideradas en el tratamiento de pacientes, particularmente sujetos inmunocomprometidos, en quienes la alteración de los mecanismos de vigilancia inmunitaria podría favorecer aún más el desarrollo de tumores *in vivo*. La transformación espontánea de MSC en ratones ha sido observada por varios autores Li y cols. Unit y cols. (280, 281), aunque la evidencia

contradictoria sugiere que este puede no ser el caso para UC-MSC. Hay estudios que indican que no hay transformación espontánea en cultivos de UC-MSC a largo plazo (282, 283). Se ha demostrado que las MSC derivadas de médula ósea de ratón experimentan una transformación espontánea después de un cultivo *in vitro* a largo plazo (284,285). Con respecto a las MSC derivadas de tejido adiposo se ha observado transformación maligna también *in vitro*.

Según Chen y cols. aunque la capacidad de diferenciación de la actividad de la telomerasa en UC-MSC muestra una tendencia de disminución gradual con la duración del cultivo, estas células expandidas *in vitro* en medio libre de suero no muestran una aptitud para la transformación espontánea y pueden ser seguras ya que no muestran ningún signo de inmortalización o desarrollo de anormalidades cromosómicas (286). Lo que no se ha estudiado es si el comportamiento de las UC-MSC irradiadas, tanto la biodistribución como su posible capacidad de transformación sigue el patrón del resto de estudios descritos en la literatura.

1.8 Xenotumores

El objetivo principal del desarrollo de modelos animales de xenoinjerto tumoral para la investigación es unir la investigación básica y la clínica y complementar el uso de sistemas modelo *in vitro* (287). El xenoinjerto hace posible el estudio *in vivo* de células tumorales humanas implantadas en ratones inmunocomprometidos donde son tumorigénicas y la posibilidad de rechazo de las células humanas es limitada. Los ratones son los animales más utilizados para los modelos de xenoinjerto tumoral por varias razones que los hacen especialmente adecuados para la investigación preclínica en oncología. Algunas de las características ventajosas clave de los ratones en este contexto incluyen:

- Genoma comparable al humano: Aunque existen diferencias significativas entre el genoma humano y el de los ratones, los ratones tienen un tamaño de genoma comparable al de los humanos y comparten una cantidad significativa de genes con

nosotros. Esto hace que los modelos de ratón sean útiles para estudiar la biología del cáncer y probar terapias potenciales.

- Ciclo reproductivo corto: Los ratones tienen un ciclo reproductivo corto, lo que significa que pueden reproducirse rápidamente y generar camadas en un período de tiempo relativamente corto. Esto permite la generación rápida de grandes cohortes de animales para experimentos, lo que aumenta la eficiencia de la investigación.

- Gran tamaño de camada: Las camadas de ratones suelen ser grandes, lo que aumenta la disponibilidad de sujetos experimentales para estudios. Esto es importante para realizar experimentos con múltiples grupos de tratamiento y para obtener datos estadísticamente significativos.

- Bajo costo de mantenimiento: Los ratones tienen costos de mantenimiento relativamente bajos en comparación con otros modelos animales más grandes, lo que los hace más accesibles para la investigación científica con presupuestos limitados.

- Facilidad de manipulación: Los ratones son pequeños y fáciles de manejar, lo que facilita su manipulación en el laboratorio. Esto es importante para la administración de tratamientos, la toma de muestras y la observación de los animales durante el curso del experimento (288).

Los ratones NOD/SCID son una cepa de ratones inmunodeficientes utilizados comúnmente en investigación biomédica, incluidos los modelos de xenoinjerto tumoral. Estos ratones son una variante del ratón SCID (deficiente en células T y B), pero presentan un nivel adicional de inmunodeficiencia debido a la ausencia o defecto en casi todos los tipos de células inmunes, incluyendo células B, células T, células dendríticas, macrófagos y células asesinas naturales (NK). Esta mayor inmunodeficiencia los hace especialmente útiles para estudiar la biología tumoral y evaluar la eficacia de las terapias antitumorales en un entorno inmunocomprometido (289).

El modelo de xenoinjerto de tumor subcutáneo es un modelo animal clásico utilizado en investigación. Este modelo implica implantar células debajo de la piel de animales inmunodeficientes para desarrollar tumores subcutáneos. Aunque este método tiene varias ventajas, como su simplicidad técnica, la facilidad de seguimiento

del crecimiento tumoral, reproducibilidad y eficacia. Dentro de las limitaciones del modelo de xenoinjerto de tumor subcutáneo encontramos la heterogeneidad tumoral reducida y el microambiente tumoral no nativo lo que limita su utilidad para estudiar las interacciones tumor-estroma y otros aspectos del microambiente tumoral que son importantes en la progresión y respuesta al tratamiento (290).

Nos encontramos con modelos de melanoma murino que demuestran que nuevos medicamentos o terapias contra el cáncer producen resultados de tratamiento muy efectivos e incluso espectaculares. Desafortunadamente, estos resultados preclínicos a menudo van seguidos del fracaso de este mismo fármaco/terapia en los ensayos clínicos, o revelan, en el mejor de los casos, resultados de eficacia modesta en comparación. A pesar de esta discrepancia, hay evidencia de que los modelos de melanoma murino pueden ser predictivos de la eficacia de ciertos tratamientos quimioterapéuticos citotóxicos en humanos. Estos medicamentos pueden tener un mecanismo de acción más directo que puede ser efectivo tanto en modelos murinos como en pacientes humanos. Una posible explicación de por qué algunos tratamientos quimioterapéuticos citotóxicos pueden ser efectivos en modelos murinos y en humanos es que actúan a través de mecanismos de acción más generales que pueden ser conservados entre especies. Estos medicamentos pueden tener como objetivo procesos celulares fundamentales para la proliferación y supervivencia de las células cancerosas, lo que les confiere actividad antitumoral independientemente de las diferencias específicas entre ratones y humanos. Una inspección minuciosa de los estudios retrospectivos y prospectivos en la literatura revela que estos modelos de melanoma murino pueden ser notablemente predictivos de fármacos quimioterapéuticos citotóxicos que tienen actividad en humanos (291).

1.9 Líneas Celulares

Existen multitud de líneas celulares de melanoma humano como A375, A375.MA1, A375.MA2, G361, HMV-1, MM8.1, WM115, SK-Mel5, LOX, MV3, FEMX-1, MeWo, UIISO-Mel6, etc., entre ellas hay grandes diferencias en la tasa de

crecimiento y el tiempo de duplicación de las células, el potencial tumorigénico y la capacidad para inducir metástasis. El tiempo de duplicación es más corto en el caso de las células A375, G361 y HMV-1, más largo en el caso de células MM8.1 y muy prolongado para las células A375.M2 y WM115. Además de diferencias en el tiempo de duplicación de las células en función de la densidad celular en la siembra (292). Por lo que las líneas de tiempo de duplicación cortas son las más adecuadas para su utilización experimental.

La línea celular de melanoma humano G361, establecida a partir de un melanoma primario de una mujer caucásica de 31 años, posee baja capacidad metastásica al igual que la línea parental A375P que fue establecida por Giard DJ, a partir de un melanoma primario de una mujer de 54 años (293). Esta línea desarrolla tumores primarios en los ratones NOD, con un crecimiento del tumor a punto final de 40 días y un peso tumoral medio de 0.93 g (rango 0.4-1.4 g). G361 rara vez metastatiza a nivel pulmonar (tasa metastásica 30%) y desarrolla pocas metástasis, por ello esta línea celular puede considerarse como de baja capacidad metastásica (294).

La línea celular A375P, parental es tumorigénica, pero escasamente metastásica en ratones inmunocomprometidos. Las líneas celulares A375MA1 y A375MA2 son la primera y la segunda derivadas de metástasis pulmonares. También son tumorigénicas y más agresivas; dando lugar a más metástasis pulmonares en ratones inmunocomprometidos en comparación con la línea A375 parental. Las líneas celulares más metastásicas (A375MA1, A375MA2) tienen un mayor potencial proliferativo y un patrón de crecimiento de propagación radial distintivo fuera de las placas multipocillos de cultivos (295).

1.10 Plataforma de Transcriptómica espacial

La histopatología es una rama de la patología que se enfoca en el estudio microscópico de los tejidos biológicos para diagnosticar enfermedades. Las

enfermedades pueden alterar la estructura y la organización de los tejidos a nivel celular y subcelular, lo que puede ser observado a través de la histopatología (296). Estos hallazgos son respaldados por métodos de biología molecular, incluida la hibridación in situ (ISH) (297) e inmunohistoquímica (298), los cuales proporcionaron la capacidad de visualizar los procesos biológicos más directamente mediante el mapeo de ADN, ARN y proteínas dentro de los tejidos. Sin embargo, estos métodos limitan el análisis a un grupo de genes o proteínas a la vez. La revolución “ómica” ha cambiado profundamente nuestra capacidad para caracterizar las células. Los nuevos métodos analizan el genoma completo, el transcriptoma o proteoma en células (299–301). Esto ha llevado al descubrimiento de nuevos tipos de células y estados celulares y proporcionando una comprensión más detallada de los procesos biológicos en la salud y la enfermedad (302–304).

Estas técnicas de alto rendimiento (multiplexado) hasta hace poco tiempo no podían aplicarse in situ, dando como resultado una pérdida de información sobre las relaciones espaciales entre las conocidas poblaciones celulares. Tomo-Seq es una técnica que combina la microscopía de fluorescencia con la secuenciación de ARN para mapear la conectividad cerebral a nivel de células individuales. Esta técnica permite la reconstrucción tridimensional de las proyecciones neuronales y la identificación de los tipos de células neuronales implicadas en la conectividad (292, 294, 305). Las técnicas de microdissección láser son otro ejemplo de métodos utilizados para obtener información resuelta espacialmente en el ámbito de la transcriptómica. Estas técnicas implican el uso de un láser para aislar selectivamente áreas específicas de tejido bajo visualización microscópica. La microdissección láser se utiliza comúnmente para aislar células o regiones de interés de muestras de tejido complejas, como tejidos tumorales o tejidos neuroanatómicos. Una vez que se ha aislado la región de interés, se pueden extraer los ácidos nucleicos, incluido el ARN, para su análisis mediante técnicas de secuenciación de ARN de célula única (scRNA-Seq). Al combinar la microdissección láser con scRNA-Seq se pueden obtener perfiles de expresión génica de alta resolución espacial, lo que permite identificar los tipos

celulares presentes en regiones específicas del tejido y caracterizar sus estados de activación o diferenciación. Esto proporciona información valiosa sobre la heterogeneidad celular y la organización espacial dentro de un tejido (306–310).

El perfilado espacial digital GeoMX® DSP (Nanostring) tiene como función capturar la totalidad de los transcritos específicos en regiones de interés seleccionadas manualmente (311). Existen varias técnicas creativas en el campo de la transcriptómica que se basan en la disociación parcial de tejidos para reconstruir las relaciones espaciales entre células vecinas. Algunas de estas técnicas incluyen ProximID, PICseq y ClumpSeq.

- ProximID: Esta técnica se basa en la proximidad física de células vecinas en un tejido. Utiliza oligonucleótidos que se unen a células vecinas y que luego pueden ser secuenciados para determinar las interacciones entre ellas. Es útil para identificar células que interactúan directamente en un tejido.

- PICseq (Proximity-ligation Informed Cell sequencing): Similar a ProximID, PICseq también se basa en la proximidad física de células. Utiliza sondas que se unen a células vecinas y luego se utiliza la secuenciación para analizar las interacciones entre ellas. Esto permite el estudio de las relaciones entre células en un contexto espacial.

- ClumpSeq: En ClumpSeq, las células se disocian parcialmente y luego se agrupan nuevamente. La idea es que las células que estaban físicamente cerca en el tejido original tienden a agruparse nuevamente durante el proceso de clumpación. Luego, se secuencian las células agrupadas para obtener información sobre las relaciones espaciales entre células vecinas (312–314)

Estas técnicas son importantes porque permiten comprender mejor las interacciones entre células en su entorno natural. Esto significa que se pueden seleccionar genes específicos conocidos por su importancia en ciertos procesos

biológicos o en la interacción entre células para estudiar su expresión en un contexto espacial. Esto proporciona una mayor comprensión de cómo la expresión génica varía entre células vecinas y cómo estas interacciones contribuyen a la función tisular o al desarrollo de patologías (315, 316).

Las nuevas tecnologías completan los enfoques tradicionales de obtener información espacial (como IF, ISH) y las actuales metodologías multiplex con la capacidad de estudiar al mismo tiempo todo el transcriptoma en células individuales facilitando nuevos descubrimientos en diferentes ámbitos, desde la neurociencia al desarrollo del cáncer (317).

1.10.1 Tecnologías de transcriptómica espacial

La secuenciación de ARN espacial o transcriptómica espacial se caracteriza principalmente por su capacidad para medir los perfiles de expresión génica en una región de tejido a nivel de transcriptoma, es decir, analizar la expresión de múltiples genes simultáneamente en su contexto espacial (318, 319). Esta tecnología se caracteriza principalmente en los métodos basados en secuenciación de próxima generación (NGS), información de la codificación posicional en transcripciones antes de la NGS y los basados en enfoques de imágenes, que comprenden métodos basados en la secuenciación in situ (ISS), donde las transcripciones se amplifican y se secuencian el tejido, y métodos basados en hibridación in situ (ISH), donde las sondas de imagen hibridan secuencialmente en el tejido (320–324).

1.10.1.1 Métodos basados en secuenciación de próxima generación (NGS):

Los métodos basados en NGS derivan de las innovaciones conceptuales de RNA-Seq de una célula única, estas metodologías dependen de la adición de un código de barras espacial antes de la preparación de la biblioteca (319). En 2016, Stahl

et al. estableció el primer método basado en NGS para la transcriptómica espacial que permitió la captura de transcriptomas completos en secciones de tejido (324) y después asignar cada transcrito a su ubicación original en el tejido mediante el uso de un código de barras espacial. El proceso básico de este método implica:

- **Captura de ARN poliadenilado.** Se extraen los ARN poliadenilados de las secciones de tejido. Los ARN poliadenilados son una fracción importante del ARN mensajero (ARNm), que contiene información sobre la expresión génica en las células.
- **Etiquetado con un código de barras espacial.** Antes de la transcripción inversa, cada ARN individual se etiqueta con un código de barras espacial. Este código de barras contiene información sobre la ubicación espacial del ARN en la sección de tejido.
- **Transcripción inversa y amplificación.** Los ARN etiquetados se someten a transcripción inversa para convertirlos en ADN complementario (cADN), que luego se amplifica mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Durante este proceso, los cADN conservan los códigos de barras espaciales que se les asignaron previamente.
- **Secuenciación y mapeo.** Los cADN amplificados se secuencian utilizando tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS). Posteriormente, los datos de secuenciación se utilizan para mapear los transcritos a sus ubicaciones espaciales originales utilizando los códigos de barras moleculares posicionales únicos.

Dado que cada portaobjetos consta de poco más de mil puntos (100 μm de diámetro, 200 μm en el centro), se pueden investigar grandes áreas de tejido de forma imparcial sin seleccionar una región o, lo que es más importante, un conjunto de objetivos genéticos (325, 326). La primera vez que se realizó este método fue con bulbo olfativo del ratón y ha sido utilizado desde entonces por otros grupos e incluso para melanoma (327-329).

1.10.1.2 Métodos basados en imágenes

Se han desarrollado dos tipos principales de métodos basados en imágenes para la transcriptómica espacial. Los métodos basados en secuenciación in situ (ISS) e hibridación in situ (ISH) que leen directamente las secuencias de las transcripciones dentro del tejido. Los métodos basados en ISH son una categoría importante de técnicas utilizadas en transcriptómica espacial. Estas técnicas permiten la detección y visualización de ARN específicos en muestras de tejido utilizando sondas complementarias marcadas con fluoróforos. Los pasos de la técnica son:

- **Preparación de la muestra.** Se prepara la muestra de tejido mediante fijación y corte en secciones delgadas.
- **Hibridación con la sonda.** Se aplica una sonda de ARN marcada con un fluoróforo específico que es complementaria a la secuencia diana de ARN en la muestra de tejido. La sonda hibrida con la secuencia diana de ARN presente en la muestra.
- **Lavado y detección.** Después de la hibridación, se realizan lavados para eliminar las sondas no unidas. Las sondas que se han unido se detectan mediante la emisión de fluorescencia del fluoróforo marcador.
- **Imagen y análisis.** Las muestras de tejido se visualizan utilizando microscopía de fluorescencia para capturar imágenes de las sondas marcadas.

Los métodos de ISH son útiles para estudiar la expresión génica a nivel espacial en muestras de tejido. Permiten la visualización directa de ARN específicos en su contexto espacial dentro del tejido, lo que proporciona información sobre la localización celular y los patrones de expresión génica en el tejido (330-332).

Tanto para los métodos basados en ISS como en ISH, la imagen se procesa para generar la matriz de expresión de genes. Para obtener una matriz a nivel de celda, la imagen se segmenta, ya sea manualmente en áreas pequeñas, o sistemáticamente usando un enfoque computacional. Mediante el uso de algoritmos, los núcleos teñidos con DAPI identifican los bordes celulares como regiones con baja densidad de ARN (333). Esto se debe a que las regiones con una baja densidad de ARN, que corresponden a los espacios entre las células, pueden ser identificadas como los bordes celulares. Aunque estos bordes identificados pueden no corresponder exactamente a los límites físicos de las células individuales, sirven como referencia para asignar cada ARNm a una célula específica. Este método es útil para analizar la expresión génica a nivel de célula única en tejidos complejos (334, 335).

1.10.1.3 Perspectivas de la transcriptómica espacial sobre el desarrollo, la fisiología y la enfermedad

Las tecnologías de transcriptómica espacial han sido fundamentales para generar atlas de tejidos, proporcionando una imagen imparcial de la composición espacial de los tejidos. Estos atlas representan valiosos recursos como mapas de referencia para comprender la expresión génica y la organización celular en diferentes tejidos y sistemas biológicos. Los enfoques basados en la técnica de secuenciación espacial (ST) han permitido establecer mapas detallados de todo el cerebro de modelos animales, como el ratón (336). Maynard et al. han identificado patrones espaciales de genes conocidos relacionados con la esquizofrenia y el autismo en su análisis de la corteza prefrontal dorsolateral, que condujo a los mecanismos propuestos de susceptibilidad genética a la esquizofrenia (337). Mediante los atlas de transcriptómica espacial con resolución temporal han sido de gran ayuda para conocer la dinámica espacial del desarrollo del corazón (322), espermatogénesis (338) y el desarrollo intestinal (339). Con el fin de servir como recurso efectivo para la comunidad investigadora, estos atlas han sido el foco de los esfuerzos comunitarios coordinados y son apoyados por el Human Cell Atlas Project (340) y el Instituto Allen

para la Ciencia del Cerebro (341). Más allá del desarrollo y la fisiología de los tejidos normales, la transcriptómica espacial se dirige mayormente al estudio de la desorganización de los tejidos en la enfermedad. Hay estudios sobre la transcriptómica espacial que han permitido la identificación de los mecanismos que subyacen en el cáncer (329, 342-344). La transcriptómica espacial ha sido de gran importancia para estudiar la relación del microambiente tumoral con las células cancerosas (327, 328).

1.10.2 Plataforma GeoMx[®] DSP (Nanostring)

Aunque la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia siguen siendo las principales opciones de tratamiento para muchos tipos de neoplasias, es importante reconocer que estas terapias "tradicionales" están dirigidas principalmente a las células tumorales y no pueden abordar completamente la complejidad del cáncer y su microambiente tumoral (TME) (345). Con el avance de la terapia dirigida y la oncología de precisión, se ha vuelto cada vez más importante identificar biomarcadores tanto en el tumor como en TME. Esto es especialmente relevante en el contexto de la inmunoterapia, donde la respuesta del paciente puede variar considerablemente y no todos los pacientes se benefician de manera igual de estos tratamientos (346, 347).

El TME es una entidad dinámica compuesta por células malignas y las células y estructuras tisulares no malignas circundantes, esto incluye a las células inmunitarias, células del estroma, fibras nerviosas, vasos sanguíneos y la matriz extracelular. Las células tumorales son capaces de interactuar y manipular el TME para promover su propio crecimiento, invasión y diseminación metastásica. Estas interacciones entre las células tumorales y las células no malignas circundantes pueden remodelar el TME creando un ambiente favorable para la neoplasia (348-350). El estudio del perfil inmunológico de los tumores es esencial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra el cáncer, como la inmunoterapia (346, 347).

El inmunoperfilado es una técnica que implica la medición y caracterización del sistema inmunitario con el fin de obtener información detallada sobre cómo las células inmunitarias pueden responder a diversas enfermedades y terapias. Esta técnica proporciona una visión integral del estado y la función del sistema inmunitario, lo que puede ser crucial para comprender la dinámica de la respuesta inmune. El inmunoperfilado en tejido tumoral puede representar un desafío cuando las muestras de tejido son pequeñas y la heterogeneidad de los tejidos limitan la evaluación de biomarcadores; por lo tanto, se necesita una selección estricta de muestras y suficiente material de alta calidad evaluado por un control de calidad de patología (351, 352). Con el propósito de corregir la limitación del tejido y obtener una comprensión más completa de la respuesta inmune en muestras biológicas, las tecnologías multiplexadas y de multiplex se han vuelto esenciales en la investigación de inmunoperfiles. Estas tecnologías permiten la identificación simultánea de múltiples proteínas específicas o expresiones moleculares en una muestra de tejido restringida, lo que proporciona una visión más detallada y completa del sistema inmunitario y su interacción con el entorno (353). El inmunoperfilado basado en tejidos es una herramienta crucial en la investigación oncológica translacional, ya que permite la visualización de características patológicas y fenotípicas en muestras de tejido tumoral. Estos ensayos proporcionan información detallada sobre la composición celular, la actividad funcional y la expresión de biomarcadores en el microambiente tumoral, lo que puede ayudar a comprender mejor la biología del cáncer y a identificar nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores predictivos (354, 355).

El GeoMx® "Digital Spatial Profiler" (DSP) (NanoString Technologies, Seattle Washington, USA) es una nueva plataforma de multiplexado de ARN y proteína, especialmente útil en muestras limitadas de tejido. Es una tecnología emergente que permite cuantificar la abundancia de proteínas o ARN en muestras biológicas mediante la asignación de oligos de indexación únicos a cada objetivo de interés. Mediante el uso de oligonucleótidos permite realizar el estudio de un mayor número

de biomarcadores en comparación con otras técnicas como la inmunofluorescencia multiplex (mIF) o la co-detección por indexación (CODEX). Una de las ventajas de GeoMx DSP reside en que consiste en una técnica no destructiva, lo que significa que los portaobjetos se pueden utilizar para otros estudios una vez finalizado el ensayo. Además, proporciona una visión profunda de la inmunología tumoral y la heterogeneidad de los tejidos, lo que la hace atractiva para muchos campos de trabajo en la oncología translacional y el descubrimiento de biomarcadores. Sin embargo, GeoMx DSP tiene algunas limitaciones, como la incapacidad de realizar un análisis unicelular completo y el análisis espacial de las células en el tejido. Esto puede limitar su capacidad para estudiar la expresión unicelular y la distribución espacial de las proteínas o ARN de interés en el tejido tumoral. A pesar de estas limitaciones, la DSP sigue siendo una herramienta poderosa para el estudio de la biología tumoral y el descubrimiento de biomarcadores en el contexto de la inmunología y la oncología (356).

El flujo de trabajo de la plataforma DSP incluye varios pasos clave para preparar, procesar y analizar las muestras de tejido (Fig. 1.18).

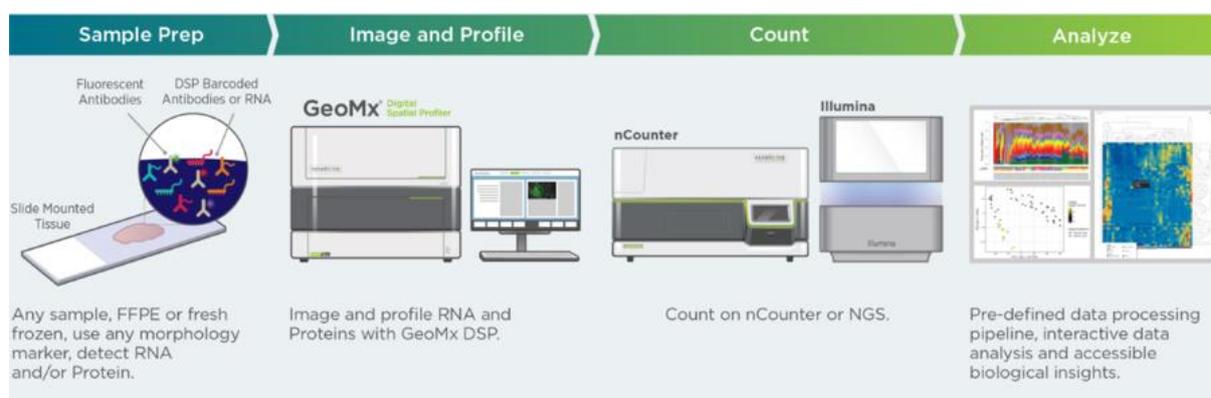


Figura 1.18: Procedimiento esquemático de la plataforma de transcriptómica espacial. Tomada de NanoString (357).

1.10.2.1 Preparación de tejidos

Esta técnica es compatible con tejidos congelados y fijados en formol e incluidos en parafina (FFPE). Para ambos tipos de muestras, deben obtenerse secciones de 5 μm de espesor siguiendo las especificaciones de las pautas de preparación de muestras de NanoString (manual GEOMX). Las secciones de tejido son desparafinadas y sometidas al proceso de recuperación de antígenos similar a la técnica de inmunohistoquímica estándar, usando la plataforma de tinción manual o automatizada. Posteriormente un cóctel de biomarcadores de inmunofluorescencia y sondas o anticuerpos vinculados a etiquetas de ADN fotoescindibles es aplicado a los tejidos. Seguidamente se aplican los marcadores de visualización (VM), se pueden utilizar hasta tres anticuerpos específicos o sondas de ARN conjugadas con fluoróforos y un marcador de ADN (SYTO13) (356, 358).

Después de la incubación los portaobjetos se cargan en el instrumento DSP, y son escaneados para producir una imagen digital que muestra el tejido con las características histológicas resaltadas por el fluorescente. Los ROIs (áreas de interés) de diferentes tamaños (hasta 660 * 785 μm) y formas (círculos, rectángulos, cuadrados y polígonos) se pueden seleccionar y colocar en diferentes áreas definidas por la expresión de biomarcadores, la ubicación espacial y/o las características morfológicas. Es decir, en áreas inmunoenriquecidas, se puede seleccionar el ROI según la expresión de CD45 en la muestra de tejido o según la expresión de S100B en el tumor (359).

Los ROIs se pueden segmentar utilizando los VM en más de un compartimento. Por ejemplo, estos compartimentos se pueden definir como células de melanoma vs. microambiente (basándose en la expresión de S100B/CD45), o en diferentes poblaciones leucocitarias dependiendo de los marcadores utilizados (353,354). Estos biomarcadores morfológicos son seleccionados histológicamente

dentro de los ROIs y permiten un análisis integrado de la expresión de proteínas o ARN con características patológicas.

1.10.2.2 Colección de Oligos

Después de seleccionar las regiones de interés (ROIs) y segmentar los compartimentos en las muestras de tejido, el siguiente paso implica la exposición de estas áreas a la luz ultravioleta (UV) utilizando un dispositivo de microespejo digital programable (DMD). Este proceso de exposición a la luz UV se realiza para escindir las etiquetas de ADN en una región específica. El DMD se utiliza para dirigir y controlar la exposición a la luz UV en las áreas seleccionadas de la muestra de tejido. Este dispositivo se autoconfigura para coincidir con el patrón exacto del espacio definido previamente en cada ROI de cada sección de tejido. En otras palabras, el DMD asegura que la luz UV se aplique con precisión a las áreas específicas de interés en las muestras de tejido, lo que permite la escisión controlada de las etiquetas de ADN en esas regiones específicas lo que es fundamental para la cuantificación precisa de los biomarcadores en las muestras de tejido mediante la plataforma DSP (357).

1.10.2.3 Hibridación

Después de que se haya realizado la recolección de oligos de indexación, se hibridan con códigos de barras ópticos fluorescentes o códigos GeoMx Hyb. Seguidamente, se cuentan digitalmente usando la fórmula de una sola molécula mediante el sistema de conteo nCounter o usando las NGS (Illumina) (NanoString, Seattle WA) (360).

1.10.2.4 Salida y Análisis de datos

El dispositivo GeoMx® DSP (NanoString) se utiliza para asignar los recuentos obtenidos a las diferentes áreas seleccionadas en las muestras de tejido. Este

dispositivo está equipado con un software de análisis que facilita varias etapas del proceso de análisis de datos, incluido el control de calidad (QC), la visualización, la normalización y el análisis de los datos obtenidos.

El control de calidad (QC) es el primer paso del análisis de datos y consiste en evaluar varios parámetros para garantizar la fiabilidad y la precisión de los resultados. Algunos de los parámetros que se evalúan durante el QC incluyen:

-Densidad de unión: Se evalúa la densidad de las señales de unión en las áreas seleccionadas de las muestras de tejido para garantizar que haya una cantidad adecuada de señales.

-Control de límite de detección: Se verifica la capacidad del dispositivo para detectar biomarcadores en diferentes niveles de expresión para garantizar la sensibilidad adecuada del ensayo.

-Normalización de control positivo: Se realiza la normalización de los datos utilizando controles positivos internos para corregir las variaciones experimentales y técnicas entre las muestras.

-Número mínimo de núcleos: Se establece un número mínimo de núcleos requeridos para la inclusión de un área en el análisis, lo que ayuda a garantizar la representatividad de los datos obtenidos.

-Área de superficie: Se evalúa la superficie de las áreas seleccionadas para garantizar que sean adecuadas para el análisis y evitar problemas como la superposición o la falta de tejido.

Una vez completado el control de calidad, se procede con la visualización, la normalización y el análisis de los datos utilizando el software proporcionado por el dispositivo GeoMx® DSP. El paso de normalización permite la normalización

propriadamente dicha de los datos usando los recuentos de sondas como "Housekeepers" o "IgGs" para la corrección de fondo. El método de normalización debe decidirse en función del tipo de muestra y el objetivo del proyecto.

La plataforma GeoMx® DSP (NanoString) proporciona diversas herramientas de visualización y análisis para interpretar los datos obtenidos. Algunas de las formas en que los datos pueden ser visualizados incluyen:

-Mapas de calor (*Heatmap*): Estos gráficos muestran la distribución de la expresión de los biomarcadores en diferentes regiones de interés de las muestras de tejido. Los colores se utilizan para representar los niveles de expresión, lo que permite identificar patrones de expresión y diferencias entre las muestras.

-Diagramas de caja: Los diagramas de caja muestran la distribución de los datos y resumen estadísticamente la variabilidad de la expresión de los biomarcadores en cada grupo de muestras. Esto proporciona información sobre la dispersión de los datos y los valores atípicos, así como las diferencias entre los grupos.

-Diagramas de correlación: Estos diagramas muestran las relaciones entre los biomarcadores mediante la representación de la correlación entre sus niveles de expresión en las muestras de tejido. Esto puede ayudar a identificar asociaciones y patrones de coexpresión entre diferentes biomarcadores.

-Gráficos de tipo volcán: los ejes representan el cambio en la expresión de los biomarcadores entre dos condiciones o grupos de muestras en el eje x (por ejemplo, \log_2 de la razón de expresión) y la significancia estadística de esos cambios en el eje y (por ejemplo, $-\log_{10}$ del valor de p).

Además de las herramientas de visualización, la plataforma GeoMx®DSP también proporciona funciones de prueba estadística para realizar análisis comparativos y determinar la significancia de las diferencias observadas entre las

muestras. Estas pruebas estadísticas pueden incluir pruebas de hipótesis paramétricas o no paramétricas, así como análisis de varianza (ANOVA) y pruebas de correlación, entre otras (357).

10.3 Perfilado de tumores con GeoMx®DSP

Actualmente, las características histológicas y de biomarcadores de fenotipo celular son consideraciones fundamentales para desarrollar estrategias para perfilado en tejido tumoral, incluido el perfilado usando DSP. Los tumores muestran varios niveles de características histológicas, inmunitarias y heterogeneidad molecular, como diversidad morfológica características de las células tumorales; arquitectura del tumor, cantidades e infiltración espacial de las células del microambiente inmune tumoral; composición, distribución, y densidad de la matriz extracelular; o genómico, heterogeneidad transcriptómica y proteómica (361–363). Se observa heterogeneidad no sólo entre los individuos, sino también en diferentes áreas del mismo tumor; además, la heterogeneidad puede ser dinámica y temporal, y las características del tumor cambian en diferentes etapas de las enfermedades, en diferentes momentos de tratamiento, o incluso influenciado por el sistema nervioso o por la diversidad del microbioma intestinal del paciente (364–366). Al utilizar DSP para el inmunoperfilado en tejido tumoral, es esencial considerar las características histológicas específicas de cada tipo de tumor y seleccionar cuidadosamente los biomarcadores apropiados que permitan una identificación precisa de los tumores y una caracterización detallada de su fenotipo y arquitectura. Esto garantizará resultados de perfilado robustos y significativos (367–369). De manera similar, al perfilar las células inmunitarias, las estrategias para la selección de ROIs pueden ser diferentes incluso entre tumores que comparten un tipo histológico similar, y el microambiente del sistema inmunitario puede variar de tumores que son inmunológicamente “fríos” a muy inflamados “calientes” con la presencia de agregados inmunes organizados en estructuras

linfoides terciarias (TLS). La distribución heterogénea del infiltrado inmune en los tumores es una característica importante que debe considerarse al diseñar estrategias de inmunoperfilado y análisis de tejidos tumorales. Algunos tumores pueden presentar una infiltración inmunitaria abundante en la periferia del tumor, mientras que el centro del tumor puede ser inmunológicamente "frío", es decir, tener una baja presencia de células inmunes. Este fenómeno se conoce como "tumor inmune excluido" (370, 371).

10.4 GeoMx[®]DSP y Melanoma

Como ya he comentado, el melanoma es una neoplasia producida a partir de la transformación maligna de melanocitos (372). Los melanomas son visualizados sobre portaobjetos de tejido FFPE teñidos mediante técnica inmunohistoquímica con anticuerpos frente a S100B (373), PMEL17 y HMB45 (anti-PMEL17/gp100) (374, 375). Los métodos digitales espaciales están siendo utilizados para este tipo de tumor con publicaciones que muestran la viabilidad de esta plataforma para descubrimiento de biomarcadores. Son escasos los trabajos empleando esta tecnología en melanomas, Vathiotis et al. utilizó una modalidad combinada de ARNm y de proteína con la plataforma DSP espacial para obtener información de la biología de datos relacionados con la regulación inmune y otros aspectos de la interacción tumor-estroma en muestras de melanoma tratadas con inmunoterapia. Utilizaron un TMA teñido con un panel frente a 44 proteínas y los siguientes marcadores de visualización para segmentar melanocitos (S100/HMB45+), linfocitos infiltrantes de tumores (CD45+) y macrófagos infiltrantes (CD68+). Para ARNm, realizaron la expresión génica de ARNm, se observó una correlación positiva entre los recuentos de DSP de proteína y ARNm para la mayoría de los tejidos y fue mayor al comparar el ARNm y proteínas del compartimento tumoral; aunque algunos tejidos no se correlacionaron, o se correlacionó inversamente (376). Otros investigadores como Toky et al. realizaron el perfilado espacial utilizando un cóctel 44-plex de anticuerpos para buscar la expresión de proteínas con el fin de predecir la respuesta a la inmunoterapia

en melanoma, utilizaron anticuerpos frente a S100/HMB45, CD45 y CD68, para identificar y segmentar el ROI en células tumorales (S100/HMB45+), leucocitos totales (CD45+) y macrófagos (CD68+) (248). Realizaron la evaluación de la concordancia con datos anotados obtenidos por fluorescencia cuantitativa automatizada (AQUA) para validar la precisión y la fiabilidad de la tecnología, encontrando una correlación de varios biomarcadores con SG y SSE, así como la respuesta a inmunoterapia; a su vez encontraron una alta concordancia entre los recuentos de DSP y los datos obtenidos de AQUA. Entre las principales limitaciones del ensayo DSP destacar la resolución limitada, lo que resultó en celdas faltantes para perfilar y la pérdida de células en un compartimento diferente (377). Otro estudio realizado por Cabrita et al. proporciona una visión importante sobre el papel de las células B y las estructuras linfoides en la respuesta antitumoral en melanomas metastásicos. El objetivo del estudio fue investigar el papel de las células B en las respuestas antitumorales en melanomas metastásicos, centrándose en la presencia de estructuras linfoides organizadas (TLS) en el microambiente tumoral. Utilizaron anticuerpos específicos contra CD3, CD20 y HMB45, junto con S100B, como VM para segmentar las ROI en células B, células T y células de melanoma, respectivamente. El análisis reveló que los tumores sin TLS exhibían un fenotipo disfuncional en las células T, lo que sugiere que las TLS desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de un microambiente inmunorreactivo. Esto indica una asociación entre la presencia de estructuras linfoides organizadas y una respuesta antitumoral más efectiva en melanomas metastásicos (378). En otro estudio similar, Helmink y colaboradores investigaron el efecto de la inmunoterapia neoadyuvante en el microambiente tumoral de muestras de melanoma resecables de alto riesgo, centrándose en la presencia de estructuras linfoides y su asociación con la respuesta de las células T. Utilizaron anticuerpos contra CD3, CD20 y HMB45, permitiendo la identificación y segmentación de células T, células B y células de melanoma en las muestras de tejido. Obtuvieron una mayor expresión de biomarcadores de activación de células T en las áreas tumorales asociadas con células TLS en comparación con las áreas no asociadas (379, 380).

Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis de trabajo

El tratamiento actual del melanoma no es eficaz en el cien por cien de los casos. La introducción de los inhibidores de puntos de control inmunológico (ICI) ha representado un avance significativo en el tratamiento del melanoma avanzado o metastásico. La combinación de anti-PD-1 y anti-CTLA4, con los fármacos nivolumab e ipilimumab, respectivamente, ha demostrado una tasa de respuesta del 60%, lo que indica una eficacia considerable en una proporción significativa de pacientes. A pesar de estos avances, la selección de pacientes que se beneficiarán de esta terapia sigue siendo un desafío. La falta de un método ampliamente aceptado para identificar a estos pacientes puede resultar en que algunos no se beneficien del tratamiento, mientras que otros pueden experimentar eventos adversos. En este contexto los biomarcadores pronósticos y de resistencia son especialmente importantes en el entorno adyuvante para ayudar a los médicos a decidir qué pacientes pueden evitar la terapia con ICI o cuales son subsidiarios de realizar la técnica de ganglio centinela.

Aunque existe un consenso general sobre el tropismo de las células madre mesenquimales (MSC) hacia los microambientes tumorales, su función en estos entornos es compleja y multifacética. Los estudios han proporcionado resultados

contradictorios en diferentes tipos de cáncer, lo que refleja la diversidad de interacciones entre las MSC y las células tumorales. Cada vez se encuentran más evidencia de que las MSC ejercen efectos estimuladores o inhibidores sobre el crecimiento y la invasión del tumor a través de la interacción directa o indirecta con las células tumorales en función de cómo sean inoculadas. Por lo tanto, las MSC pueden suprimir o promover el crecimiento y la invasión tumoral. Si sus propiedades se modifican adecuadamente mediante ingeniería genética con sustancias exógenas; genes anticancerígenos para la expresión/secreción de una sustancia terapéutica deseada o por la inducción o activación por pretratamiento con radioterapia a bajas dosis, las MSC podrían emplearse como una nueva herramienta para la terapia de tumores malignos.

La identificación de las alteraciones genéticas es en la actualidad fundamental para identificar el mecanismo patogénico del desarrollo del melanoma y la identificación de posibles biomarcadores con valor predictivo, diagnóstico o pronóstico. La utilización de una herramienta novedosa y potente como la plataforma GeoMx[®]DSP puede ayudar de forma más eficiente en la identificación de biomarcadores pronósticos.

Con estos antecedentes planteamos en la Tesis Doctoral las siguientes hipótesis:

Hipótesis cierta 1: Los tratamientos muestran efecto en el crecimiento, en el desarrollo de metástasis e inducen cambios en la expresión inmunohistoquímica y en posibles biomarcadores, así como en el transcriptoma en los melanomas xenoinjertados en ratones.

Hipótesis nula 1: Por el contrario la radioterapia y la aplicación de células madre no ejercen ningún papel beneficioso en el melanoma experimental ni induce cambios a nivel inmunohistoquímico, ni en el transcriptoma.

Hipótesis cierta 2: En los dos melanomas cutáneos humanos más frecuentes se pueden observar diferencias clínicas, inmunohistoquímicas y en el transcriptoma así como es posible encontrar diferencia en el perfil de expresión inmunohistoquímica y

perfil transcriptómico entre los melanomas que han producido infiltración en ganglios linfáticos en comparación con los que se encuentran confinados en la piel.

Hipótesis nula 2: No es posible detectar diferencias clínicas, inmunohistoquímicas ni en el transcriptoma en los dos melanomas cutáneos humanos más frecuentes. De igual modo no es posible encontrar diferencia en el perfil de expresión inmunohistoquímica y perfil transcriptómico entre los melanomas que han producido infiltración en ganglios linfáticos en comparación con los que se encuentran confinados en la piel.

2.2 Objetivos

En la presente Tesis Doctoral hemos planteado como objetivo general valorar el efecto que diferentes tratamientos inducen sobre un modelo experimental de melanomas xenoinjertados en ratones, identificando posibles biomarcadores y constatar los cambios en el transcriptoma y finalmente completar con un estudio clínico-patológico sobre biopsias de pacientes con melanomas cutáneos aplicando las novedosas técnicas de transcriptómica espacial.

Para ello hemos diseñados los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar un modelo de xenoinjerto de melanoma humano en ratones NOD/SCID gamma inmunocomprometidos.
2. Analizar la biodistribución en los tejidos de las células madre mesenquimales de cordón umbilical inoculadas por vía parenteral.
3. Identificar el efecto del tratamiento con Radioterapia y células madre mesenquimales de cordón umbilical y la terapia combinada sobre el modelo de xenoinjerto de melanoma.
4. Establecer las modificaciones en la expresión génica mediante transcriptómica espacial en las muestras de tejido fijadas e incluidas en parafina.
5. Identificar si IMP3 puede ser un candidato como biomarcador de mal pronóstico y su relación con el desarrollo de metástasis.
6. Identificar si EMP1 puede ser un candidato como biomarcador de mal pronóstico y su relación con el desarrollo de metástasis.
7. Estudiar el comportamiento de los melanomas cutáneos humanos más frecuentes en su vertiente clínico-patológica y verificar las diferencias en el transcriptoma tanto en las células tumorales como en el microambiente tumoral.
8. Identificar si el perfil transcriptómico difiere entre los melanomas cutáneos que muestran metástasis ganglionar frente a los que permanecen localizados.

CAPÍTULO 3

Material y Métodos

3.1 Modelo experimental in vitro

3.1.1 Células estromales mesenquimales (MSC) y líneas celulares de melanoma humano

Las células MSC fueron obtenidas de la gelatina de Wharton de cordón umbilical (UC-MSC) y caracterizadas según el procedimiento previamente descrito por Farias y cols. (74). Se cultivaron en medio de cultivo DMEM (1 g/L de glucosa) suplementado con 10% de suero bovino fetal, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de Penicilina/Estreptomicina, y 10 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).

Las células MSC transformadas fueron cedidas por el Dr. Francisco Martín Molina (Genyo, Granada) y se cultivaron en Advanced DMEM (4.5 g/L de glucosa) suplementado con 10 % de suero bovino fetal y 1% de Penicilina/Estreptomicina. La línea celular es la hMSCs4-HITs-T (tMSC) transducida con el vector lentiviral SEWP para conseguir un 99% expresión de eGFP. La línea 4-HITs-T (4H) es una línea de MSC humana, derivada de médula ósea y generada por el grupo de Funes y cols.

mediante pases consecutivos de la línea 4-HITs. Utilizaron el retrovirus (que codifica para la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT)), HPV-16 E6 y E7, antígeno T pequeño de SV40 (ST) y un alelo oncogénico de H-Ras (H-RasV12) para inducir la transformación (381).

Las líneas celulares de melanoma humano A375 y G361 fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (G361 ATCC® CRL-1424™) (A375 ATCC® CRL. 1619™) a través del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM suplementada con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor renovado cada 2-3 días e incubadas en una estufa termorregulada a 37°C y humidificada con 5% de CO₂. Todas las líneas celulares se testaron frente a la presencia de infección por micoplasma (280).

3.1.2 Irradiación experimental de MSC

Los cultivos de MSC en crecimiento exponencial al 70% de confluencia en medios de cultivo frescos se irradiaron a temperatura ambiente inmediatamente antes de su uso a una dosis de 2 Gy/minuto utilizando un irradiador de 137Cs. La radiación ionizante, aplicada por personal autorizado, se produjo mediante tubo de rayos X (XYLON, modelo Y, Tu-320 D03) en las instalaciones del CIBM de la Universidad de Granada.

3.2 Modelo experimental en ratones

3.2.1 Experimento crecimiento tumoral in vivo

Se inocularon un total de 64 ratones NOD/SCID gamma (Charles River, Lyon, Francia) de 7/9 semanas de edad y 21-24 g de peso con líneas celulares de melanoma humano A375 (n=32) y G361 (n=32).

Las líneas celulares de melanoma humano A375 y G361 se inocularon por vía subcutánea en pliegues cutáneos de las patas traseras de ratones gamma NOD/SCID (1×10^6 células en 0.1 mL de solución salina en la pata trasera izquierda). Los ratones fueron revisados regularmente (cada 2-3 días) con la medición de dos diámetros perpendiculares de los tumores para documentar el crecimiento del tumor. Los ratones se mantuvieron con condiciones de luz estables y acceso a agua y comida *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron tras la aprobación del Comité de Investigación Animal de la Universidad de Granada (CEEA 2014/357) y bajo la normativa de la Unión Europea y española sobre ética en la investigación animal (Directiva UE 63/2010 y RD español 53/2013) y siguiendo las pautas de ARRIVE.

Se establecieron cuatro grupos de ocho ratones por línea celular inoculada, que fueron tratados con radioterapia (grupo RT); terapia con células estromales mesenquimales (grupo MSC); terapia combinada RT+MSC (grupo RT+MSC); y sin tratamiento (grupo Control). Una vez que los tumores alcanzaron un tamaño aproximado de 60 mm³, fueron tratados, según su grupo, una vez por semana durante cuatro semanas.

● Grupos Control: Dos grupos (8 ratones en cada grupo) inoculados con las líneas celulares de melanoma A375 o G361 sin tratamiento.

● Grupos RT: Dos grupos (8 ratones en cada grupo) inoculados con las líneas celulares de melanoma A375 y G361 fueron anestesiados con hidrocloreuro de ketamina (Ketolar®, Sicmafarma) los tumores fueron tratados con una dosis de 2Gy/minuto.

La radiación ionizante, aplicada por personal autorizado, fue producida por el tubo de rayos X (YXLON, modelo Y, Tu-320 D03). Los tumores de ratón se colocaron directamente bajo un orificio de 10 mm de diámetro en una placa de acero de 8 mm de espesor. La placa de acero protegía el resto del cuerpo de cada ratón. La dosis de radiación a las áreas protegidas se midió a una distancia igual o superior a 10 mm de todo el centro y fue de 2.0 ± 0.4 mGy/min, como era de esperar según los cálculos

previos realizados de dosimetría. Esta tasa de dosis aseguró que la dosis corporal total recibida por los ratones durante la irradiación fuera inferior a 4.0 mGy. El tratamiento se repitió cada semana, durante cuatro semanas. Después de la última dosis, se dejó recuperar a los animales durante 3-4 días antes de finalizar el experimento.

● Grupos MSC: dos grupos (8 ratones en cada grupo) con tumores mayores de 60 mm³, inoculados con las líneas celulares de melanoma A375 y G361, se trataron mediante la administración intraperitoneal semanal repetida de $1 \cdot 10^6$ MSC durante 4 semanas consecutivas

● Grupos RT+MSC: dos grupos (8 ratones en cada grupo) inoculados con las líneas celulares de melanoma A375 y G361 se irradiaron cada semana como los grupos RT y se inocularon con MSC como el grupo de MSC descrito anteriormente (Fig. 3.1).

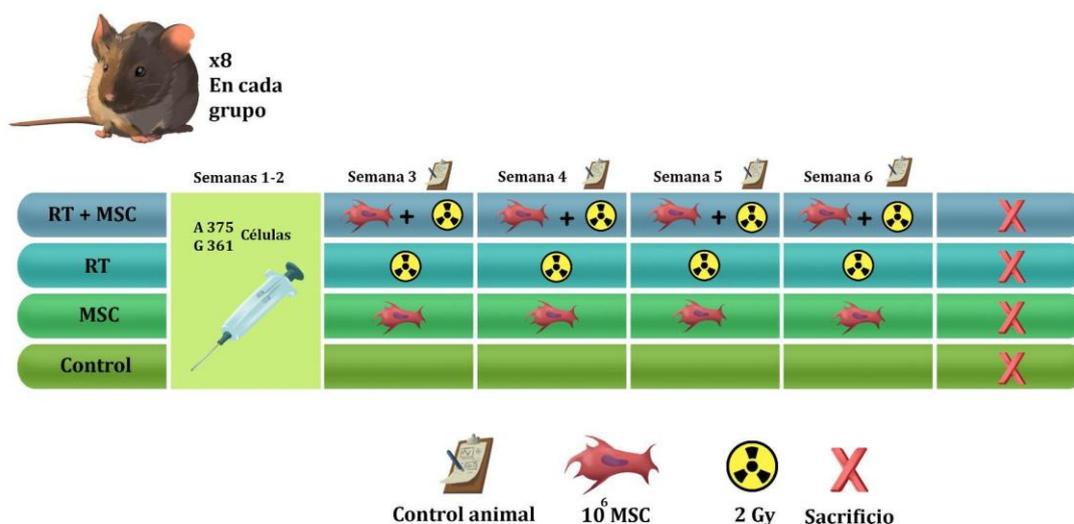


Figura 3.1: Representación esquemática del protocolo de grupos y tratamientos del experimento de inducción de melanomas xenoinjertados en ratones NOD/SCID gamma.

3.2.2 Experimento de toxicidad/inducción de neoplasias

Se utilizaron 28 ratones hembra NOD/SCID gamma (Charles River, Lyon, Francia) mantenidos en el servicio de experimentación animal (CIBM) del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada de 8 semanas de edad y 21g de peso, que fueron inoculados con 2×10^5 UC-MSc por la vena dorsal de la cola (IV). Se establecieron cuatro grupos de ocho ratones por tratamiento:

- Grupo Control: 4 Ratones hembra NOD/SCID gamma sin tratamiento.
- Grupo MSC: 8 Ratones hembra NOD/SCID gamma inoculados por vía IV por la cola con 2×10^5 de UC-MSc.
- Grupo MSC-IR: 8 Ratones hembra NOD/SCID gamma inoculados por vía IV por la cola con 2×10^5 de UC-MSc, previamente irradiadas.
- Grupo tMSC: 8 Ratones hembra NOD/SCID gamma inoculados por vía IV por la cola con 2×10^5 de tMSC. (Tabla 3.1) (Fig. 3.2).

Tabla 3.1: Experimento toxicidad/inducción de neoplasias.

Grupo	Número ratones	Tratamiento	Duración
Control	4 ratones NOD/SCID	Sin tratamiento	90 días
MSC	8 ratones NOD/SCID	Inoculación 2×10^5 UC-MSc	90 días
MSC-IR	8 ratones NOD/SCID	Inoculación 2×10^5 UC-MSc-IR	90 días
tMSC	8 ratones NOD/SCID	Inoculación 2×10^5 tMSC	90 días

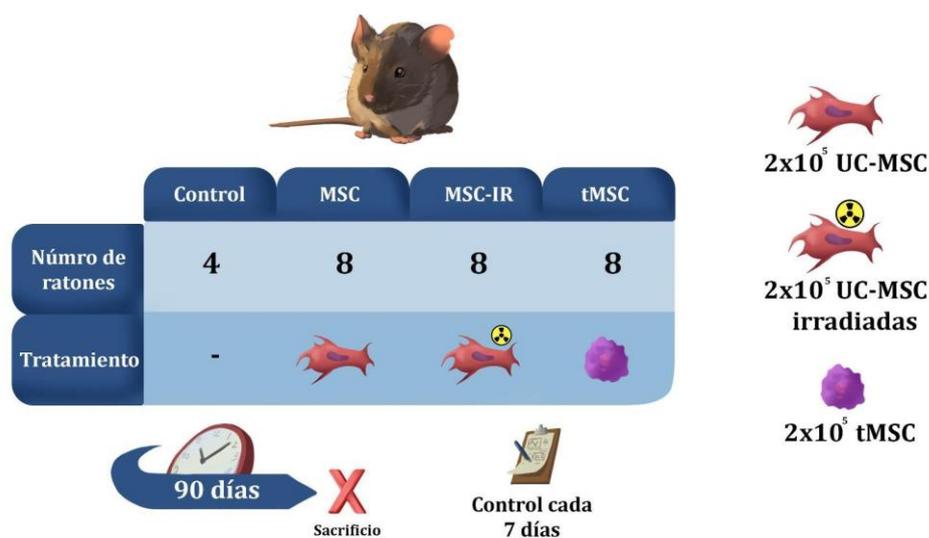


Figura 3.2: Representación esquemática del protocolo del experimento de toxicidad/inducción de neoplasias en ratones NOD/SCID gamma.

Las células se inocularon por vía IV por la cola de los ratones NOD/SCID gamma (2×10^5 células/50 μ L). Los ratones se controlaron regularmente cada 7 días mediante el peso. El tiempo de duración del experimento fue de 90 días. Los animales que durante el experimento sufrieron una pérdida ponderal superior a 10% de su peso inicial fueron sacrificados.

3.2.3 Experimento de biodistribución

Se utilizaron 30 ratones hembra NOD/SCID gamma (Charles River, Lyon, Francia) mantenidos en el servicio de experimentación animal (CIBM) del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada de 8 semanas de edad y 19g de peso, que fueron inoculados con 2×10^5 UC-MSC por la vena dorsal de la cola. La duración del tratamiento fue de 14 días, estableciéndose los siguientes grupos:

- Grupo Control: 6 ratones hembra NOD/SCID gamma sin tratamiento.
- Grupo 1 día: 6 ratones hembra NOD/SCID gamma inoculados por vía IV por la

cola con 2×10^5 de UC-MSc previamente irradiadas, fueron sacrificados a las 24h después de la inoculación.

- Grupo 2 días: 6 ratones hembra NOD/SCID gamma inoculados por vía IV por la cola con 2×10^5 de UC-MSc previamente irradiadas, fueron sacrificados a las 48h después de la inoculación.
- Grupo 6 días: 6 ratones hembra NOD/SCID gamma inoculados por vía IV por la cola con 2×10^5 UC-MSc previamente irradiadas, fueron sacrificados a los 6 días después de la inoculación.
- Grupo 14 días: 6 ratones hembra NOD/SCID gamma inoculados por vía IV por la cola con 2×10^5 UC-MSc previamente irradiadas, fueron sacrificados a los 14 días después de la inoculación (Tabla 3.2) (Fig. 3.3).

Tabla 3.2: Experimento Biodistribución.

Grupo	Número ratones	Tratamiento	Duración
Control	6 ratones NOD/SCID	Sin tratamiento	Tiempo 0
1 día	6 ratones NOD/SCID	Inoculación 2×10^5 UC-MSc-IR	24h
2 días	6 ratones NOD/SCID	Inoculación 2×10^5 UC-MSc-IR	48h
6 días	6 ratones NOD/SCID	Inoculación 2×10^5 UC-MSc-IR	6 días
14 días	6 ratones NOD/SCID	Inoculación 2×10^5 UC-MSc-IR	14 días

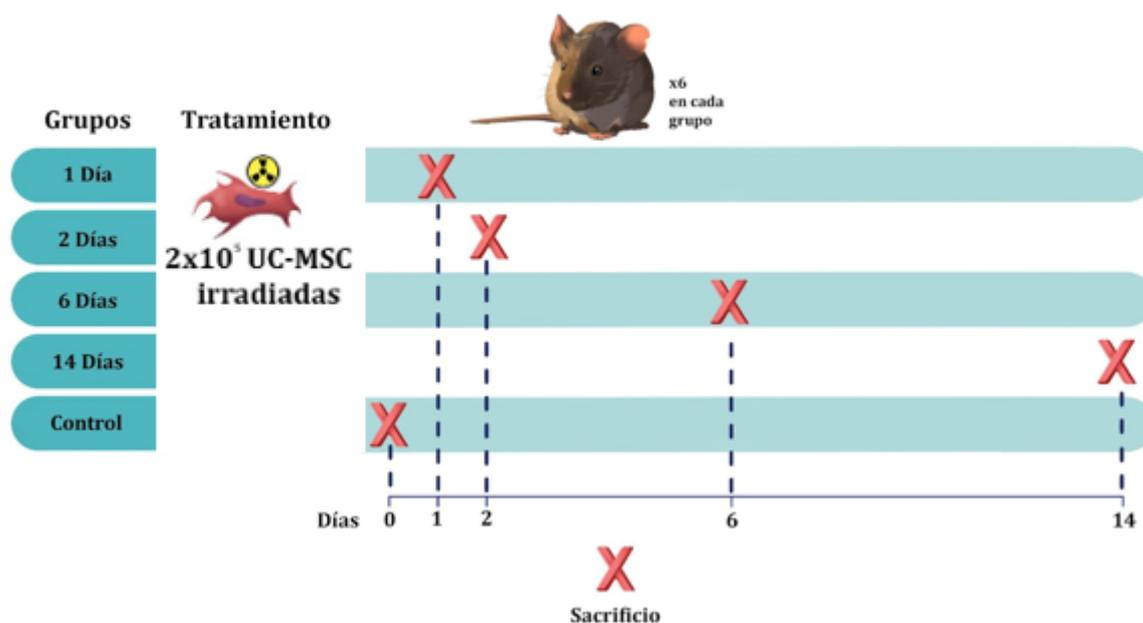


Figura 3.3: Representación esquemática del protocolo del experimento de biodistribución en ratones NOD/SCID gamma.

Estos estudios se realizaron en estricta conformidad con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Comité de Bioética de la Universidad de Granada, y la aprobación por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la UGR. Todo el manejo y sacrificio, fue realizado por personal autorizado (homologación B y C de la Junta de Andalucía) con eutanasia animal inyectable EUTANAX (Faro), cuando fue necesario y se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los ratones bajo supervisión de la responsable veterinaria del animalario del CIBM de la UGR. Según lo establecido en la actual normativa (EU directive 63/2010 y RD 53/2013).

3.2.4 Métodos Morfológicos

En el momento de la eutanasia de los ratones se evisceraron todos los órganos en bloque. La mitad de la muestra tumoral se fijó en formalina tamponada al 10% a temperatura ambiente durante 48 horas y posteriormente se embebió en parafina. Las secciones de 3 μm de espesor se desparafinizaron y rehidrataron en baños sucesivos de xilol, etanol al 100%, etanol al 95%, etanol 70 %, etanol 50 % y agua destilada. Se tiñeron con la técnica convencional de hematoxilina-eosina (H&E) para valorar las posibles lesiones histopatológicas en los diferentes órganos y la presencia de células MSC. En el grupo tMSC se valoró también la presencia de metástasis, su número y localización, además de parámetros como apoptosis, fenómenos de colestasis, displasia nuclear, infiltrado inflamatorio y fenómenos de reparación (mitosis y binucleación).

Para la valoración de la necrosis utilizamos una escala semicuantitativa de 0 a 3 en función de la extensión de la necrosis (ausente 0, menos del 5%; leve 1, 5-25%; moderada 2, 26-50%; o intensa 3, >50%) y para la apoptosis basada en el porcentaje de células con morfología nuclear característica de apoptosis fuera de las áreas necróticas (0, 0%; 1, 1-5%; 2, 6-25%; 3, >25%). Las imágenes mitóticas se evaluaron como número por 10 campos de gran aumento (40x). El volumen de los tumores post-fijación se calculó al final del experimento y se expresó como el porcentaje de reducción de volumen, mediante la fórmula:

$$V = \frac{\textit{radio largo} \times \textit{radio corto}^2}{2}$$

3.2.4.1 Micromatrices de Tejido (TMA)

Una vez revisadas y clasificadas todas las muestras incluidas en el estudio, se seleccionó un área representativa sin necrosis de la preparación histológica del tumor

primario xenoinjertado y metástasis (se descartaron las micrometástasis [menos de 10 células] del estudio). En el área seleccionada del portaobjetos con muestras de tejido teñidas con H&E, se dibujó un círculo con marcador indeleble, emparejando esta área con la obtenida con una aguja de 3 mm en el proceso de creación de TMA utilizando el microarreglo Tissue Arrayer 2 (Beecher Instruments©, Silver Spring, MD, EE. UU.). Una vez confeccionado el bloque se introdujo 30 minutos en una estufa a 37°C para conseguir una correcta encastración del tejido con la parafina. Se crearon un total de 9 bloques para las muestras de tumores procedentes de los 3 experimentos y 2 bloques más, uno para muestras clínicas de pacientes con Melanoma Nodular (MN) y Melanoma de Extensión Superficial (MES) y otro para las dos líneas de melanoma xenoinjertadas con sus respectivos tratamientos para su estudio en la plataforma de transcriptómica espacial GeoMx®DSP. Posteriormente se realizaron cortes a 3 micras para la secciones teñidas con H&E, así como para cada una de las técnicas inmunohistoquímicas (Fig. 3.4).

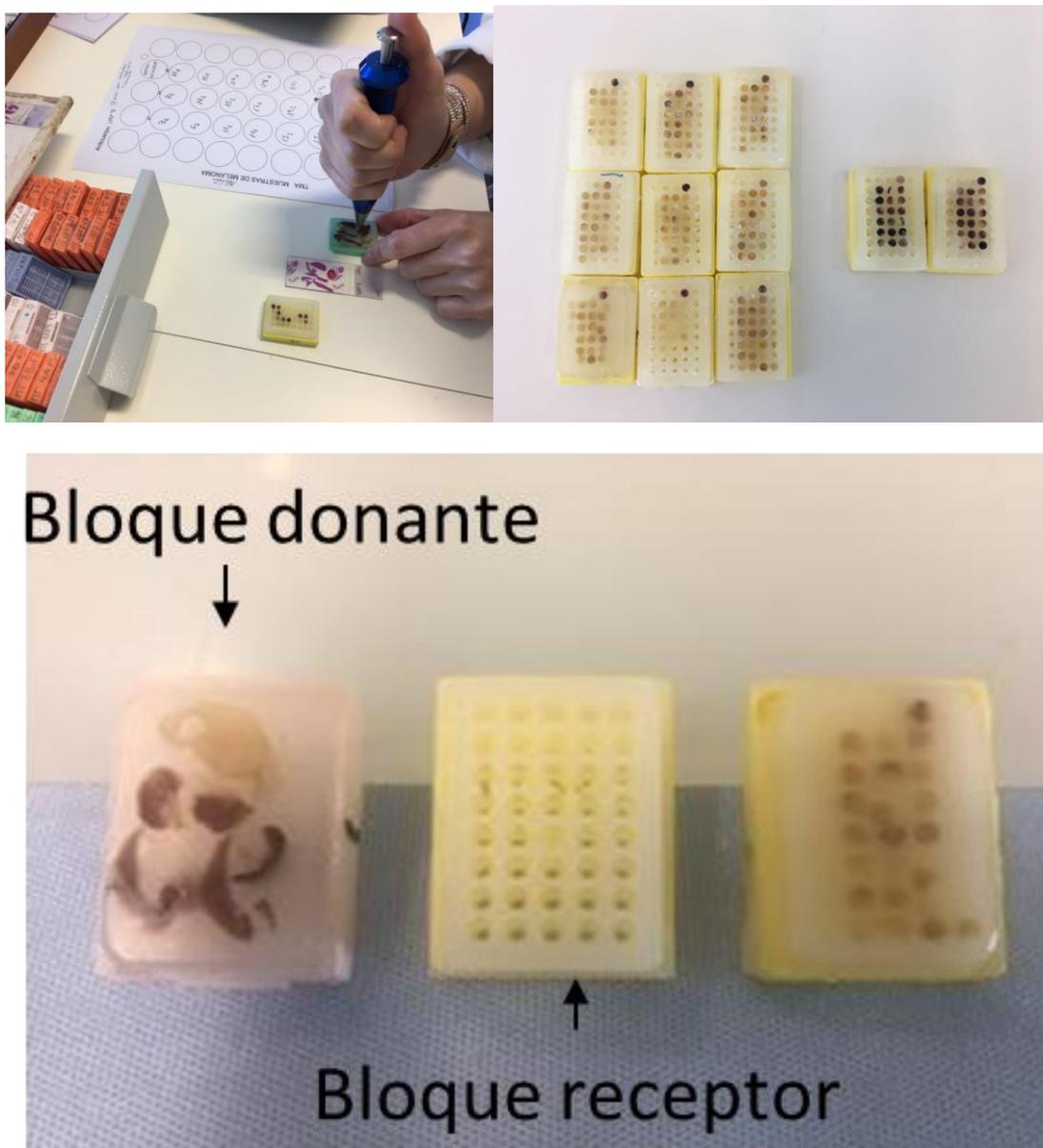


Figura 3.4: Confección de los bloques TMA.

3.2.5 Procedimiento de inmunohistoquímica para muestras de TMA embebidas en parafina

Las muestras de TMA fueron desparafinadas, hidratadas y posteriormente desenmascarados los antígenos mediante tampón EDTA 1mM pH 8.0 (Vitro-Master Diagnóstica, Granada, España) en el módulo PT. Para cada anticuerpo las

inmuntinciones se realizaron simultáneamente en un inmuntoteñidor automático Autostainer 480S (Thermo Fisher Scientific Inc) utilizando la técnica de micropolímero (anti-ratón+anti-conejo) conjugado con peroxidasa y revelado con diaminobencidina (Master Polymer, Vitro-Master Diagnóstica) con los anticuerpos detallados en la tabla siguiente (Tabla 3.3).

Tabla 3.3: Procedimiento de inmunohistoquímica para muestras incluidas en parafina.

Anticuerpo	Clon	Origen	Concentración	Casa comercial
IMP3	EP286	Monoclonal	Prediluido	Vitro-Master Diagnóstica
E-Cadherina	BS38	Monoclonal	Prediluido	Vitro-Master Diagnóstica
N-Cadherina	FP90	Monoclonal	Prediluido	Vitro-Master Diagnóstica
PARP-1	A6.4.12	Monoclonal	Prediluido	Vitro-Master Diagnóstica
HIF-1α	-	Policlonal	1:100	Santa Cruz
Ki-67	SP6	Monoclonal	Prediluido	Vitro-Master Diagnóstica
Vimentina	V9	Monoclonal	Prediluido	Vitro-Master Diagnóstica
S100	PS100	Monoclonal	Prediluido	Vitro-Master Diagnóstica
Anti-Mitocondria	M2	Monoclonal	Prediluido	Vitro-Master Diagnóstica
CD45	2B11&PD7/26	Monoclonal	Prediluido	Vitro-Master Diagnóstica
CD3	EP41	Monoclonal	Prediluido	Vitro-Master Diagnóstica
CD68	KP-1	Monoclonal	Prediluido	Vitro-Master Diagnóstica
CD20	L26	Monoclonal	Prediluido	Vitro-Master Diagnóstica
CD56	123C3	Monoclonal	Prediluido	Vitro-Master Diagnóstica
CD45	-	Policlonal	1:500	Abcam
EML1	-	Policlonal	1:100	Invitrogen

PD-1	NAT105	Monoclonal	1:50	Vitro-Master Diagnóstica
PDL-1	CAL10	Monoclonal	1:50	Vitro-Master Diagnóstica

3.2.5.1 Evaluación de la expresión de marcadores por inmunohistoquímica

Evaluamos la tinción inmunohistoquímica de los anticuerpos de las siguientes dos formas (en cada caso, se evaluaron un mínimo de 500 células tumorales).

3.2.5.1.1 Semicuantitativamente

Se consideró todo el disco en estudio. La evaluación se realizó a doble ciego, dos investigadores estudiaron todos los casos mediante examen microscópico (BH2, Olympus Optical Company, Ltd. Tokio, Japón), contrastando y reevaluando los resultados con discrepancias.

Los criterios evaluados fueron intensidad en una escala de 0 a 3 para medir la expresión de células tumorales (ausente 0, leve 1, moderada 2, intensa 3) y extensión en una escala de 0 a 3 para medir el nivel de inmunotinción de las células (0, <5%; 1, 5-25%; 2, 26-50%; 3, >50%).

Los resultados inmunohistoquímicos fueron valorados semicuantitativamente como presencia o ausencia de positividad para identificar células tMSC y UC-MSC y para el resto de variables en una escala de 0 a 3.

3.2.5.1.2 Cuantitativamente

Establecimos el número de células positivas para los diferentes anticuerpos testados según la fórmula:

$$N^{\circ} \text{ células/mm}^2 = \frac{N^{\circ} \text{ células positivas}}{N^{\circ} \text{ campos estudiados}} / 0.062$$

(0.062 = valor de corrección para aumento 40x). Para ello, utilizamos una escala milimétrica (Eyepiece, Olympus) dispuesta en el ocular de un microscopio (BH2, Olympus) y estudiamos aleatoriamente 5 campos del tumor con el objetivo 40x.

3.2.6 Métodos Moleculares

3.2.6.1 Desarrollo y cuantificación del ensayo de qPCR para detectar secuencias humanas de repetición Alu

La qPCR se utilizó para detectar presencia y para establecer el patrón de distribución de las células MSC en los tejidos de los ratones NOD/SCID gamma. Los tejidos obtenidos se mantuvieron congelados a -80°C hasta que se pasó a aislar el ADN genómico total de distintos órganos de ratón (cerebro, corazón, hígado, pulmón, riñones y bazo) usando el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN), mediante QiaCube (QIAGEN). La qPCR se llevó a cabo utilizando el kit SYBR Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus), Bulk (Takara) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Cada muestra se procesó por duplicado. Se utilizó el termociclador i-Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para el ensayo. Los ciclos de la qPCR consistieron en: un primer ciclo de una repetición de 95°C de 4 min, el segundo ciclo estaba formado por 40 ciclos compuestos por un primer paso de 94°C, un segundo de 60°C y un último de 72°C, durante 30s cada uno; continuando con un tercer ciclo de 95°C de un solo paso de 30s y otro de un único paso de 55°C de 1 min. Los *primers* fueron extraídos del artículo de Campbell y cols. (382) y se presentan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4: Parejas de cebadores validados previamente por Campbell y cols. y utilizados para la detección de ADN humano en muestras de tejidos de ratones

NSG en los estudios de biodistribución y tumorigénesis.

Marcador	Refseq	Sentido	Secuencia
Actb	Mm00607939_s1	Sentido	ATGTCGTCCAGTTGGTAAC
Actb	Mm00607939_s1	Anti-sentido	ATCCGATGCCGGTGCTAAG
Alu	YB8-ALU-S68	Sentido	GTCAGGAGATCGAGACCATCCT
Alu	YB8-ALU-S68	Anti-sentido	AGTGGCGCAATCTCGGC

La cuantificación de la expresión de las secuencias Alu se normalizó con referencia a la cantidad de microgramos cargados para cada muestra. La qPCR se realizó en un volumen de 20 μ L, que contenía 18 μ L de SYBR Premix Ex Taq, junto los primers de Alu y Actb (como control endógeno) y 2 μ L de muestra en cada pocillo.

Para evitar la contaminación por restos de ADN humano, se utilizó material estéril y libre de ADNsas así como Nuclease free water (Promega, REF: P119E), además de las buenas prácticas de laboratorio y una atención escrupulosa a la técnica aséptica. Las mezclas de reacción de qPCR se realizaron en una cabina de flujo específica para evitar la contaminación aérea. La cabina estaba equipada con una fuente de luz ultravioleta que se encendía antes y después de la preparación de los reactivos para minimizar la contaminación durante el proceso de la qPCR.

3.2.6.2 Estudio de la expresión de mARNs

Se estudió la expresión de mARNs de TRAIL, DKK3 y ANXA1 tras la irradiación de las UC-MSK a 2 Gy. Las células fueron lisadas y homogenizadas con TRIzol® Reagent (Invitrogen, 15596018) sin irradiar y a las 0.5, 1, 2, 4, 6, 12, 24 y 48 horas tras irradiación y se conservaron a -80°C, como mínimo 24 horas antes de la extracción de ARN. La extracción de ARN de las muestras recogidas se realizó en columnas con el kit Pure Link® ARN mini Kit (Life Technologies™, 12183018A), durante la extracción se utilizó un tratamiento con Pure-Link® ADNse Set

(TechnologiesTM, 12185010) para eliminar la presencia de ADN genómico en las muestras, se siguió todas las instrucciones recomendadas por el fabricante. El ARN extraído de las muestras se cuantificó mediante espectrofotometría utilizando un NanoDrop (Thermo Scientific). Se trabajó solo con las muestras cuyos ratios 260/230 y 260/280 eran superiores a 1.80. Para comprobar la integridad del ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE durante 30 min a 100V. Posteriormente se preparó cADN a partir de 1 µg de ARN mediante el kit iScriptTM cADN Synthesis (Bio-Rad 1708891), siempre siguiendo las recomendaciones del fabricante. El cADN obtenido se utilizó para estudiar por qPCR la expresión de: Trail, ANXA1 y DKK3. Como control interno se utilizó el gen RPL0 que codifica para una de las proteínas ribosomales de la subunidad 60s. En la siguiente tabla se encuentran las secuencias de primers y los tamaños de los amplicones que producían estos *primers* específicos (Tabla 3.5).

Tabla 3.5: Secuencia de los *primers* utilizados para el estudio de los genes de interés.

Marcador	mARN Refseq	Sentido	Secuencia	Tamaño
RPLP0	NM_001002.3	FW	CAGATTGGCTACCCAACTGTT	69 pb
RPLP0	NM_001002.3	REV	GGCCAGGACTCGTTTGTACC	69 pb
TNFSF10	NM_003810.3	FW	TAGCAGCTCACATAACTGGGAC	74 pb
TNFSF10	NM_003810.3	REV	AGCCTTTTCATTCTTGGAGTTTG	74 pb
DKK3	NM_013253.4	FW	TCATCACCTGGGAGCTAGAG	180 pb
DKK3	NM_013253.4	REV	CAACTTCATACTCATCGGGG	180 pb

La qPCR se llevó a cabo utilizando el kit iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 1708882) según las especificaciones del fabricante, cada muestra se procesó por triplicado. Se utilizó el termociclador i-Cycler de Bio-Rad para el ensayo. Los ciclos de

la PCR consistían: un primer ciclo de una repetición de 95°C de 2 min, el segundo ciclo programado para 40 ciclos compuestos por un primer paso de 94°C, un segundo de 60°C y un último de 72°C durante 30 s cada uno, al final del último paso se hacía la recogida de datos y el análisis a tiempo real. Continuaba un tercer ciclo de 95°C de un solo paso de 30 s y otro de un único paso de 55°C de 1 min. La cuantificación relativa de la expresión del gen de interés se hizo con respecto a la expresión del gen utilizado como control interno, mediante el análisis de los datos por el método 2^{-CT}(Livak & Schmittgen, 2001) (383).

3.2.6.3 Evaluación de la expresión de IMP3 por Western Blotting

Se homogeneizó tejido tumoral de xenoinjerto fresco del control y ratones tratados en tampón de lisis RIPA (Sigma-Aldrich) y cóctel inhibidor de proteasa (Sigma Aldrich). Se cuantificaron las proteínas utilizando el método BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich). Posteriormente se separaron los extractos de proteínas (30 µg/carril) en geles de poliacrilamida con SDS al 10% y fueron transferidos a membranas de difluoruro de polivinilideno (Millipore) usando un sistema semiseco. Se procedió a bloquear las membranas con PBS-Tween 0.1% y leche grasa 0.5% por 1 hora a temperatura ambiente para después incubarlas toda la noche a 4°C con anticuerpo primario IMP3 a dilución 1/500 (Vitro-Master Diagnóstica). Posteriormente, se dejaron las membranas durante una hora a temperatura ambiente con anticuerpo GAPDH anti-ratón de conejo a dilución 1/6000 (Invitrogen). La inmunodetección de los anticuerpos se realizó incubándolos con anticuerpo cabra anti-conejo IRDye 680RD a 1/10000, durante 1 hora a 4°C (Li-Cor Biosciences) y fueron desarrollados con el sistema de detección de quimioluminiscencia mejorado Odyssey (Li-cor). La representación de la expresión IMP3 se normalizó con el gen GAPDH como control interno.

3.3 Estudio clínico retrospectivo en melanomas cutáneos

Realizamos un estudio retrospectivo que incluyó 114 biopsias histológicas de pacientes diagnosticados de Melanoma de Extensión Superficial cutáneo (n=104) o Melanoma Nodular (n=10) con al menos cinco años de seguimiento. La edad media de los pacientes fue de 61.73 ± 14.13 años. El espesor medio de Breslow fue de $2.52\text{mm} \pm 1.98\text{mm}$. El 93% de los casos fueron niveles de Clark 3 ó 4. No se observaron metástasis en los ganglios linfáticos en el 71.1% (n=81) de los casos (p=N0), se observaron metástasis ganglionares en el otro 28.9% (n=33) (p≠N0).

El estudio clínico retrospectivo fue aprobado por la Comisión Provincial de Ética en Investigación. Comité de Granada (CEIc) a través del Comité Biomédico de Andalucía. Portal de Ética en Investigación (PEIBA) (ref#.0562-N-19). Se aprobó la exención del consentimiento informado escrito por CEIc por tratarse de un estudio retrospectivo sobre biopsias. La confidencialidad del material de estudio también se aseguró de acuerdo con Ley Orgánica 15/2018, de 5 de diciembre, de Protección de los datos de las personas, garantizando la anonimización de los datos.

3.4 Transcriptómica espacial y Next Generation Sequencing

3.4.1 GeoMx[®]DSP

La plataforma GeoMx[®]DSP (NanoString) cuantifica la abundancia de ARN contando oligonucleótidos de indexación únicos asignados a cada gen de interés. Esos oligonucleótidos están unidos covalentemente a sondas de hibridación de ARNm con un conector fotoescindible por luz ultravioleta (16).

3.4.1.1 Preparación de la muestra

Primero, se realizaron las secciones de los TMA de los tejidos FFPE de pacientes con melanoma de extensión superficial (MES) y pacientes con melanoma

nodular (MN) y los TMA de los ratones con xenotumor de ambas líneas celulares de melanoma A375 y G361, todas las secciones con un espesor de 5 μm .

Las secciones se montaron en portaobjetos tratados para inmunohistoquímica (Bond Plus; Leica Biosystems, Richmond, VA, USA.) con un máximo de 76 muestras de tejidos individuales por portaobjeto diseñado en un bloque TMA de FFPE. Después de montarlos se secaron en estufa a 37°C durante 24h. Unos se almacenaron a 4°C, mientras que otros se desparafinaron y se usaron para tinción con hematoxilina-eosina (H&E) para obtener imágenes de microscopía posterior.

Los portaobjetos FFPE almacenados a 4°C se metieron en estufa durante una hora a 60°C antes de ser tratados con CitroSolv (Fisher 22-143-975), etanol 100%, etanol 95% y PBS en baños de 5 minutos cada uno. Seguidamente fueron tratados con Tris-EDTA pH 9.0 para exponer las dianas de ARN. Posteriormente se realizó la digestión con proteinasa K para eliminar las proteínas unidas al ARN y exponer mejor el tejido a las sondas de hibridación. Para preservar la integridad del tejido, se realizó una breve postfijación en NBF al 10% durante 5 min. La fijación se detuvo mediante incubación en Glicina 0.1 M, Tris 0.1 M, dos veces durante 5 minutos cada una, seguido de 5 minutos de lavado en buffer PBS, después de lo cual se aplicaron las sondas inmediatamente según el protocolo de ensayo (360) (Fig. 3.5).

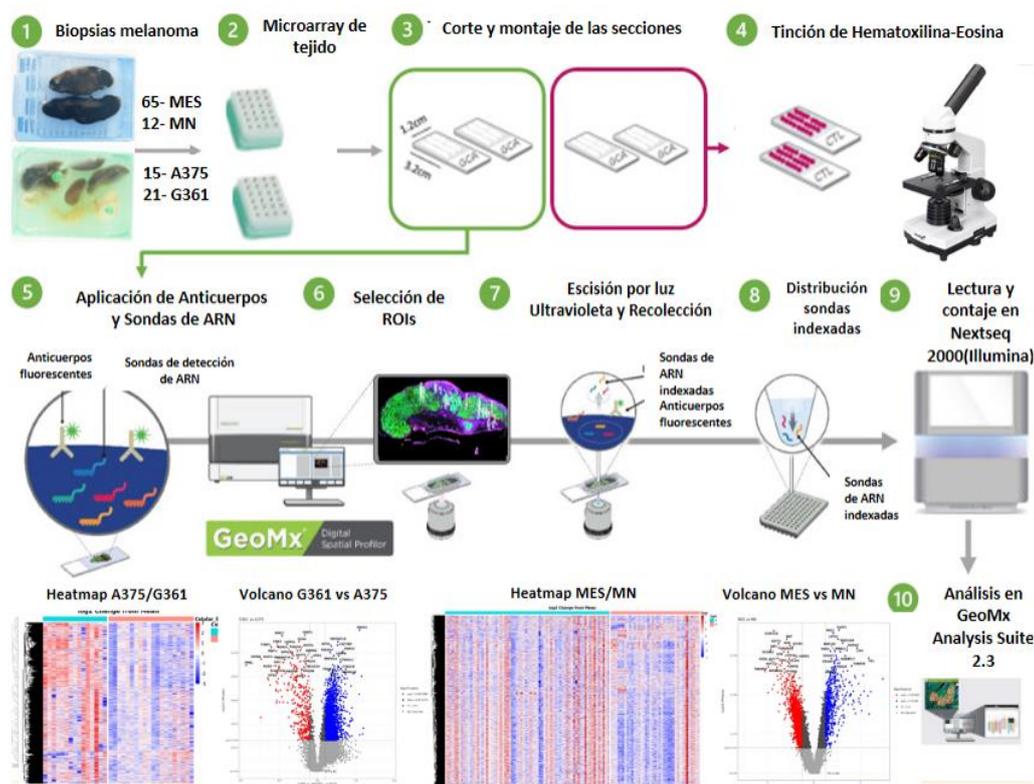


Figura 3.5: Esquema protocolo GeoMx DSP(Nanostring).

3.4.1.2 Perfilador espacial digital

Se seleccionó el panel comercial NanoString Human Whole Transcriptome Atlas (GeoMx WTA) (18.000 genes codificadores de proteínas). El reactivo de sonda WTA se diluyó en tampón R hasta una concentración final de sonda de 4 nM y se agregó a cada portaobjetos 200µL, posteriormente cada portaobjetos se cubrió con una cubierta Hybrislip (Grace Bio-Labs) y se incubó durante 15 horas a 37°C en un HybEZ System II, cámara hibridación con tampón 2×SSC (citrato salino-sódico). Al día siguiente, se realizaron 2 lavados en Stringent Wash (4×SSC y formamida 100%) a 37°C durante 25 minutos cada uno, seguido de 2 lavados en 2×SSC durante 2 minutos a TA, para eliminar los residuos de las sondas que no se hibridaron y así poder reducir el background.

Después se cubrieron los tejidos con la solución de los marcadores morfológicos con 200µL cada portaobjetos (Tabla 3.6), conteniendo los marcadores

morfológicos y buffer W, se dejó incubar 1 hora a TA en cámara húmeda, seguidamente se realizaron 2 lavados en 2xSSC a TA, de 5 min cada uno.

Tabla 3.6: Descripción general de los marcadores de visualización utilizados para distinguir entre el compartimento de células tumorales y las de células inmunitarias.

Marcador morfológico	Canal	Compartimento celular
Syto 13 (Azul)	FITC/525nm	ADN (núcleos)
S100B (Verde)	Cy3/568nm	Tumor
CD45 (Magenta)	Texas Red/ 615nm	Células inmunes

Seguidamente a la incubación, los portaobjetos se cargaron en el perfilador espacial digital GeoMx[®]DSP (Fig. 3.6), donde se escanearon los tejidos y se generaron imágenes digitales para la selección de ROIs. Cada disco del TMA correspondió a un ROI. Se seleccionaron utilizando la herramienta círculo. Las ROIs tenían un tamaño de 450 μm de diámetro y un área de 159043.1 μm^2 . Seguidamente se segmentaron en AOI (áreas de interés) según la inmunotinción para marcador de infiltrado inflamatorio CD45 y el marcador de melanoma S100B. Posteriormente, los ROIs se iluminaron con luz ultravioleta, y las etiquetas se liberaron en la capa acuosa justo encima del portaobjetos, donde las etiquetas desprendidas de los oligos se aspiraron a través de un tubo microcapilar y se almacenaron en un solo pocillo de una placa de 96 pocillos (Fig. 3.7). Este proceso se repitió para cada ROI (357).

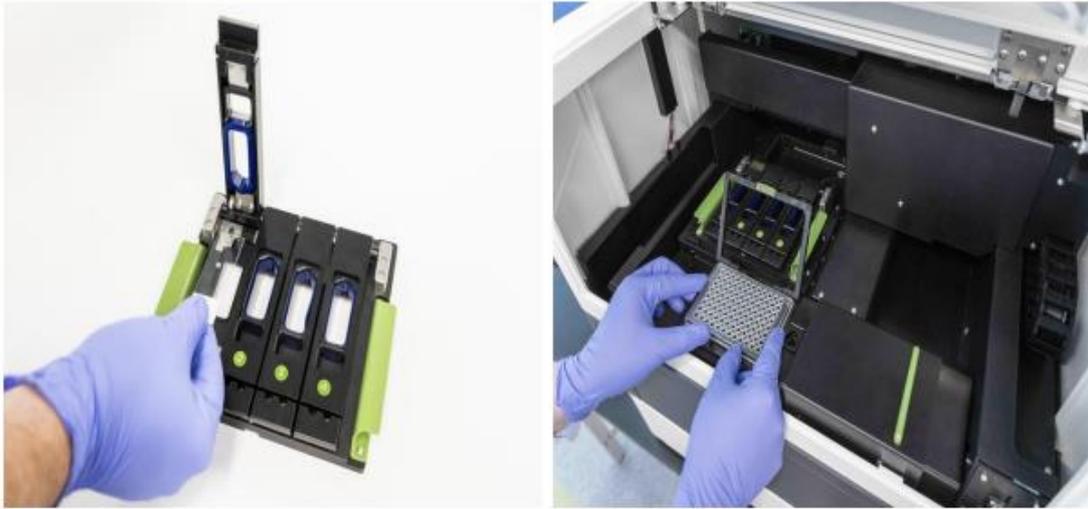


Figura 3.6: GeoMx® DSP (Nanostring). a) Los portaobjetos se cargan en una ranura y se cierran herméticamente para evitar fugas y minimizar la cantidad de reactivo usado; b) Una placa de 96 pocillos se utiliza para coleccionar los oligos etiquetados de cada ROI.

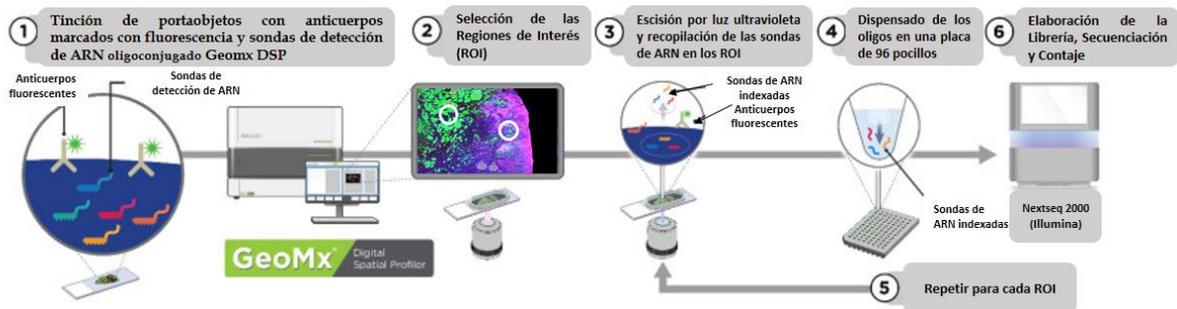


Figura 3.7: Principio experimental del perfilado espacial en GeoMx®; 1) Aplicación del cóctel de biomarcadores de inmunofluorescencia y sondas o anticuerpos vinculados a etiquetas de ADN fotoescindibles 2) Selección de región de interés (ROI) se realiza en base a la señal fluorescente en el instrumento GeoMx® 3) Después de la selección de ROI, la luz induce la fotoescisión de oligos para contar sondas. 4) Los oligos se recogen y dispensan en una placa de 96 pocillos 5) La hibridación y la preparación de la muestra se realizan en la placa, y los recuentos finales se obtienen en Nextseq 2000. Adaptado de Nanostring (357).

Después de la recolección de los aspirados que contenían las etiquetas de secuenciación, los pocillos se secaron a 65° durante 1 hora en un bloque calefactor.

Finalmente se resuspendió en 10 μL de agua libre de nucleasas (Ambion), para minimizar las diferencias debidas a la evaporación ambiental.

3.4.1.3 Preparación y secuenciación de la biblioteca

Los oligos derivados de los ROIs tenían cada uno un índice dual único utilizando el sistema i5 x i7 (Illumina, San Diego, CA, USA). Se resuspendió una alícuota de 4 μl de cada aspirado de ROI que contenía los oligos fotoescindidos, seguidamente se amplificó en una reacción de PCR que contenía cebadores i5 e i7 1 μM y 1 \times NGS PCR Master Mix. La digestión UDG se realizó a 37°C durante 30 min, y luego se desactivó a 50°C antes de la desnaturalización a 95°C durante 3 minutos y 18 ciclos de amplificación: 95°C durante 15 segundos, 65°C durante 1 minuto, 68°C durante 30 segundos. El paso de extensión final se realizó a 68°C durante 5 minutos. La reacción de PCR se purificó con perlas AMPure XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) a 1.2 veces el volumen de cada tubo. La calidad de la biblioteca se analizó en la estación LabChip GX2 y se cuantificó en el fluorómetro QubitTM3 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) que dio como resultado un pico del amplicón de 150 pb y una concentración de 17.5 nM. Teniendo un total de área de $2.7 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ escogimos una flow cell para Nextseq 2000 (Illumina, San Diego, CA, USA) P1 300 que nos da una capacidad de 2×10^7 de lecturas (Fig. 3.8). Cargamos la flow cell a una concentración de 400 pM, con un 1% de PhiX.

Type	Assay	Sequencing Depth Calculation (number of read pairs)
RNA	Whole Transcriptome Atlas (WTA)	Total collection area (μm^2) x 100

Figura 3.8: Profundidad de secuenciación recomendada para los diferentes ensayos de GeoMx NGS (360).

Los recuentos se procesaron en la pipeline GeoMx NGS v.2.1 (NanoString), donde se convirtieron los archivos FASQ (*format for next generation sequencing sequences*) en archivos de conversión de recuento digital (DCC) (Fig. 3.9).

Los recuentos se procesaron en GeoMx[®]DSP Analysis Suite de NanoString, donde los archivos Fastq se convirtieron a archivos de conversión de recuento digital (DCC). Realizamos el control de calidad (QC) de las sondas biológicas siguiendo las pautas de normalización del Whole Transcriptome Atlas (WTA) de NanoString. El control de calidad de AOI se realizó para señalar los AOIs de bajo rendimiento utilizando las siguientes configuraciones: umbral de lecturas sin procesar <1000 lecturas, porcentaje de lecturas alineadas <80%, saturación de secuenciación <50%, núcleos mínimos <100 y superficie mínima de 600 μm^2 . El control de calidad de las sondas se realizó con la configuración predeterminada, excluyendo las sondas del cálculo del recuento en todos los segmentos con la condición siguiente: (sonda geomeadia en todos los segmentos)/(sonda geomeadia dentro del gen) ≤ 0.1 y la prueba de valores atípicos de Grubbs en $\geq 20\%$ de los segmentos. Si una sonda no supera la prueba de valores atípicos de Grubbs en un segmento específico, la sonda se excluyó del cálculo del recuento de objetivos en ese segmento. El límite de cuantificación (LOQ) se calculó utilizando dos veces DE la geomeadia de las sondas negativas.

$$LOQ_i = \text{geomean}(\text{NegProbe}_i) * \text{geoSD}(\text{NegProbe}_i)^2$$

Elegimos la normalización por *housekeepers*, este método utiliza objetivos de referencia endógenos para ajustar las diferencias en la abundancia o calidad de los transcritos en la muestra. Hay cuatro transcripciones de referencia (UBB, OAZ1, SDHA y RAB7A) en paneles de ARN (384, 385) (Fig. 3.10).

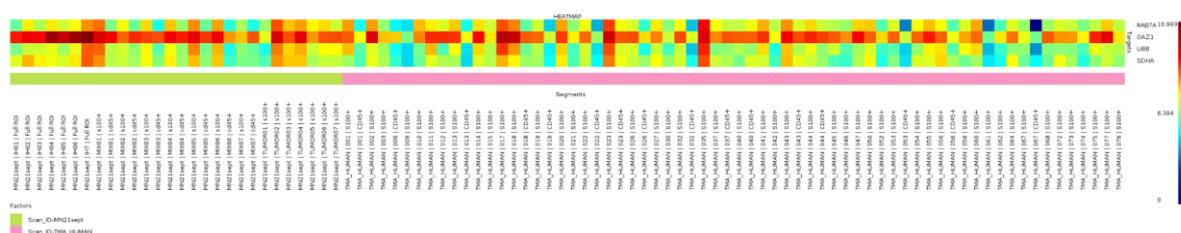


Figura 3.10: Housekeeping utilizados para la normalización de las muestras donde se observa su expresión en todos los AOIs estudiados (218).

3.5 Análisis de enriquecimiento funcional

El análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes es un método de análisis genómico común en el que un conjunto de genes de entrada se compara con las bibliotecas de conjuntos de genes anotados, con el objetivo de identificar conjuntos de genes que se superponen significativamente con los genes de entrada, es decir, grupos de genes que comparten una función biológica, ubicación cromosómica o regulación común (386, 387).

“Enrichr” es un motor de búsqueda de conjuntos de genes en el que se puede consultar cientos de miles de conjuntos de genes anotados. “Enrichr” integra de manera única el conocimiento de muchos proyectos de alto perfil para proporcionar información sintetizada sobre genes y conjuntos de genes de mamíferos. La plataforma proporciona varios métodos para calcular el enriquecimiento de conjuntos de genes y los resultados se visualizan de varias formas interactivas (388). Para visualizar el análisis de enriquecimiento utilizamos “Appyter” para visualizar los resultados que obtuvimos en “Enrichr”. “Appyter” es una aplicación web basada en “Jupyter Notebook” que permite crear automáticamente visualizaciones de los resultados de enriquecimiento en forma de diagrama de dispersión, gráfico de barras, diagrama de lienzo hexagonal, diagrama de Manhattan y diagrama de tipo volcán. Los datos se producen dentro de un informe de “Jupyter Notebook” con el código fuente incluido, que luego se puede descargar, compartir, modificar y ejecutar en otras plataformas.

“Gene Set Analysis Toolkit” (WebGestalt) es una poderosa herramienta en línea para el análisis de enriquecimiento funcional. En la aplicación de “WebGestalt” llevamos a cabo el análisis de enriquecimiento de “Gene Ontology” (GO) y “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” (KEGG) para los DEG regulados al alza y a la baja, respectivamente. Los análisis de enriquecimiento de GO incluyen procesos biológicos (BP), componentes celulares (CC) y funciones moleculares (MF) (389).

3.6 Análisis Estadístico

Utilizamos IBM SPSS (v. 28.0; IBM SPSS, Armonk, NY, EE. UU) para el análisis estadístico de las bases de datos (para cada línea celular de melanoma y/o experimento diseñado para el estudio). También empleamos el software estadístico Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) para el análisis estadístico y la representación gráfica de los datos experimentales. La normalidad de las variables se examinó con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Usamos la prueba *t* de Student para comparar las medias de las muestras independientes que se ajustaban a una distribución normal, fue también aplicada para valorar la variable continua de peso corporal, y para el análisis de la supervivencia el test de Log-rank (Mantel-Cox).

Utilizamos la prueba U de Mann Whitney para variables no paramétricas en el análisis de los resultados del Western blotting. Utilizamos la prueba ANOVA de una vía cuando se compararon variables con más de dos condiciones. Se utilizó la corrección de Bonferroni para examinar las diferencias entre tratamientos. Utilizamos el coeficiente de correlación de Pearson bidireccional para evaluar las relaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos. En el estudio clínico retrospectivo se compararon dos grupos: aquellos con ganglio positivo (pN≠0) y aquellos con valor negativo (pN=0). En cuanto a las variables clínico patológicas y expresión inmunohistoquímica IMP3 (porcentaje e intensidad, puntuación 0-3) utilizamos la prueba U de Mann-Whitney para dos muestras independientes para las variables continuas y el análisis de Kruskal-Wallis cuando se comparaban más de dos condiciones de la variable. Usamos la prueba exacta de Fisher para variables categóricas, según correspondiera, para determinar la asociación entre las variables del paciente y las metástasis de ganglios linfáticos positivos. La correlación entre variables se evaluó con el coeficiente de correlación de Pearson en todos los casos. Los resultados se han expresado como la media ± la desviación estándar para las variables continuas y se ha considerado como estadísticamente significativo un nivel del 5% ($p < 0.05$).

La agrupación jerárquica supervisada y los análisis de componentes principales se realizaron con R (funciones `hclust` y `prcomp`, respectivamente) en la plataforma GeoMx DSP (Customs scripts), utilizando recuentos normalizados transformados en \log_2 . Los genes expresados diferencialmente (DEG) se identificaron usando T-Test no pareada y U de Mann-Whitney. Los valores de p obtenidos y los cambios \log_2 Fold se representaron como gráficos de volcán y los genes que pasaron el umbral del valor de p ajustado por Benjamini-Hochberg (P_{adj}) de 0.05 se indicaron mediante puntos coloreados.

Las puntuaciones de enriquecimiento normalizadas obtenidas y los valores p ajustados por Benjamini-Hochberg (P_{adj}) se representaron como gráficos de burbujas con un área de puntos correspondiente al valor $-\log_{10}P_{adj}$. Las rutas con un valor de P_{adj} inferior a 0.05 se visualizaron como un mapa de enriquecimiento utilizando la aplicación "Appyter". La tasa de descubrimiento falso (FDR) <0.05 se consideró estadísticamente significativa. Para realizar el enriquecimiento de ontología genética (GO) y el análisis de enriquecimiento KEGG de genes expresados diferencialmente (DEG), se utilizaron paquetes `EnrichProfiler` R, con corrección de pruebas múltiples de Benjamini-Hochberg.

CAPÍTULO 4

Resultados

4.1 Efecto de la radiación sobre las células UC-MSC

La irradiación de las células UC-MSC con 2Gy tiene un efecto mínimo en la viabilidad celular con una reducción menor del 2% comparado con las células UC-MSC no radiadas y testado *in vitro* tras 24 horas de cultivo.

Sin embargo, la radiación a baja dosis sí produce efectos biológicos sobre las células UC-MSC. En la Figura 4.1 se representa la expresión de mARNs de TRAIL, DKK3 y ANXA1 tras la irradiación de las UC-MSC. Las UC-MSC incrementan significativamente la expresión de estos genes pasadas 48 horas de haber sido expuestas a 2Gy de radiación ionizante.

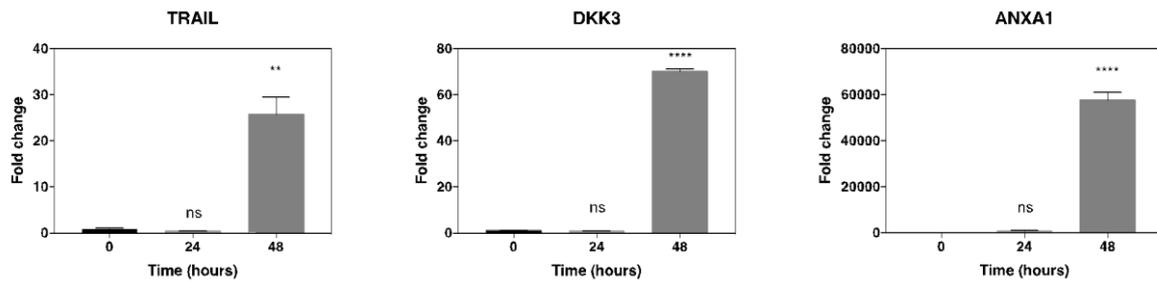


Figura 4.1: Inducción de la expresión de genes relacionados con el efecto "bystander" tras la irradiación de las MSC. ****: $P < 0.0001$; **: $P < 0.01$.

4.2 Experimento previo de toxicidad/inducción de neoplasias

Este experimento se diseñó como paso previo para identificar si las células MSC de cordón umbilical y transformadas (tMSC) inoculadas por vía vascular podían inducir daño en los diferentes parénquimas orgánicos o si tenían capacidad de acumularse e inducir metástasis.

4.2.1 Evolución del peso

Como se observa en la Figura 4.2 todos los ratones de los grupos Control, MSC y MSC-IR mantuvieron una curva ponderal ascendente y similar sin diferencias estadísticas significativas. Sin embargo, los ratones del grupo tMSC sufrieron un descenso del peso en relación con su estado de caquexia secundaria a su situación de diseminación metastásica ($p = 0.0001$, test t de Student).

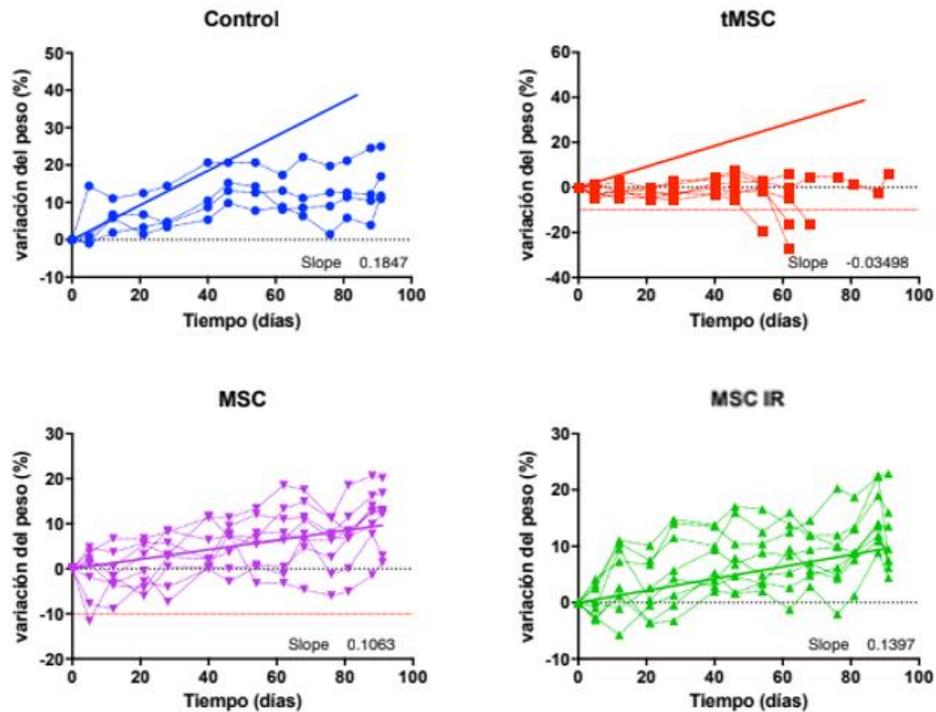


Figura 4.2: Evolución del peso en los diferentes grupos. Los valores se ajustaron a una línea recta a través de una regresión lineal. Las pendientes de las rectas son diferentes entre los grupos. El grupo tMSC fue el único grupo que registró una pérdida de peso significativa durante el experimento. Letras diferentes denotan diferencias significativas ($p < 0.0001$, test t de Student) entre los demás grupos.

Con respecto a la supervivencia en los diferentes grupos, se pudo apreciar que en los grupos Control, MSC y MSC-IR la tasa de supervivencia no presentó diferencias estadísticamente significativas, llegando al final del experimento todos los animales. El grupo tMSC presentó una tasa de supervivencia que fue en descenso a partir de la séptima semana del experimento, como se puede apreciar en la Figura 4.3 y no alcanzaron la ventana de sacrificio a los 90 días.

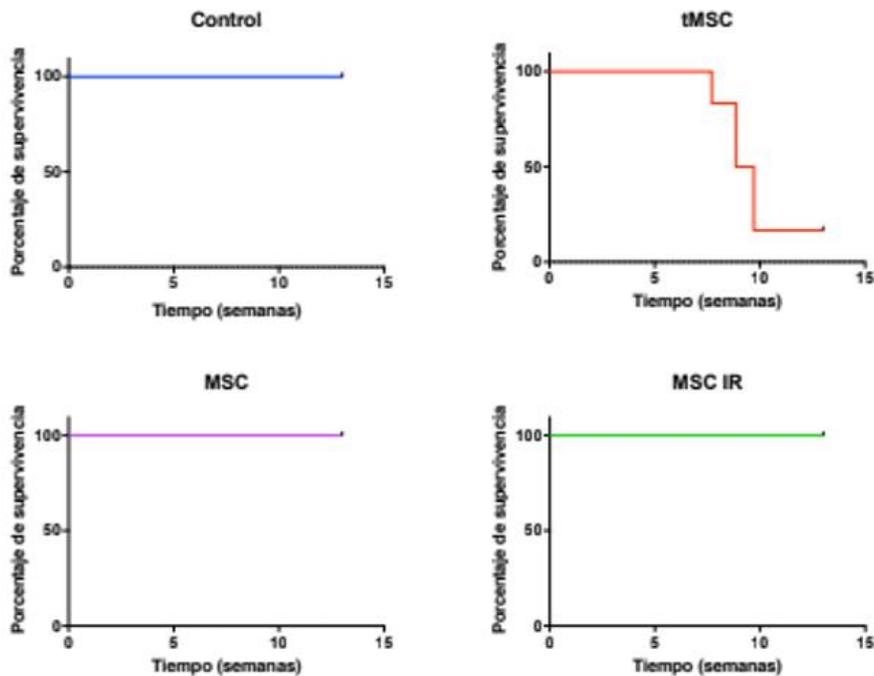


Figura 4.3: Supervivencia de los animales en cada grupo experimental. No hay diferencias significativas entre los grupos Control, MSC y MSC-IR. La supervivencia en el grupo tMSC fue significativamente inferior que los demás grupos ($P < 0.0001$, test de Log-rank (Mantel-Cox)).

4.2.2 Resultados morfológicos

En el estudio morfológico realizado ninguno de los órganos evaluados (pulmón, corazón, hígado, riñón, páncreas, intestino y bazo) en los grupos de ratones Control, MSC y MSC+IR mostraron lesiones morfológicas debidas a las células MSC de cordón umbilical (Fig. 4.4). Fueron hallazgos histopatológicos incidentales y no relacionados con las MSC la presencia de hemorragias intraalveolares microscópicas con macrófagos cargados de hemosiderina también presentes en el grupo Control que no recibió células MSC y dos ratones que desarrollaron metaplasia ósea esplénica focal. Por el contrario, en el grupo tMSC se identificó diseminación metastásica en pulmón principalmente con un número medio de metástasis por mm^2 de 10.33 ± 8.14 de localización central y subpleural y en menor número en hígado o con afectación pericárdica/mediastínica o infiltración

de músculo diafragmático. Mientras que el resto de tejidos evaluados no mostraron patología, el hígado en este grupo presentó en el 100% de los casos, con diferente intensidad como se observa en la (Tabla 4.1), hepatocitos con fenómenos apoptóticos, colestasis intracitoplásmica y displasia nuclear con fenómenos de binucleación e imágenes de mitosis en relación con reparación tisular. En pulmón fue más evidente la presencia de hemorragia y neumonía con infiltración por polimorfonucleares neutrófilos en alvéolos en relación con las metástasis.

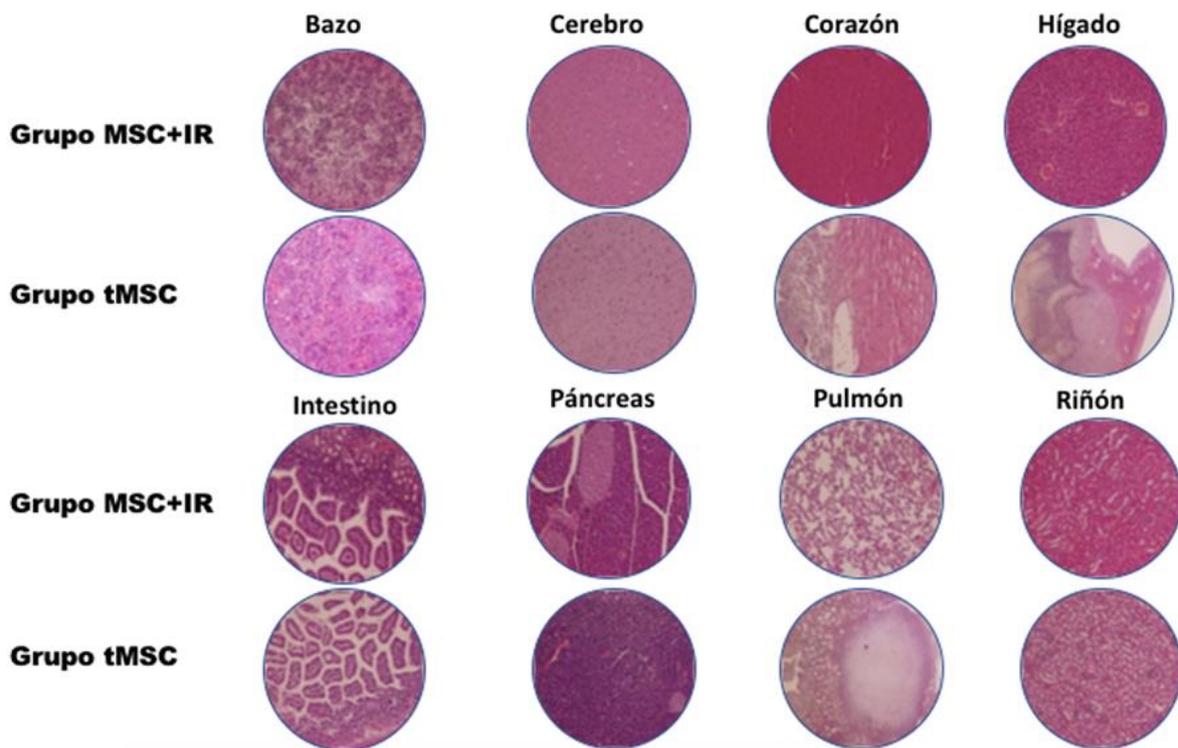


Figura 4.4: Imágenes representativas de los diferentes tejidos sin alteraciones morfológicas significativas en el grupo MSC-IR en comparación con los cortes de tejidos en el grupo tMSC. Nótese la presencia de metástasis en pulmón e hígado mientras el resto de tejidos no muestran alteraciones morfológicas (tinción de hematoxilina-eosina, magnificación original 10x).

Tabla 4.1: Comparación de la patología hepática en ratones del grupo tMSC inoculados con células hMSC comparadas con MSC-IR de cordón umbilical.

Patología	tMSC	MSC-IR	Valor de p
Apoptosis	1.0 (100%)	0.0 (0%)	0.005
Displasia	1.0 (75%)	0.0 (0%)	0.007
Infiltrado inflamatorio	1.0 (100%)	0.0 (0%)	0.005
Colestasia	1.5 (100%)	0.0 (0%)	0.005
Mitosis	1.0 (100%)	0.0 (0%)	0.005
Binucleación	1.0 (100%)	0.0 (0%)	0.005

Valoración semicuantitativa en una escala de 0 a 3. En paréntesis el porcentaje de ratones con lesión.

4.2.3 Resultados de la identificación inmunohistoquímica de células MSC

Se realizó un panel de anticuerpos para inmunolocalizar tisularmente las células UC-MSC en los diferentes parénquimas orgánicos (pulmón, corazón, hígado, riñón, páncreas, intestino y bazo). Tras comprobar que las células tMSC fueron positivas frente a vimentina, anti-mitocondrias y negativas frente a proteína S100, pero con una alta tasa de proliferación demostrada por la positividad frente a Ki-67 se eligió identificar las UC-MSC de diferente origen con el anticuerpo frente a vimentina ya que no ofrecía reacción cruzada con tejidos murinos como se observa en la Figura 4.5.



Figura 4.5: Panel de anticuerpos para inmunoidentificar tisularmente las células MSC en los diferentes parénquimas orgánicos. Nótese la positividad de las células tMSC frente a vimentina con mayor intensidad. Magnificación original 20x.

En la ventana de estudio de 90 días no fue posible identificar mediante método de inmunohistoquímica usando micropolímeros conjugado con peroxidasa células en los grupos MSC y MSC-IR, salvo un pequeño grupo menor de 10 células en localizaciones extraparenquimatosas, alrededor de estructuras mediastínicas y estructuras vasculares del páncreas dentro del grupo MSC-IR. Por el contrario, la positividad fue manifiesta en las células tMSC en forma de metástasis en pulmón, hígado y en pequeñas inmunometástasis o como células circulantes en otras localizaciones (Fig. 4.6) en el momento del sacrificio.



Figura 4.6: Expresión de vimentina en la línea celular tMSC en diferentes tejidos. (Micropolímero conjugado con peroxidasa, magnificación original 40x).

4.2.4 Resultados de la identificación molecular de células MSC

Fue posible mediante qPCR identificar la presencia de células tMSC en importante proporción en pulmón, hígado y en menor cuantía en corazón y bazo. Las células MSC de cordón umbilical irradiadas no fue posible detectarlas en ningún órgano a los 90 días de ensayo. Las células tMSC tampoco fueron detectables en riñón y sistema nervioso central. Las células MSC sin irradiar sólo fueron detectables en algunos ratones en el hígado como se detalla en la Figura 4.7.

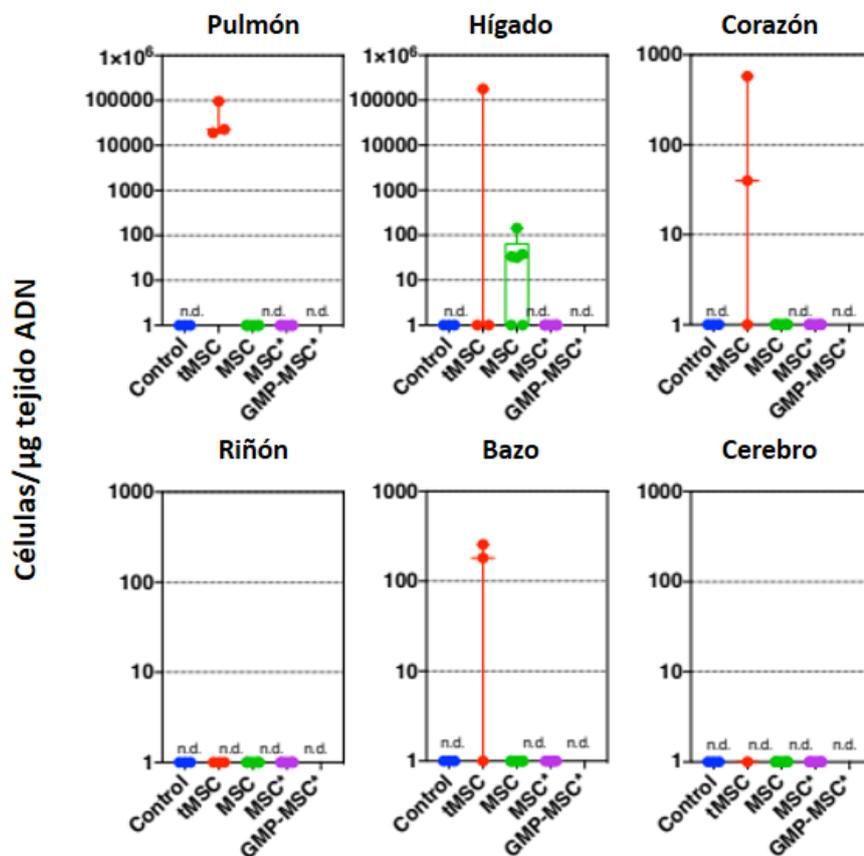


Figura 4.7: Estimación del número de células detectadas por microgramo de tejido de los ratones NOD/SCID gamma tras 90 días de la inoculación por IV de células UC-MSC mediante técnica de qPCR. Control: ratones no tratados; tMSC: ratones inoculados con la línea tMSC de MSC transformadas; MSC: ratones inoculados con UC-MSC; MSC* (MSC-IR): ratones inoculados con células MSC irradiadas; GMP-MSC: ratones inoculados con MSC obtenidas en las condiciones para fabricación de medicamentos GMP. n.d.: no detectado

4.3 Experimento de biodistribución de las células MSC de cordón umbilical

Este experimento buscó identificar la biodistribución de las células MSC de cordón umbilical irradiadas al ser inoculadas por vía IV a lo largo del tiempo, por los distintos órganos del ratón. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

4.3.1 Resultados de la identificación morfológica de células MSC

Ninguno de los órganos evaluados en el estudio morfológico (pulmón, corazón, hígado, riñón, páncreas, sistema nervioso central, intestino y bazo) en los grupos de ratones Control, el día 1, 2, 6 y 14 mostraron lesiones morfológicas debidas a las células MSC de cordón umbilical (Fig. 4.8). Lo mismo que en el experimento anterior, los hallazgos histopatológicos encontrados fueron incidentales y no relacionados con un efecto de las MSC. Así se observó presencia de hemorragias intraalveolares microscópicas también presentes en el grupo Control que no recibió células MSC.

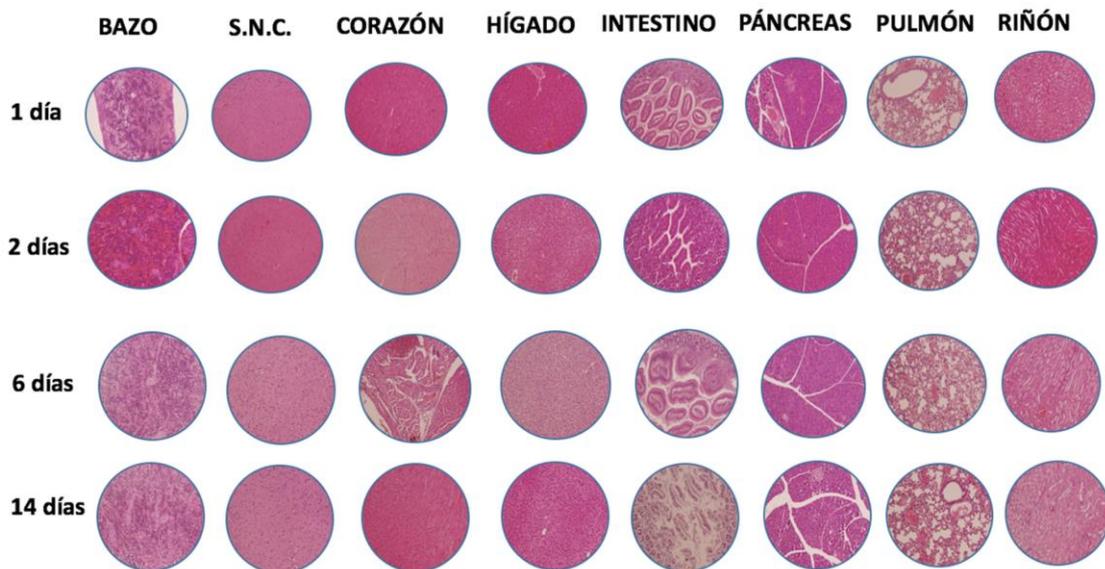


Figura 4.8: Imágenes representativas de los diferentes tejidos sin alteraciones morfológicas significativas en los grupos 1 día, 2 días, 6 días y 14 días. (Tinción de hematoxilina-eosina, magnificación original 20x).

4.3.2 Resultados de la identificación inmunohistoquímica de las células MSC

Se intentó identificar células MSC en los distintos órganos en varias ventanas temporales a 1, 2, 6 y a los 14 días mediante la expresión inmunohistoquímica de vimentina. Las células MSC-IR de cordón umbilical fueron inmunodetectadas a las 24h solo en pulmón e hígado; a las 48h en ambos órganos pero en menor número y a los 6 días se observó un descenso significativo en pulmón como se aprecia en la Figura 4.9 y no fueron inmunodetectadas en hígado. A los 14 días no se identificó ninguna célula en ninguno de los órganos estudiados como se pone de manifiesto en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2: Células MSC de cordón umbilical/mm² en diferentes ventanas temporales identificadas mediante inmunotinción frente a vimentina.

GRUPO	RIÑÓN	S.N.C.	BAZO	PULMÓN	PÁNCREAS	CORAZÓN	HÍGADO	INTESTINO
Control	0	0	0	0	0	0	0	0
24h	0	0	0	3.855±3.85	0	0	0.03±0.085	0
48h	0	0	0	3.357±2.94	0	0	0.16±0.092	0
6 días	0	0	0	0.451±0.45	0	0	0	0
14 días	0	0	0	0	0	0	0	0

Los valores se expresan como media±desviación estándar.

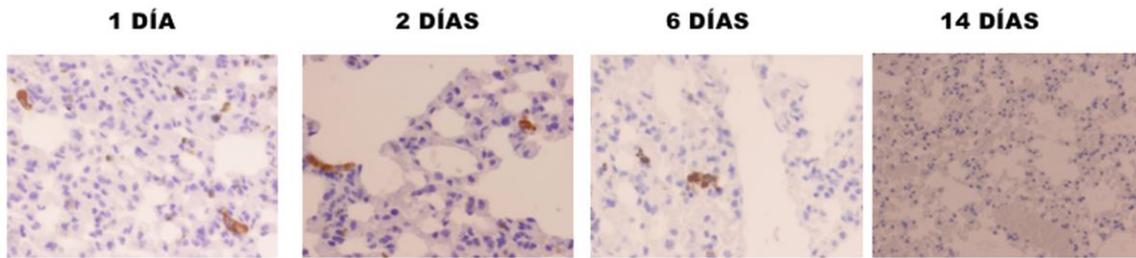


Figura 4.9: Identificación de células MSC en pulmón en varias ventanas temporales a 1, 2, 6 y a los 14 días mediante la expresión inmunohistoquímica de vimentina. Magnificación original 40x.

4.3.3 Resultados de la identificación molecular de las células MSC

La mayor sensibilidad de la técnica de qPCR ha permitido identificar secuencias Alu en todas las ventanas de estudio en todos los tejidos evaluados (pulmón, hígado, corazón, riñón, bazo, órgano reproductor, sistema nervioso central y médula ósea con una estimación del número de células MSC-IR de cordón umbilical muy similar en el primer hasta el decimoquinto día, aunque no en el 100% de los ratones de cada tiempo. Solo fue significativa la diferencia de copias en hígado ($p=0.030$) y en sistema nervioso central ($p=0.015$) en el resto de órganos se mantuvo a lo largo del tiempo sin modificaciones estadísticamente significativas (Fig. 4.10).

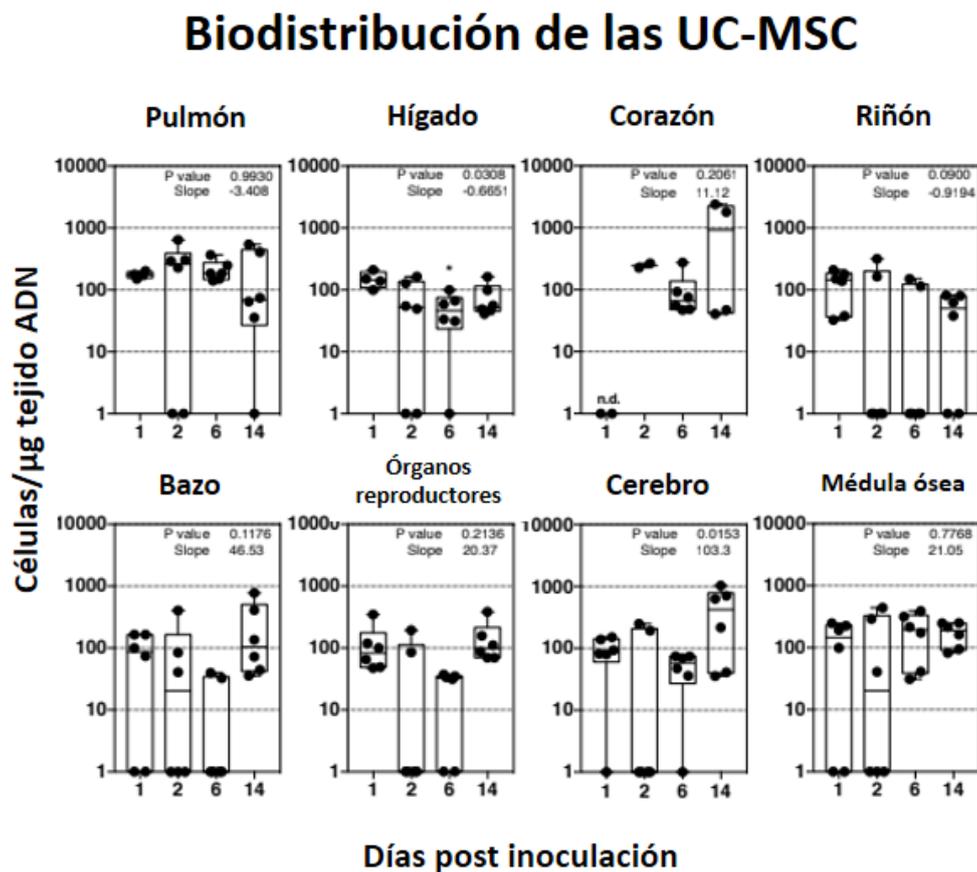


Figura 4.10: Estimación del número de células detectadas por microgramo de tejido de los ratones NOD/SCID gamma tras 1, 2, 6 y 14 días de la inoculación por IV de células UC-MSc- IR. $P < 0.01$. Se ha calculado si existe una tendencia lineal significativa en cada uno de los tejidos a lo largo de los días. Los valores de p en cada mini-gráfico refleja el nivel de significación de la tendencia. Los valores de las pendientes reflejan si es ascendente (pendiente positiva) o descendiente (pendiente negativa).

4.4 Resultados de los experimentos de xenotumores de melanoma en ratones NOD/SCID gamma

Los resultados morfológicos, inmunohistoquímicos y de transcriptómica espacial de los ensayos realizados con el modelo de xenotumores con líneas celulares de melanoma humanos en ratones NOD/SCID gamma sometidos a tratamiento con células madre mesenquimales de ratón, radioterapia o la combinación de ambas se detallan a continuación.

4.4.1 Las líneas celulares de melanoma A375 y G361 tienen diferente capacidad de inducción de metástasis

Las líneas celulares de melanoma humano A375 y G361 son tumorigénicas en ratones inmunocomprometidos. Los xenotumores mantienen las características histopatológicas que consisten en atipia nuclear moderada, presencia de nucléolo eosinofílico, pseudoinclusiones nucleares escasas y citoplasma pálido sin pigmento melánico identificable con H&E. Los tumores morfológicamente presentan pleomorfismo (con células epitelioides y células de hábito fusiforme) e imágenes de mitosis, algunas de ellas atípicas. Los fenómenos de apoptosis y necrosis tumoral focal estuvieron presentes en proporciones variables (Figura 4.11A). No se constató ulceración de la piel en ningún grupo.

Los parámetros morfológicos evaluados en los grupos de control de ambas líneas celulares de melanoma muestran significación estadística (Tabla 4.3). La capacidad de inducir metástasis, necrosis, apoptosis y capacidad de crecimiento fue mayor en la línea celular de melanoma A375. Con nuestras condiciones de ensayo, encontramos que el xenotumor melánico A375 indujo metástasis principalmente en el pulmón y el hígado, mientras que el xenotumor melánico G361 fue tumorigénico, pero no indujo metástasis en nuestras condiciones experimentales (Figura 4.11B).

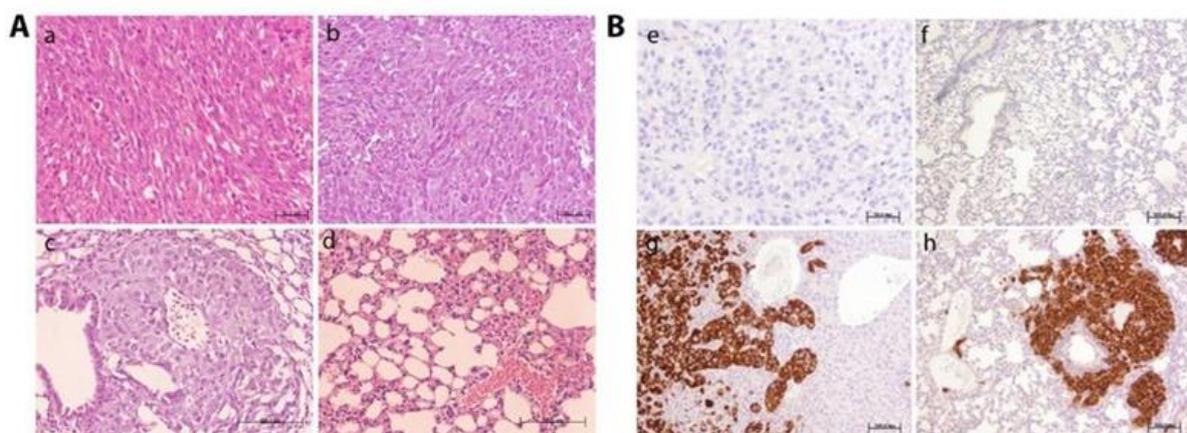


Figura 4.11: Características morfológicas de las líneas celulares de melanoma humano xenoinjertadas. A) Líneas A375 (a) y G361 (b) (hematoxilina-eosina, aumento original 20X). Escala de la barra: 50 micrómetros. Capacidad de metástasización pulmonar de la línea celular A375 (c) y ausencia

en la línea celular G361 (d) (hematoxilina-eosina, aumento original 20X). Escala de la barra: 100 micrómetros. **B)** Expresión inmunohistoquímica de IMP3 en melanoma metastásico xenoinjertado. control de isotipo (e); Línea celular de melanoma xenoinjertado G361, pulmón sin metástasis (f); La línea celular de melanoma A375 xenoinjertada induce metástasis pulmonares (g) y metástasis hepáticas (h) con expresión intensa de IMP3 (micropolímero conjugado con peroxidasa, aumento original 20X). Escala de la barra: (e) y (f): 50 micrómetros; (g) y (h): 100 micrómetros.

Tabla 4.3: Comparación de los resultados morfológicos en melanomas A375 y G361 xenoinjertados en ratones NOD/SCID gamma en los grupos Control.

Variables	A375 Grupo Control	G361 Grupo Control	Valor de p*
Mitosis/10 cga	40.22±19.09	27.21±11.64	0.010
Necrosis [†]	1.57±0.69	1.43±0.51	0.000
Apoptosis (mm ²)	21.85±15.32	9.67±6.78	0.001
Metástasis [‡]	0.58±0.54	0.00±0.00	0.000
Nº metástasis	1.50±2.18	0.00±0.00	0.003

Los valores se expresan como media±desviación estándar. †Escala semicuantitativa de necrosis de 0-3; ‡Presencia/ausencia de metástasis; cga: campo de gran aumento 40x. *No se han asumido varianzas iguales para la prueba *t* de Student.

4.4.2 Las células de melanoma A375 tienen una mayor expresión inmunohistoquímica de IMP3

Se observó una expresión diferente de los marcadores inmunohistoquímicos al comparar los resultados en los grupos Control de las dos líneas celulares de melanoma (Tabla 4.4). La línea celular A375 (Control) presentó mayor expresión de IMP3 y Ki-67 y niveles similares de HIF-1 α y PARP1, en comparación con la línea celular G361 (Control) (Fig. 4.12). Se observó una mayor expresión inmunohistoquímica de IMP3, estadísticamente significativa, entre los grupos Control de tumores xenoinjertados ($p=0.000$, prueba *t* de Student). Esto se confirmó mediante Western Blotting (A375:

0.928±0.15 frente a G631: 0.649±0.03, p=0.05, prueba U de Mann Whitney). Nuestros hallazgos muestran una mayor intensidad de expresión de E-Cadherina en la línea celular G361. La expresión global de IMP3 mostró una correlación directa, estadísticamente significativa, con la expresión nuclear de Ki-67, el número de mitosis, la expresión de PARP1 y el número de metástasis (p=0.000, coeficiente de correlación de Pearson) y correlación inversa con la expresión de adhesión moléculas y HIF-1 α (Tabla 4.7).

Tabla 4.4: Comparación estadística de los resultados inmunohistoquímicos en melanomas A375 y G361 xenoinjertados entre los grupos Control.

Variables	A375 Grupo Control	G361 Grupo Control	Valor de p*
E-Cadherina (céls./mm ²)	00.00±00.00	357.84±191.70	0.000
N-Cadherina (céls./mm ²)	159.50±152.38	299.78±336.58	0.521
IMP3 (céls./mm ²)	1012.37±127.06	622.58±66.19	0.000
PARP1 (céls./mm ²)	584.12±185.52	560.43±88.48	0.625
HIF-1 α (céls./mm ²)	93.17±158.71	72.25±56.49	0.327
Ki-67 (céls./mm ²)	867.10±299.23	529.67±161.09	0.876

Los valores se expresan como media±desviación estándar. *No se han asumido varianzas iguales para la prueba *t* de Student.

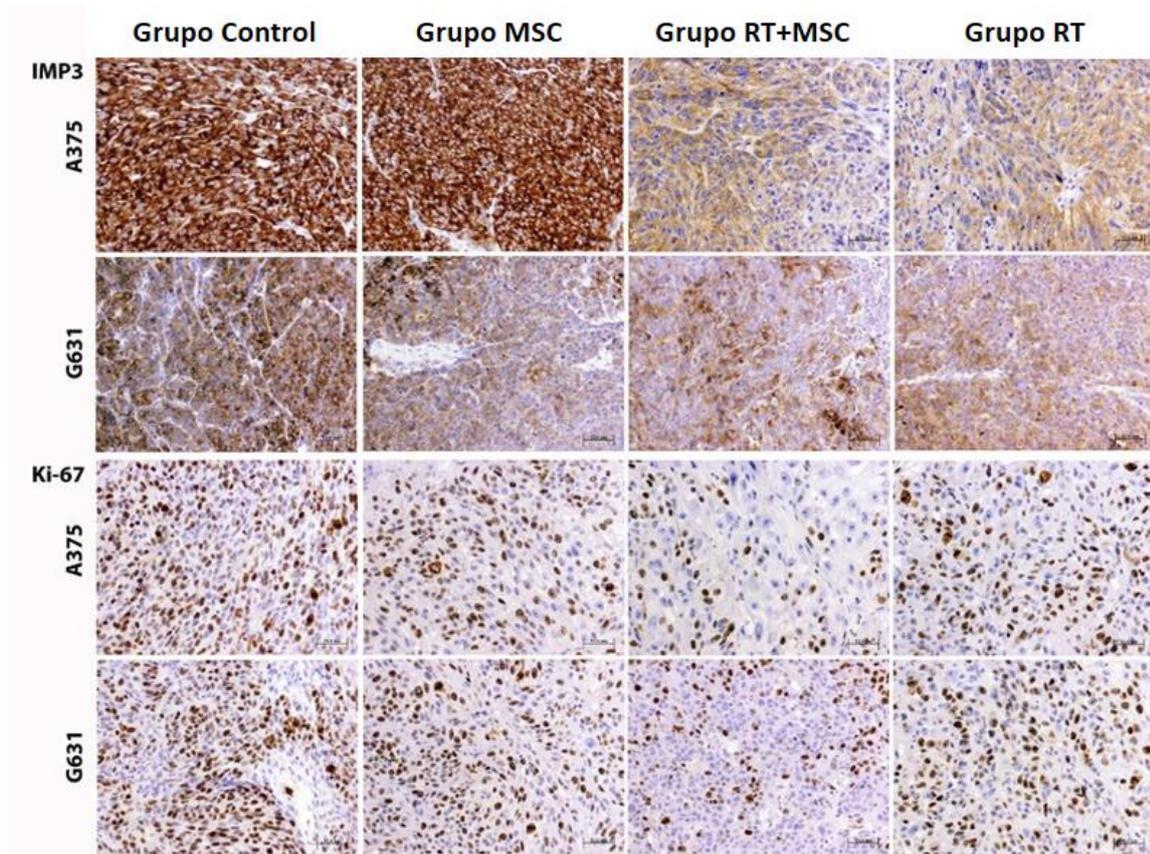
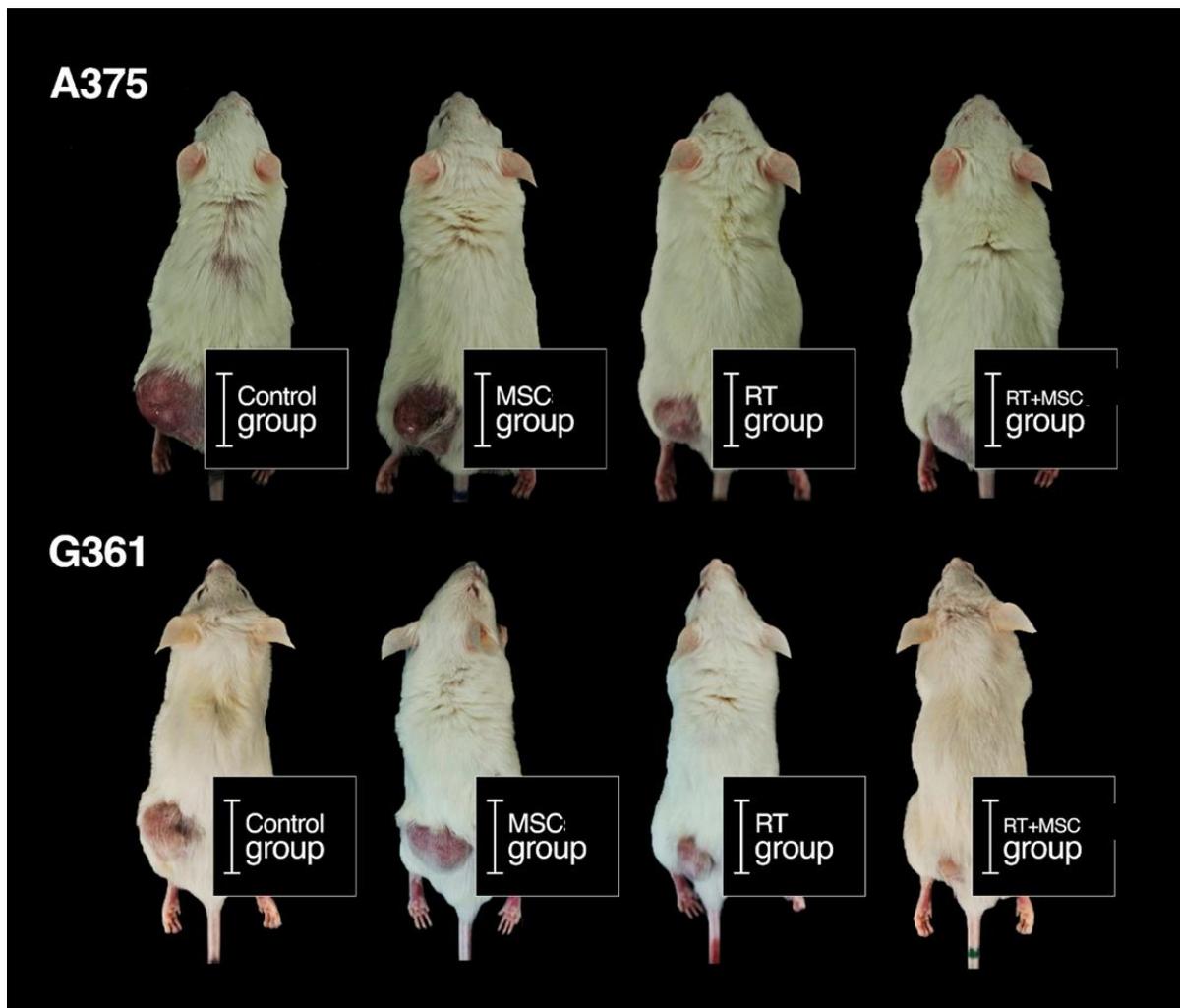


Figura 4.12: Modificación de la expresión inmunohistoquímica de IMP3 citoplasmático y marcadores Ki-67 nucleares en los dos xenoinjertos de células de melanoma en los grupos Control, MSC, RT+MSC y RT. (Micropolímero conjugado con peroxidasa, aumento original 20X). Escala de barra: 50 micrómetros.

Los tres tratamientos redujeron la proliferación celular evaluada por el antígeno nuclear Ki-67 ($p=0.000$, prueba ANOVA unidireccional) (Control vs. grupo MSC, $p=0.035$, vs. grupo RT+MSC, $p=0.000$ y vs. grupo RT $p=0.050$, prueba de Bonferroni) (Fig. 40) y redujo el número de metástasis ($p=0.004$, prueba ANOVA unidireccional) (Control frente a grupo de MSC, $p=NS$, frente a grupo RT+MSC, $p=0.008$ y frente a grupo RT $p=0.014$, prueba de Bonferroni).

4.4.3 Los tratamientos con RT y RT-MSK redujeron el tamaño de los tumores en melanomas A375 y G361 xenoinjertados en ratones NOD/SCID gamma

Confirmamos que los tratamientos realizados redujeron el tamaño de los tumores de forma estadísticamente significativa. El tratamiento con RT+MSC logró la mayor eficacia, como lo encontró previamente nuestro grupo en un experimento similar (213) (Fig. 4.13).



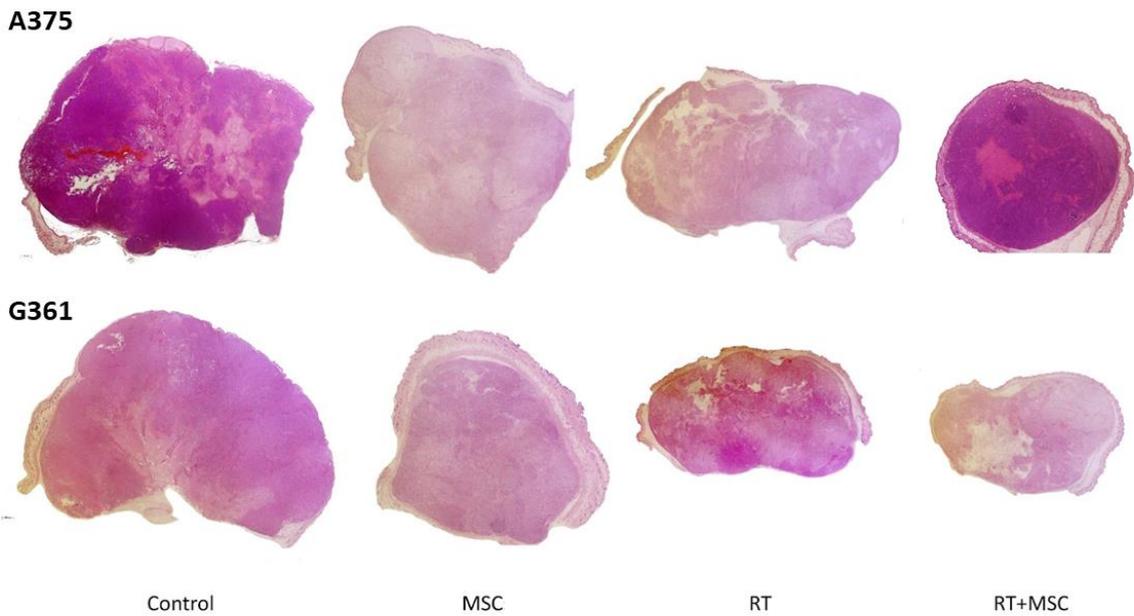


Figura 4.13: Tamaño del tumor en ratones representativos de diferentes grupos al final del experimento. Modificación del tamaño tumoral por diferentes tratamientos en dos melanomas xenoinjertados: Control A375; tratamiento de A375 MSC; tratamiento A375 RT; Tratamiento A375 RT+MSC. Control G361; tratamiento de MSC G361; tratamiento G361 RT; y tratamiento G361 RT+MSC. (hematoxilina-eosina, magnificación original 2X). Escala de la barra: 50 micrómetros.

La diferencia entre los gráficos de crecimiento tumoral en los ratones con melanomas A375 y G361 xenoinjertados tratados con RT y RT+MSC fue estadísticamente significativa ($p=0.01$). Además, hacia el final del experimento, los volúmenes de tumor en todos los grupos de prueba indicaron un volumen reducido en comparación con los grupos de Control, 24.30% para MSC, 16.07% para RT, 31.74% para RT+MSC en la línea de células tumorales A357 (Fig. 4.14A), y 40.93% para MSC, 61.48% para RT y 89.84% RT+MSC en la línea celular tumoral G361 (Fig. 4.14B). Recientemente, en trabajos previos obtuvimos hallazgos similares (390).

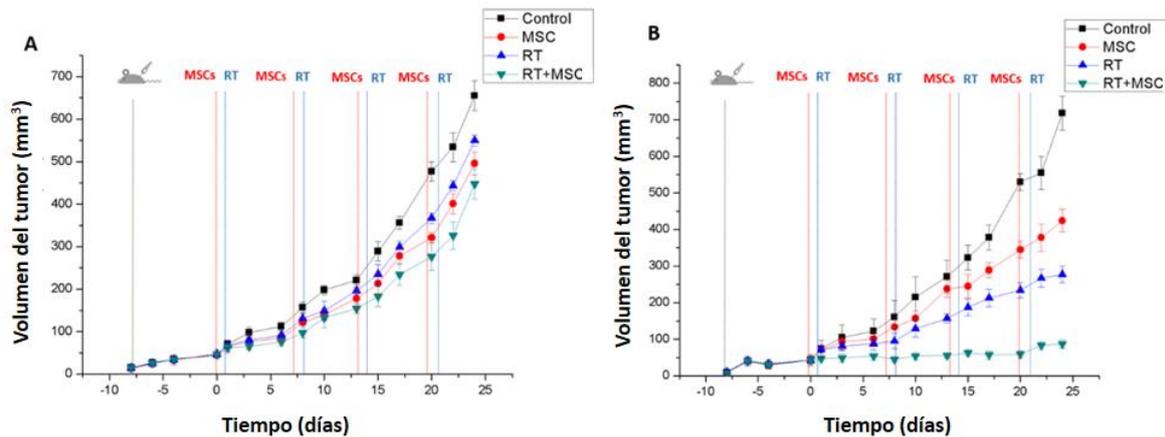


Figura 4.14: Curvas de crecimiento tumoral de los tumores primarios; A) Curvas de crecimiento tumoral del modelo tumoral A375. B) Curvas de crecimiento tumoral del modelo tumoral G631. Los animales se controlaron regularmente cada 2-3 días, midiendo dos diámetros perpendiculares de cada tumor para determinar el crecimiento tumoral. El tratamiento se repitió cada semana como se indica en el gráfico, durante un total de cuatro semanas. Los valores experimentales se ajustaron mediante el método de regresión no lineal a una ecuación exponencial. Los tamaños de los tumores se presentan como media \pm SEM de 8 ratones en cada experimento. Las diferencias entre las curvas son estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Se observa una reducción estadísticamente significativa del crecimiento tumoral en tratamientos con MSC y RT. La combinación de RT+MSC da un resultado sinérgico más evidente en el modelo tumoral G361.

4.4.4 El tratamiento con RT-MSC y RT disminuye la expresión inmunohistoquímica y por Western Blotting de IMP3.

Los tratamientos RT+MSC y RT redujeron significativamente la expresión de IMP3 en comparación con el grupo de Control ($p=0.002$ y $p=0.001$, respectivamente, prueba de Bonferroni). Esto se confirma mediante Western blotting (Fig. 4.15). HIF-1 α y PARP1 siguieron patrones similares. La N-Cadherina tenía expresión diferente en los dos melanomas xenoinjertados (Tabla 4.5). El tratamiento con RT+MSC redujo el número de células en mitosis ($p=0.02$, prueba de Bonferroni) y la proliferación estimada por el antígeno de proliferación Ki-67 (Tabla 4.5). Los tratamientos ensayados también redujeron la expresión de IMP3 en el melanoma xenoinjertado G631 ($p=0.001$, prueba ANOVA unidireccional) (Tabla 4.6). Es importante señalar que la expresión elevada de IMP3 se ha relacionado con un mal pronóstico en el melanoma humano.

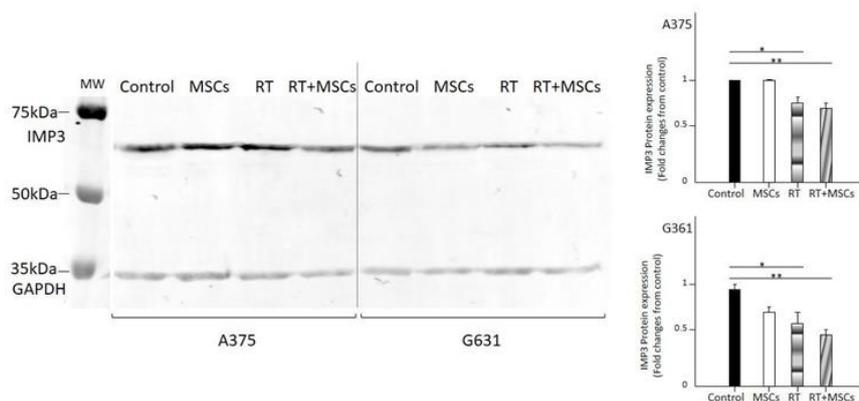


Figura 4.15: Expresión de IMP3 en melanomas xenoinjertados A375 y G361. Western blotting representativo de tres determinaciones independientes (media±desviación estándar). *p=0.05, Control frente al grupo RT+MSC y **p=0.046 Control frente al grupo RT en A375. **p=0.043, Control frente a grupo RT+MSC y *p=0.046 Control frente a grupo RT en G631. Peso molecular IMP3: 65 kDa; GAPDH: 37 kDa. Abreviaturas: kDa, Kilodalton.

Tabla 4.5: Comparación del efecto del tratamiento sobre la expresión inmunohistoquímica de diferentes marcadores en melanoma humano A375 xenoinjertado en ratones NOD/SCID gamma.

Variable (A375)	Control	MSC	RT	RT+MSC	P-Valor*
Ki-67 (cél/mm ²)	867.10±299.23	631.72±188.85	608.55±302.03	370.56±253.82	0.000
E-Cadherina (cél/mm ²)	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-
N-Cadherina (cél/mm ²)	159.50±152.38	52.51±123.44	0.00±0.00	0.00±0.00	0.000
IMP3 (cél/mm ²)	1012.37±127.06	1028.01±130.69	847.63±165.90	815.05±193.49	0.000
PARP1 (cél/mm ²)	584.12±185.52	291.81±339.38	195.97±231.94	308.21±288.88	0.003
HIF-1 α (cél/mm ²)	93.17±158.71	0.00±0.00	14.19±30.05	30.11±44.33	0.007

Los valores se expresan como media±desviación estándar. *Prueba ANOVA de una vía. MSC: células madre mesenquimales; RT: Radioterapia.

Tabla 4.6: Comparación del efecto del tratamiento sobre la expresión inmunohistoquímica de diferentes marcadores en melanoma humano G631 xenoinjertado en ratones NOD/SCID gamma.

Variable (G361)	Control	MSC	RT	RT+MSC	P-Valor*
Ki-67 (cél./mm ²)	529.67±161.09	488.48±132.93	419.35±143.90	327.42±71.21	0.002
E-Cadherina (cél./mm ²)	357.84±191.70	441.70±154.19	331.29±142.40	294.35±128.15	0.123
N-Cadherina (cél./mm ²)	299.78±336.58	262.44±247.19	324.73±138.19	336.82±292.79	0.908
IMP3 (cél./mm ²)	622.58±66.19	561.29±75.46	482.79±147.80	455.30±82.71	0.001
PARP1 (cél./mm ²)	560.43±88.48	662.58±57.66	562.50±144.32	560.48±83.35	0.040
HIF-1 α (cél./mm ²)	72.25±6+56.49	78.57±54.35	51.61±52.98	59.67±47.55	0.604

Los valores se expresan como media±desviación estándar. * Prueba ANOVA unidireccional. MSC: Células madre mesenquimales; RT: Radioterapia.

Tabla 4.7: Coeficiente de correlación de Pearson entre variables inmunohistoquímicas y morfológicas.

	IMP3	Ki-67	Mitosis (10hpf)	E-Cadherina	N-Cadherina	PARP1	HIF-1 α	No. de metástasis
IMP3	1							
Ki-67	0.459 (p=0.000)	1						
Mitosis	0.627 (p=0.000)	0.359 (p=0.001)	1					
E-Cadherina	-0.588 (p=0.000)	-0.263 (p=0.013)	-0.531 (p=0.000)	1				
N-Cadherina	-0.373 (p=0.001)	-0.123 (p=0.255)	-0.348 (p=0.001)	0.257 (p=0.016)	1			
PARP1	0.459 (p=0.000)	-0.177 (p=0.1379)	-0.400 (p=0.001)	0.475 (p=0.000)	0.367 (p=0.001)	1		
HIF-1 α	-0.269 (p=0.014)	-0.135 (p=0.214)	-0.231 (p=0.033)	0.334 (p=0.001)	0.253 (p=0.018)	0.352 (p=0.002)	1	
No. de Metástasis	0.422 (p=0.000)	0.228 (p=0.034)	0.392 (p=0.000)	-0.369 (p=0.000)	-0.184 (p=0.089)	0.330 (p=0.004)	-0.221 (p=0.038)	1

4.4.4 Resultados del estudio del microambiente tumoral

El estudio mediante inmunohistoquímica del TIL en los TMA del modelo experimental usando un anticuerpo frente a CD45 no ha permitido encontrar diferencias estadísticamente significativas entre el infiltrado leucocitario murino en las dos líneas de melanomas xenoinjertadas ($p=0.903$), ni hemos detectado modificaciones estadísticamente significativas atribuibles a ninguno de los tratamientos aplicados ($p<0.05$ en todas las comparaciones).

4.4.5 Resultados del estudio de transcriptómica espacial en melanomas xenoinjertados con las líneas A375 y G631 en ratones NOD/SCID gamma

Un total de 18672 sondas fueron detectadas en las líneas de melanoma xenoinjertadas en variable cantidad por encima del umbral detectable (Fig. 4.16).

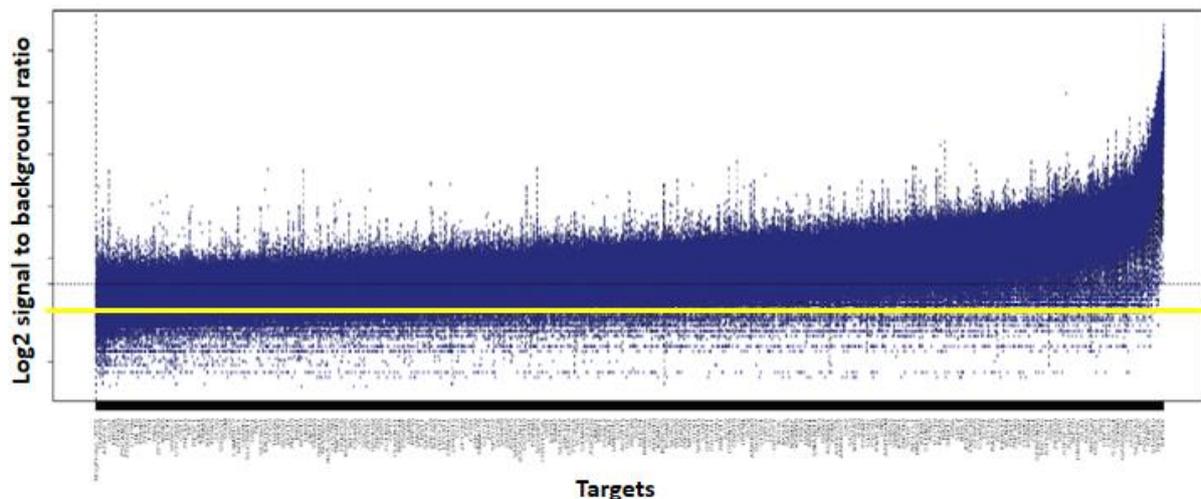


Figura 4.16: Gráfico de control de calidad (QC) para la expresión de genes que nos ayuda a identificar genes sin señal útil. Recuentos medios de DSP \pm DE en todos los compartimentos para cada marcador de DSP. Nos muestra que todos los genes de nuestro estudio se encuentran por encima del umbral en todos los segmentos estudiados y por lo tanto nos sugiere que son datos válidamente interpretables.

4.4.5.1 Se observan diferencias entre la expresión del transcriptoma espacial entre las dos líneas de melanoma xenoinjertadas A375 y G631

El estudio mediante la plataforma GeoMx®DSP pone de manifiesto numerosas diferencias en el transcriptoma de los tumores generados por las líneas celulares de melanoma A375 y G631 con 3336 sondas con diferencias significativas como se puede observar en las gráficas siguientes.

La representación gráfica del Análisis de Componentes Principales (PCA) representado en tres ejes de coordenadas evidencia que la expresión del transcriptoma de los dos melanomas experimentales inducidos en ratón por la inoculación de las líneas celulares de melanoma humano A375 y G361 es diferente (Fig. 4.17).

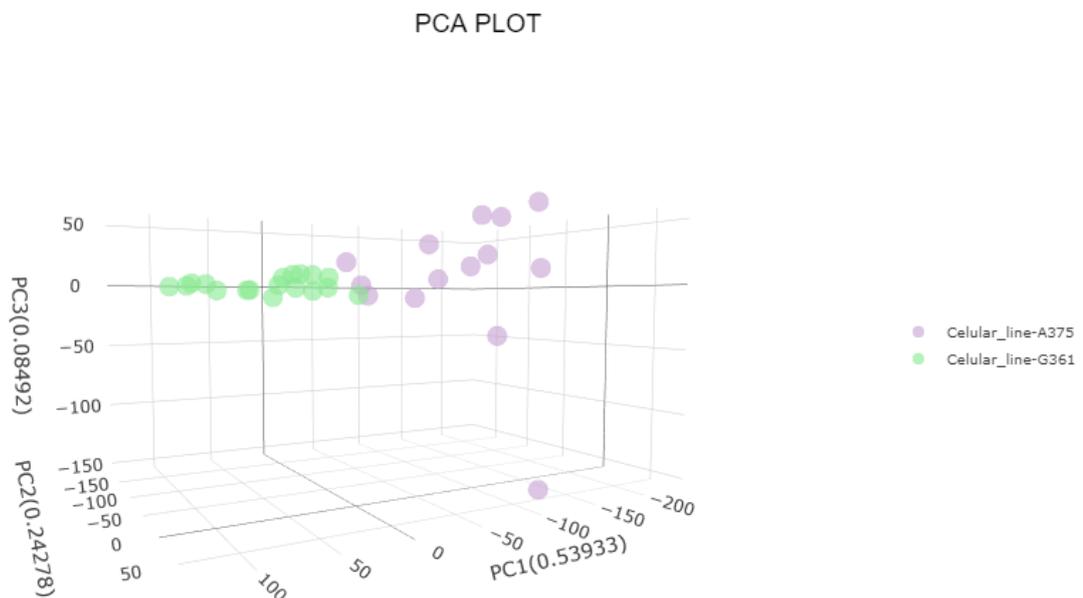


Figura 4.17: Gráfico PCA de la expresión del transcriptoma en tres ejes de coordenadas de las líneas A375 y G361 de melanoma humano xenoinjertadas en ratón. Nótese la evidente separación espacial de los dos tumores xenoinjertados.

La representación gráfica en mapa de calor (*Heatmap*) permite reconocer, según la expresión del transcriptoma de manera diferencial, las dos líneas celulares de melanoma humano (Fig. 4.18).

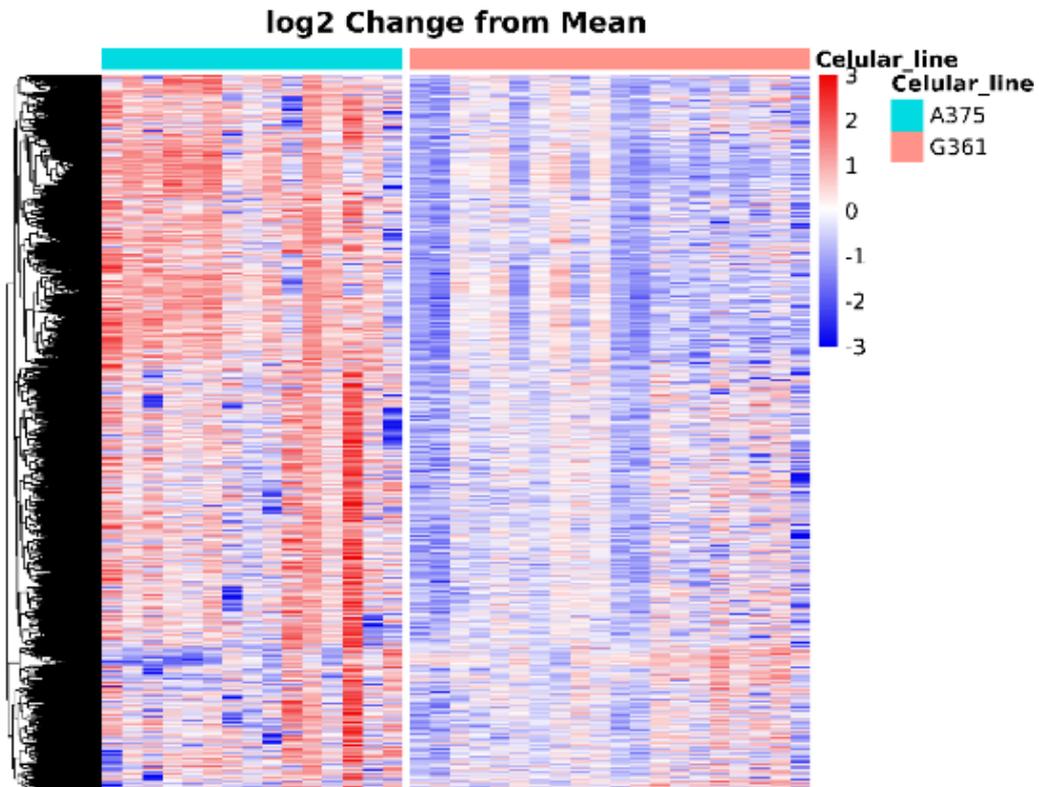


Figura 4.18: *Heatmap* supervisado de la expresión de transcritos que permiten diferenciar entre los tumores melánicos inducidos por las líneas A375 y G361 xenoinjertadas.

El mapa de calor a mayor detalle permite observar una diferencia en la expresión de ambas líneas en marcadores melánicos con diferencia de expresión entre los 18672 genes (Fig. 4.19).

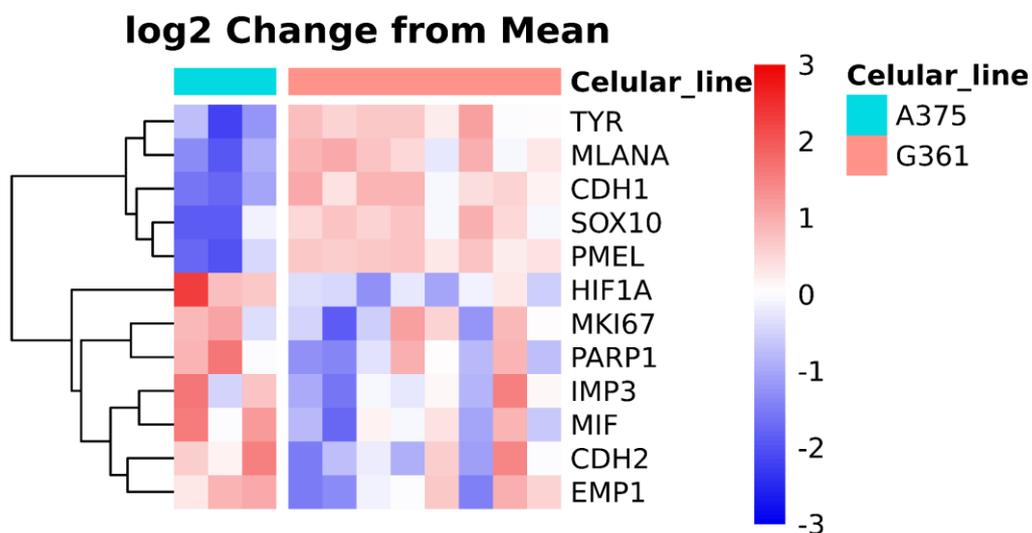


Figura 4.19: *Heatmap* supervisado seleccionando los transcritos que fueron estudiados mediante anticuerpos por inmunohistoquímica en las dos líneas de melanoma xenoinjertadas incluyendo solo

los grupos Control. [TYR (Tirosinasa), PMEL, Ki67 (MKI67), MART-1 (MLANA), MIF, EMP1, IMP3, SOX10, E-Cadherina (CDH1), N-Cadherina (CDH2), PARP1, HIF1 α].

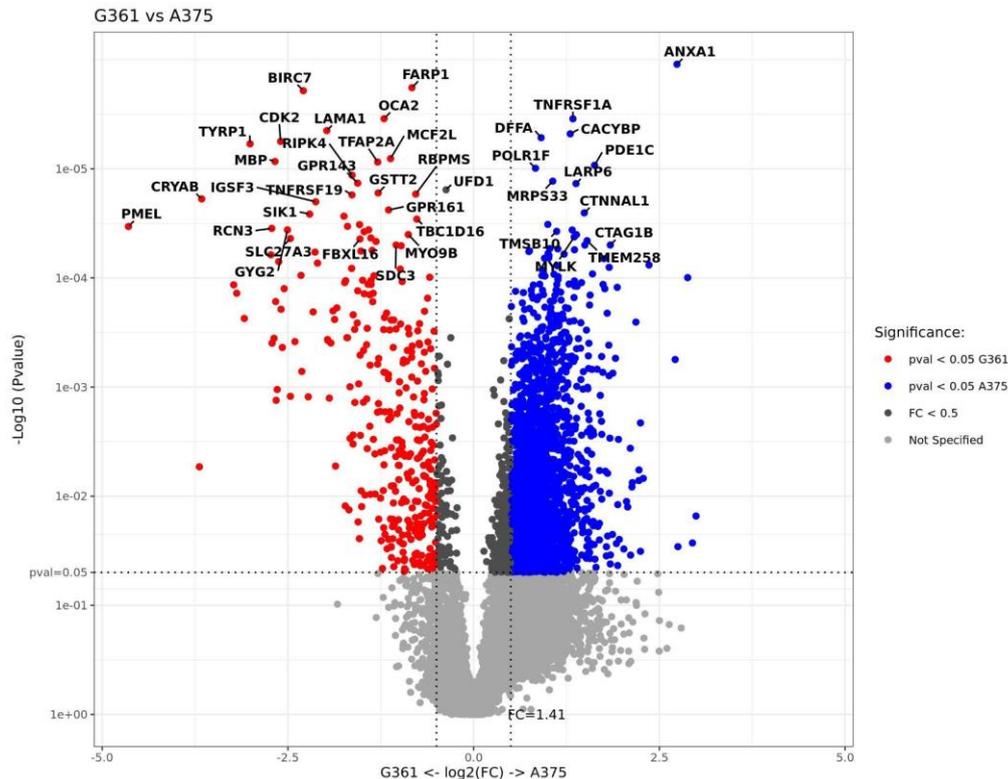


Figura 4.20: Gráfico de tipo volcán de las sondas expresadas en las líneas A375 y G631 xenoinjertadas. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p (log 10) de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de “fold change” (FC) a partir de los cuales se obtiene significación. T-test no pareado con corrección Benjamin Hochberg.

Comparando ambas líneas de melanoma en los grupos Control hay una sobreexpresión de 2936 sondas en la línea celular de melanoma xenoinjertada A375 de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) y 1700 genes sobreexpresados con una significación mayor ($p < 0.01$), de ellos los que tenían un $\text{Log}_2(\text{FC}) > 2$ fueron los indicados en la Tabla 4.8 (Fig. 4.20):

Tabla 4.8. Genes sobreexpresados en A375, Log_2 "fold change" (FC)>2.

IFITM3	ANXA1	XAGE1A	BLID	CAV1	KRT80	MAGEA4
CT45A1	ID1	GPX3	KRT18	TPM2	CD68	PCOLCE
S100A4	LAMA5	NT5E	TRBC1	HMGA1	BGN	

Destaca entre el conjunto de genes expresados significativamente en la línea con diseminación metastásica de nuestro estudio A375. La ruta de proteínas con expresión alterada en la ruta metabólica de metástasis ($p=0.000$), dentro de ella, los genes expresados que la componen son: S100A4, ID1, KRT18, y CAV1 (Figs. 4.22 y 4.23). Así como la ruta metabólica de transición epitelio mesénquima ($p=0.000$) y la ruta de participación de las anexinas en la resolución de la inflamación ($p=0.001$) (Fig. 4.21)

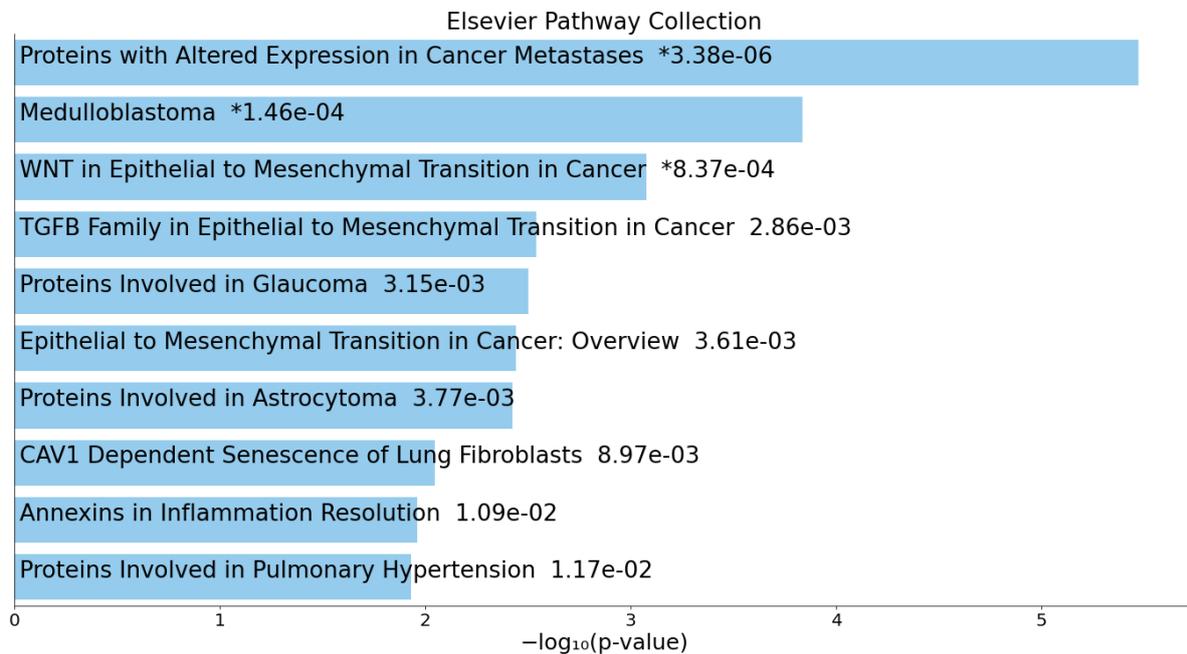


Figura 4.21: Gráfico de barras de las rutas más expresadas en la línea A375. Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes Elsevier_Pathway_Collection. Los 10 términos enriquecidos principales para el conjunto de genes de entrada se muestran en función del $-\log_{10}$ (valor p), y el valor p real se muestra junto a cada término. El término en la parte superior tiene la superposición más significativa con el conjunto de genes de consulta de entrada. Las barras de colores corresponden a términos con valores de p significativos (<0.05). Un asterisco (*) junto a un valor p indica que el término también tiene un valor p ajustado significativo (<0.05).

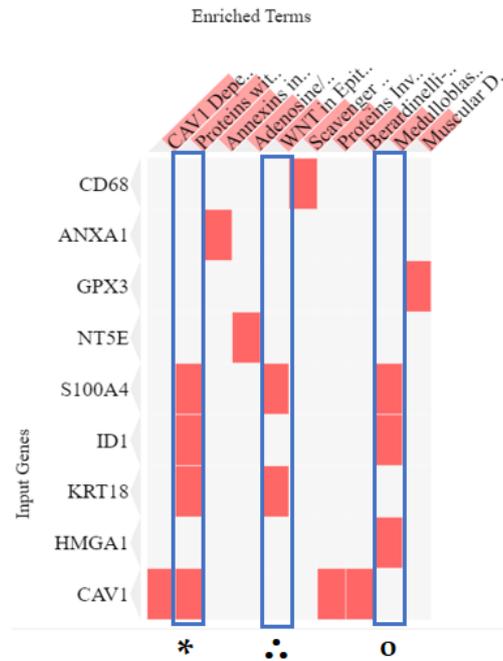


Figura 4.22: Clustergrama de las proteínas sobreexpresadas que forman parte de ruta de proteínas con expresión alterada en metástasis combinando p-value y z-value. ENRICH. (*) Proteínas con expresión alterada en metástasis en cáncer (p=0.000) [KRT18, CAV1, ID1, S100A4]. (o) Meduloblastoma (p=0.000) [ID1, HMGA1, S100A4]. (:) WNT en la transición epitelial a mesenquimatososa en cáncer (p=0.000) [KRT18, S100A4].

Legend

- GO Biological Process 2021
- Gene

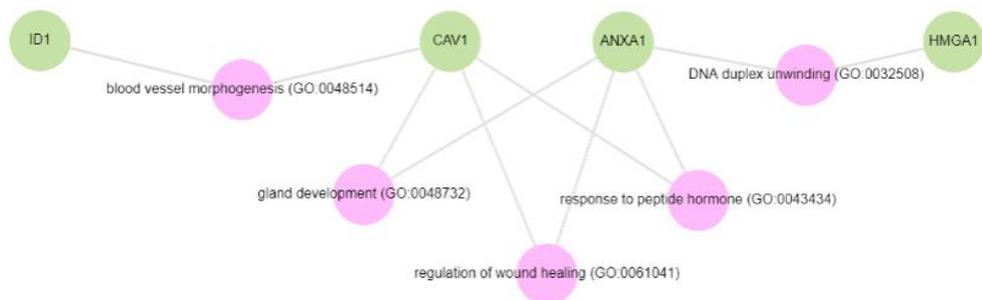


Figura 4.23: Red de los genes alterados en A375 con las vías de Gene Ontology (GO).

Con respecto a la línea celular xenoinjertada de melanoma humano G361 fueron 400 sondas las sobreexpresadas en la comparación con la línea A375 de manera

estadísticamente significativa con un valor de $p < 0.05$, de ellas 330 sondas con $p < 0.01$ y con un $\text{Log}_2(\text{FC}) > 2$ fueron 33 como se detalla en la Tabla 4.9.

Tabla 4.9: Genes sobreexpresados en G631, Log_2 "fold change" (FC) > 2.

HES2	TTYH2	ADCY1	TUBB2B	QPCT	SLC27A3	S100B
BIRC7	OLFM1	CTAG2	CDH1	SIK1	RCN3	APOD
S100A1	CRYAB	HES6	MLANA	SLC16A6	SOX8	TYRP1
TUBB2A	ADGRG1	SEMA5A	GYG2	PMEL	IGSF3	MAPK4
CDK2	MBP	MITF	BAMBI	NDN		

Las células neoplásicas G361 que muestran menor tendencia a metastatizar presentan activación de las vías metabólicas de maduración, senescencia y apoptosis melanocítica (Fig. 4.24).

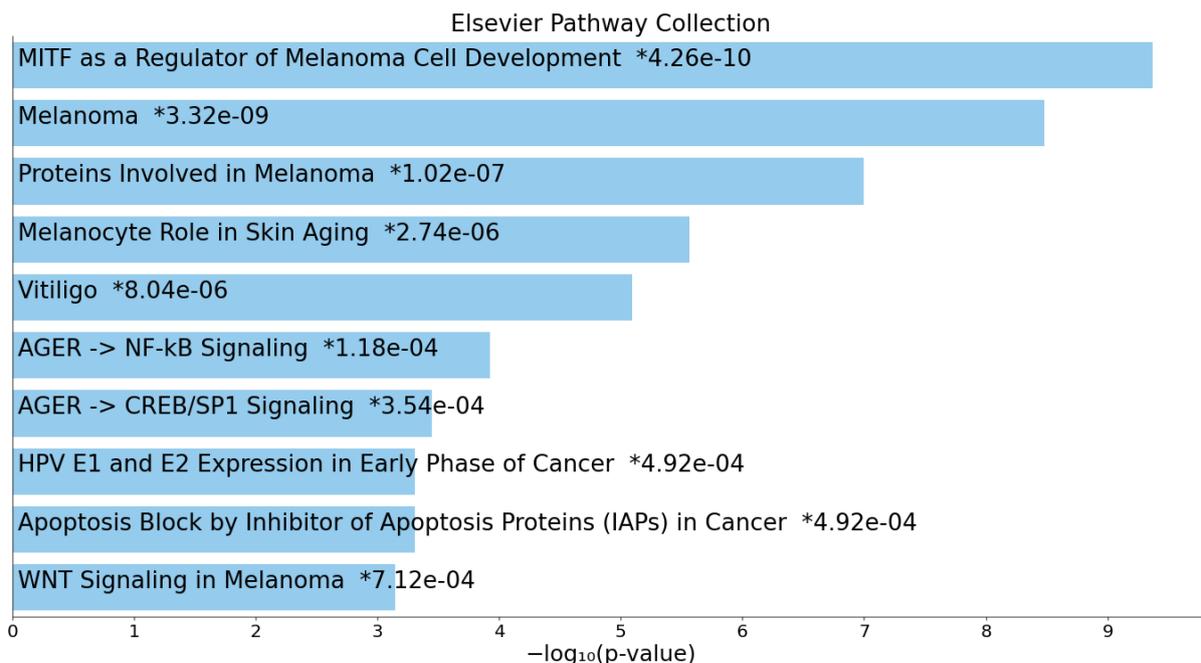


Figura 4.24: Gráfico de barras de las rutas más expresadas en la línea G361. Pathways Elsevier Pathway Collection. Enrich+KG. Ordenados por ranking del valor de p y corrección Benjamin-Hochberg.

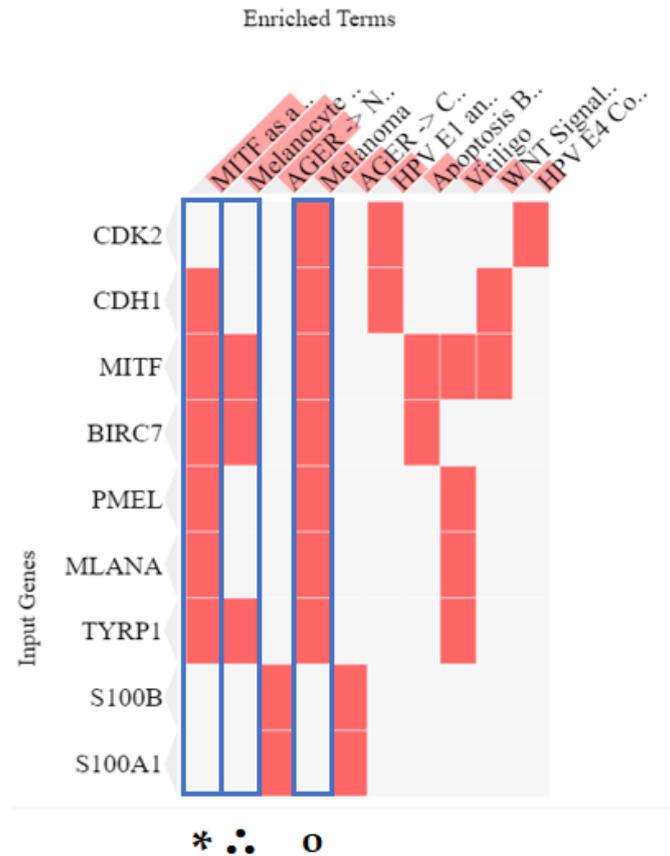


Figura 4.25: Clustergrama de las proteínas sobreexpresadas que forman parte de ruta de proteínas con expresión alterada en metástasis combinando valor de p y valor z. ENRICHR. (*) MITF como regulador del desarrollo de células de melanoma ($p=4.264353e-10$) [PMEL, MLANA, CDH1, TYRP1, MITF, BIRC7]. (°) Melanoma ($p=3.320172e-09$) [PMEL, MLANA, CDH1, CDK2, TYRP1, MITF, BIRC7]. (:.) Papel de los melanocitos en el envejecimiento de la piel ($p=2.739252e-06$) [TYRP1, MITF, BIRC7].

En este conjunto de genes sobreexpresados en la línea G361 encontramos muchas rutas metabólicas implicadas en las vías de activación de melanocitos (Figs. 4.25, 4.26).

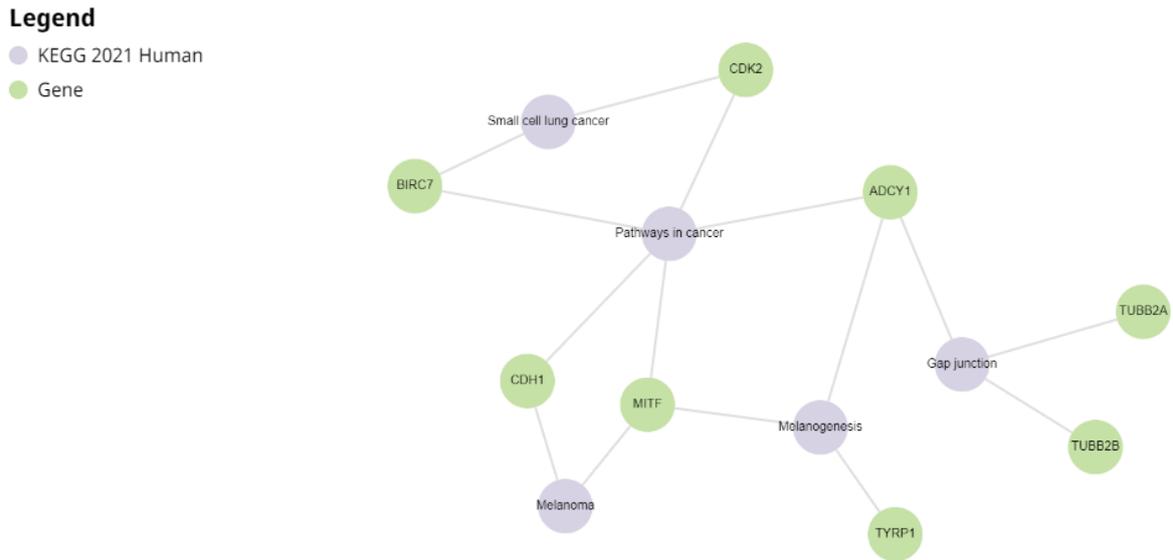


Figura 4.26: Red de los genes alterados en G361 con las vías de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Comparando las dos líneas en el análisis de enriquecimiento del conjunto de genes entre las líneas A375 y G361 destacan con un $FDR < 0.05$ las rutas de Señal de supervivencia inducida por HIF-1 y la ruta PDGFR-beta en A375 rutas asociadas al crecimiento tumoral. Y la ruta de señalización de Rb-E2F1 y activación de CDK-Beta-catenina en la línea G361 activando el crecimiento celular (Fig. 4.27).

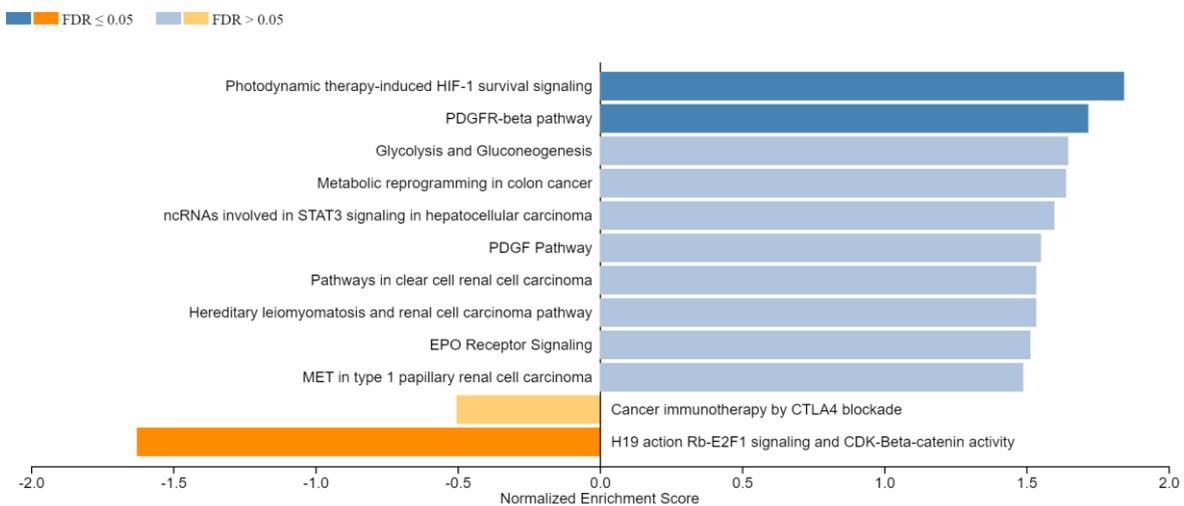


Figura 4.27: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes de DEG entre A375 y G361. Ordenadas según la tasa de descubrimiento falso (FDR), G631 (naranja) y línea A375 (azul). Ordenadas según la tasa de descubrimiento falso (FDR), en el que se muestran las vías con un $FDR < 0.05$ en tono más oscuro. Gráfico de barras realizado con el programa Web Gestalt.

Del conjunto de genes marcadores de melanoma encontramos diferencias estadísticamente significativas en PMEL, MLANA, TYR y SOX10 en la línea celular de melanoma G361 y a los transcritos de marcador de macrófagos (CD68) y EML1 en la línea A375 con una significación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) como se puede observar en la Figura 4.28.

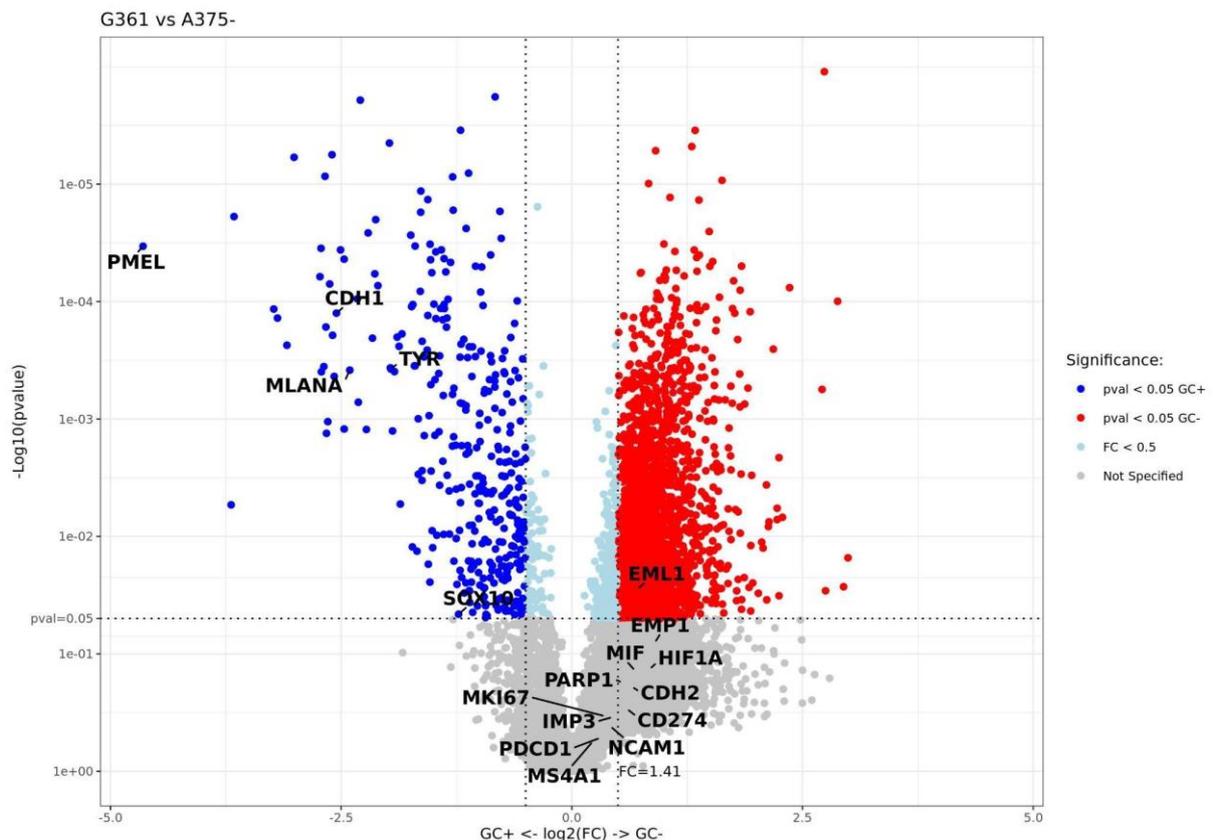


Figura 4.28: Gráfico de tipo volcán de las sondas específicas de melanoma en las línea A375 y G361 xenoinjertadas. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de “Fold change” (FC) a partir de los cuales se obtiene significación. [TYR (Tirosinasa), PMEL, Ki67 (MKI67), MART-1 (MLANA), MIF, EMP1, IMP3, SOX10, E-Cadherina (CDH1), N-Cadherina (CDH2), PARP1, HIF1 α , EML1]. T-test no pareado con corrección Benjamin Hochberg.

Encontramos también en la línea G361 mayor número de transcritos de CDH1 (E-Cadherina) de manera estadísticamente significativa, confirmando los resultados obtenidos por inmunohistoquímica (Tabla 4.4) (Fig. 4.29). Lo que puede estar en relación al conservarse la expresión de esta molécula de adhesión a la menor capacidad de diseminación que ha demostrado en nuestro modelo experimental en ratones ($p=0.00013$).

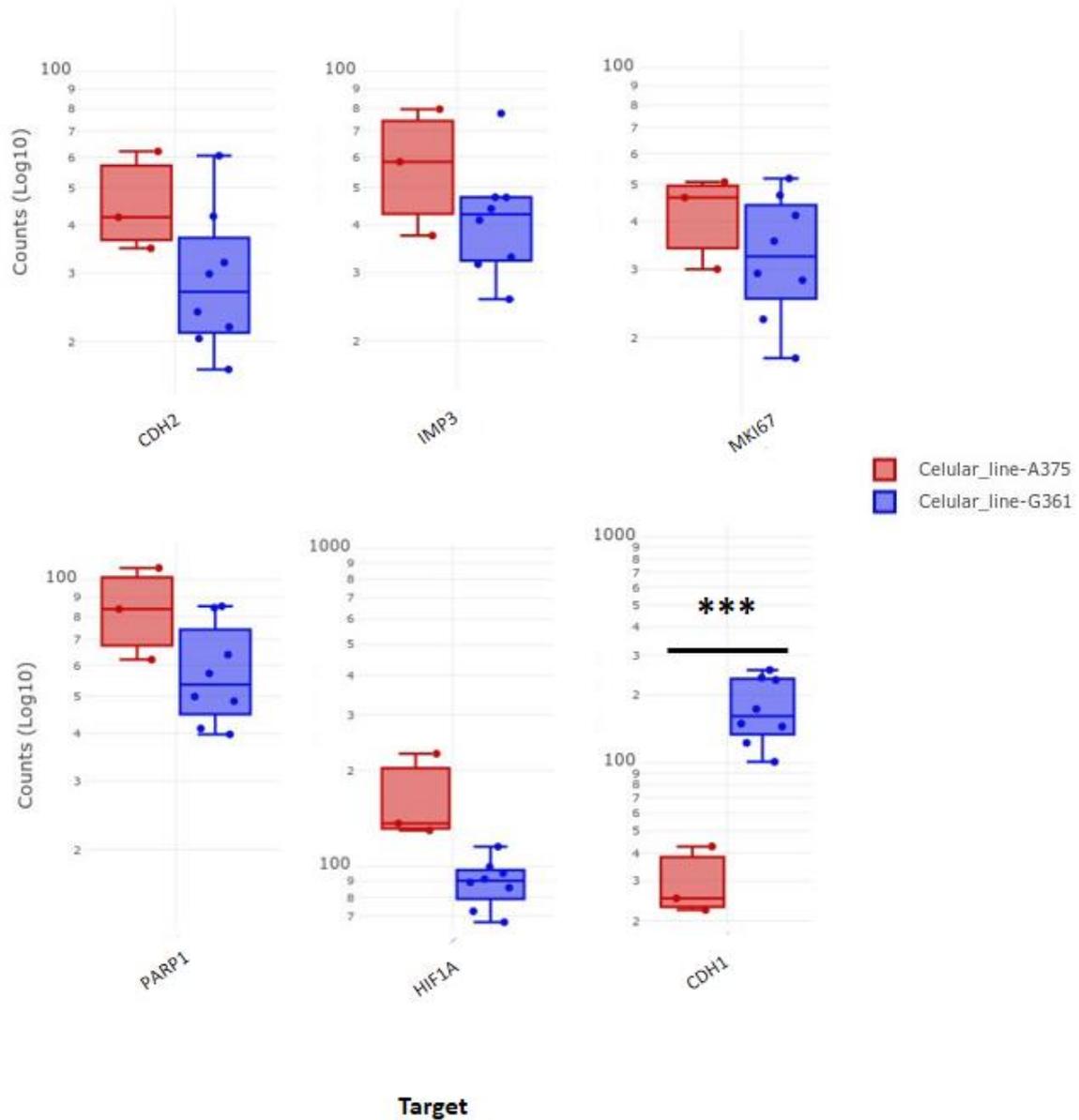


Figura 4.29: Diagrama de cajas de los anticuerpos estudiados mediante inmunohistoquímica. Media \pm SD. E-Cadherina (CDH1), N-Cadherina (CDH2), Ki67 (MKI67). *t*-test no pareado con corrección Benjamin Hochberg. La significación se indica con *valor de $p < 0.05$, ** valor de $p < 0.01$, * valor de $p < 0.001$.**

Encontramos una alta correlación con una $R^2 < 0.90$ entre los marcadores histogenéticos de melanocitos y marcadores candidatos con valor pronóstico Tirosina; Mart-1; Sox10; MIF; PMEL con E-Cadherina; EML1. IMP3 tuvo una correlación

significativa con una $R^2=0.916$ con MIF en ambas líneas de melanoma humano (Fig. 4.30).

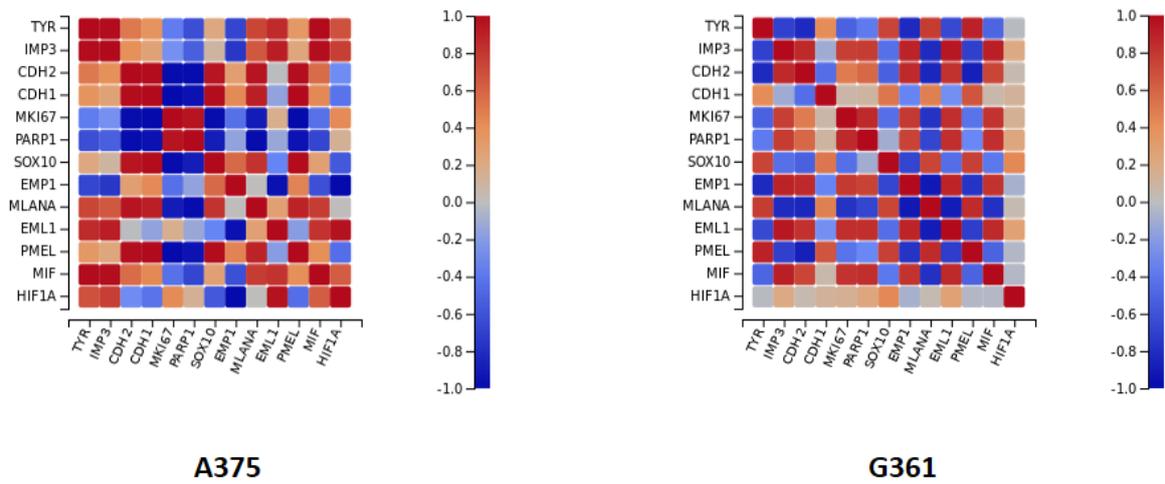


Figura 4.30: Gráfico de correlación de los marcadores de melanoma y de los anticuerpos estudiados mediante inmunohistoquímica en esta Tesis las líneas de melanoma humano A375 y G361. [TYR (Tirosinasa), PMEL, Ki67 (MKI67), MART-1 (MLANA), MIF, EMP1, IMP3, SOX10, E-Cadherina (CDH1), N-Cadherina (CDH2), PARP1, HIF1α, EML1].

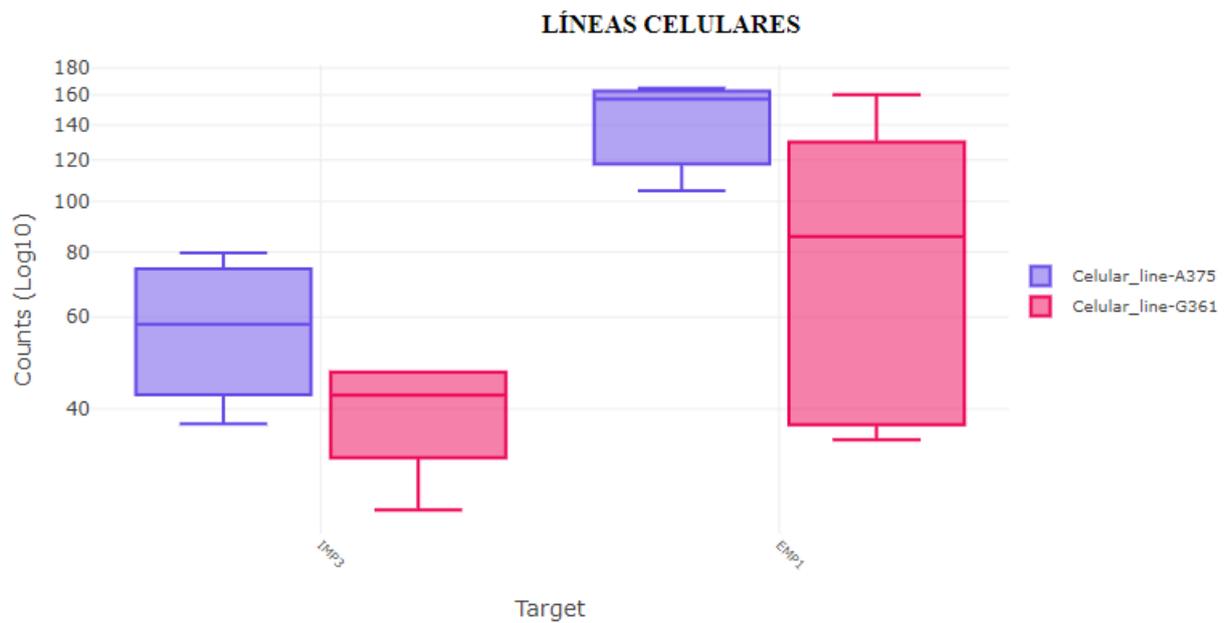


Figura 4.31: Diagrama de cajas de la expresión de transcritos de EMP1 e IMP3 en las dos líneas de melanoma xenoinjertadas. Nótese la regulación al alza en la línea A375 en comparación con la G361, de la expresión de ambos transcritos.

Se aprecia una mayor expresión de EMP1 que de IMP3 y una media superior en la línea celular de melanoma xenoinjertada A375 lo que se encuentra en relación con su mayor capacidad proliferativa y capacidad metastásica en nuestras condiciones de ensayo (Fig. 4.31).

Del conjunto de genes que constituyen la prueba 31-GEP han resultado estadísticamente significativos en la línea A375 frente a G361: RBM23, ROBO1, AQP1, SAP130 y LTA4H como se puede observar en la Tabla 4.10 y en la Figura 4.32.

Tabla 4.10: Genes del conjunto 31-GEP sobreexpresados en la línea A375 frente a G361.

Variables	Log 2	Valor de p*
RBM23	0.99	0.011
ROBO1	0.48	0.023
AQP1	0.86	0.015
SAP130	0.41	0.011
LTA4H	1.15	0.016

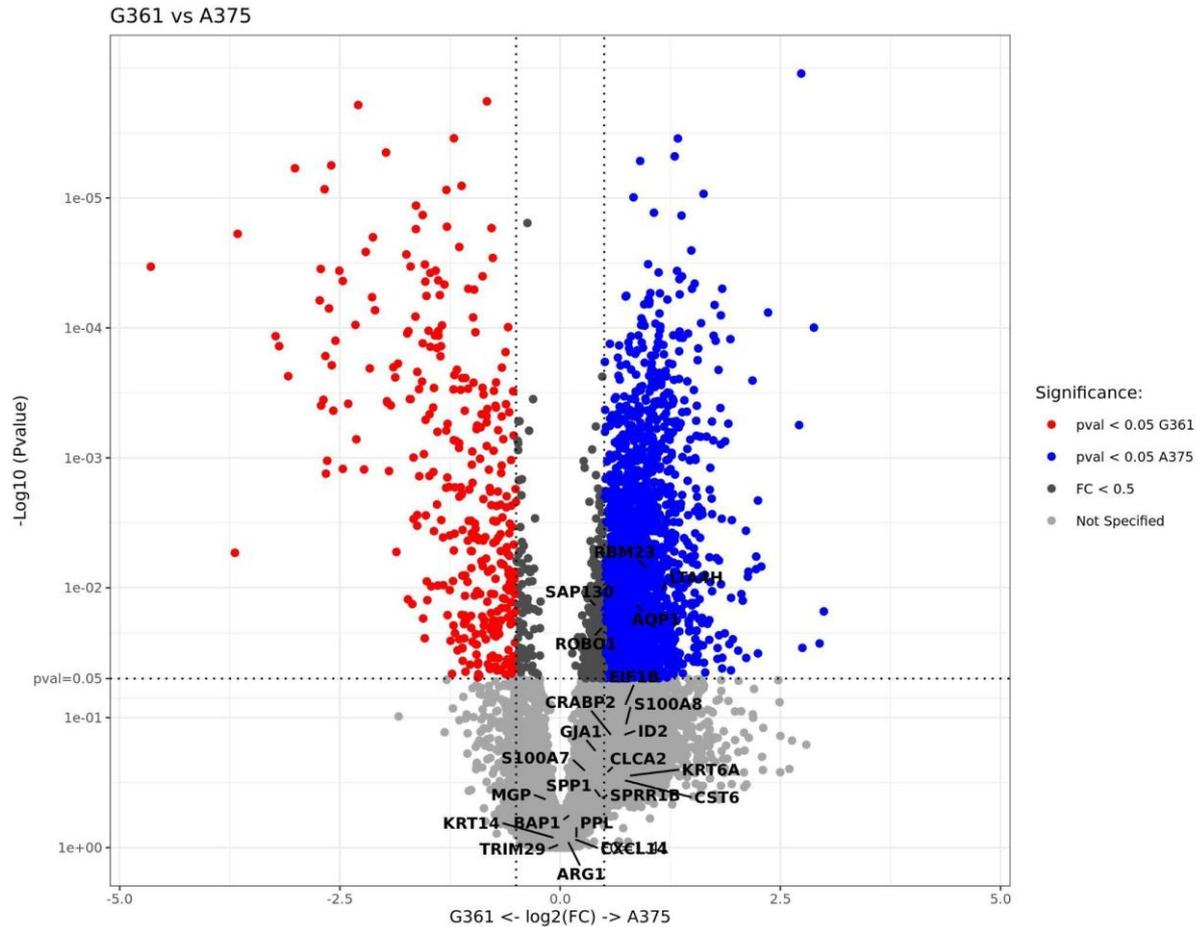


Figura 4.32: Gráfico de tipo volcán de las sondas específicas del grupo testado en la prueba 31-GEP en las líneas A375 y G631 xenoinjertadas. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de “Fold change” (FC) a partir de los cuales se obtiene significación. *T-test* no pareado con corrección Benjamin Hochberg.

En nuestro estudio observamos que los marcadores propuestos del llamado conjunto 31-GEP muestran una gran correlación entre ellos como se puede apreciar en la Figura 4.33 entre ambas líneas. Con una $R^2 > 0.85$ en los marcadores ID2/S100A7; ID2/S100A7; AQP1/GJA1; PPL/LTA4H; ID2/GJA1; LTA4H/AQP1 y CRABP2/CST6 en la línea G361. En la línea A375 encontramos una mayor correlación para diferentes marcadores con una $R^2 > 0.95$ en SPRR1B/ID2; S100A8/MGP; GJA1/BAP1; ID2/CST6; S100A7/ROBO1; CLCA2/CXCL14 y SPP1/CXCL14.

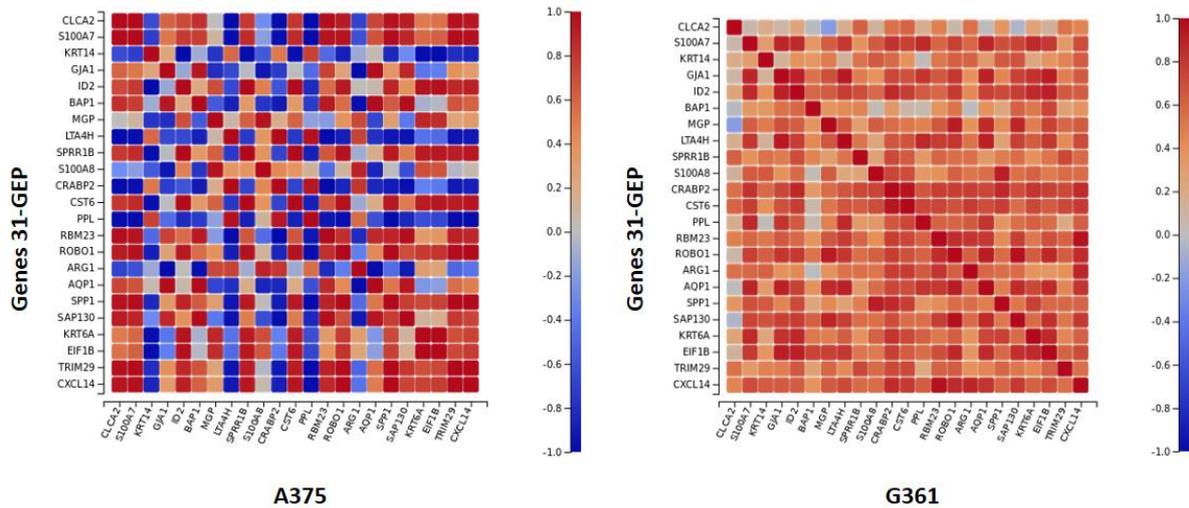


Figura 4.33: Representación gráfica de las correlaciones del grupo de genes que se detectan con la prueba 31-GEP en ambas líneas de melanoma.

4.4.5.2 Efecto de los diferentes tratamientos en la línea celular de melanoma A375 xenoinjertada.

Los diferentes tratamientos aplicados modifican el perfil transcriptómico en los melanomas inducidos por la línea A375 como se puede observar en la Figura 4.34 que representa el mapa de calor, de manera similar a los marcadores de melanoma estudiados en esta Tesis Doctoral (Fig. 4.35). Un total de 2223 sondas permiten separar a los cuatro grupos experimentales en el *heatmap*.

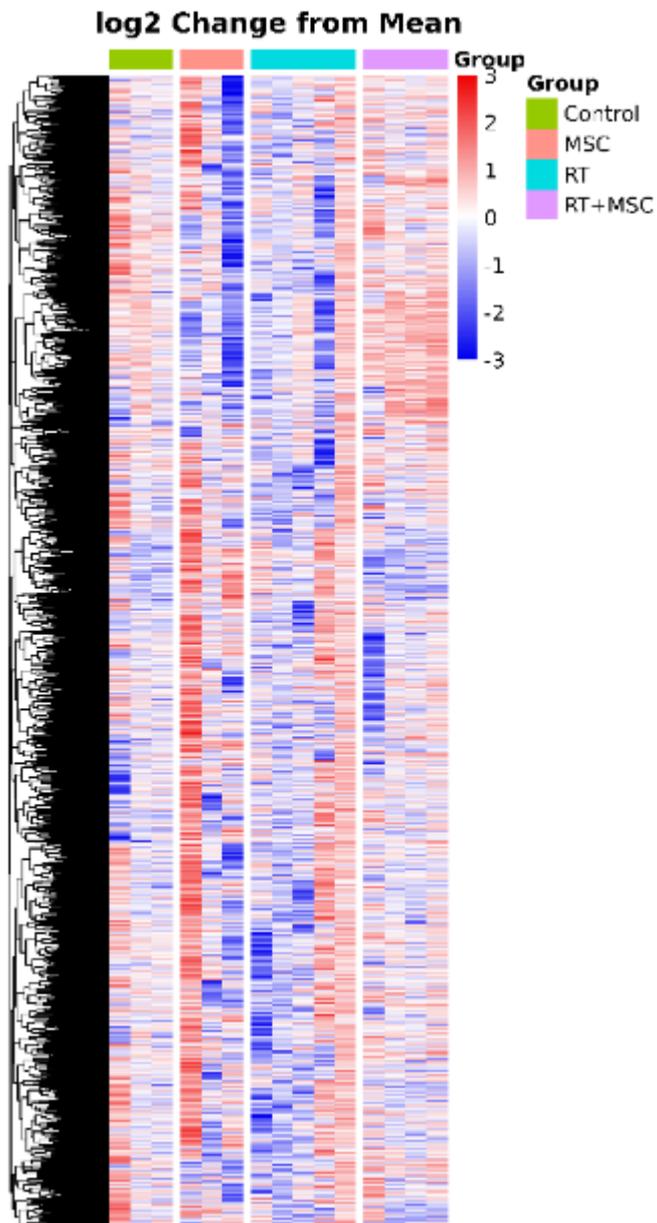


Figura 4.34: *Heatmap* supervisado de la expresión de transcritos que permiten diferenciar entre los tumores melánicos inducidos por la línea A375 en los diferentes grupos de estudio.

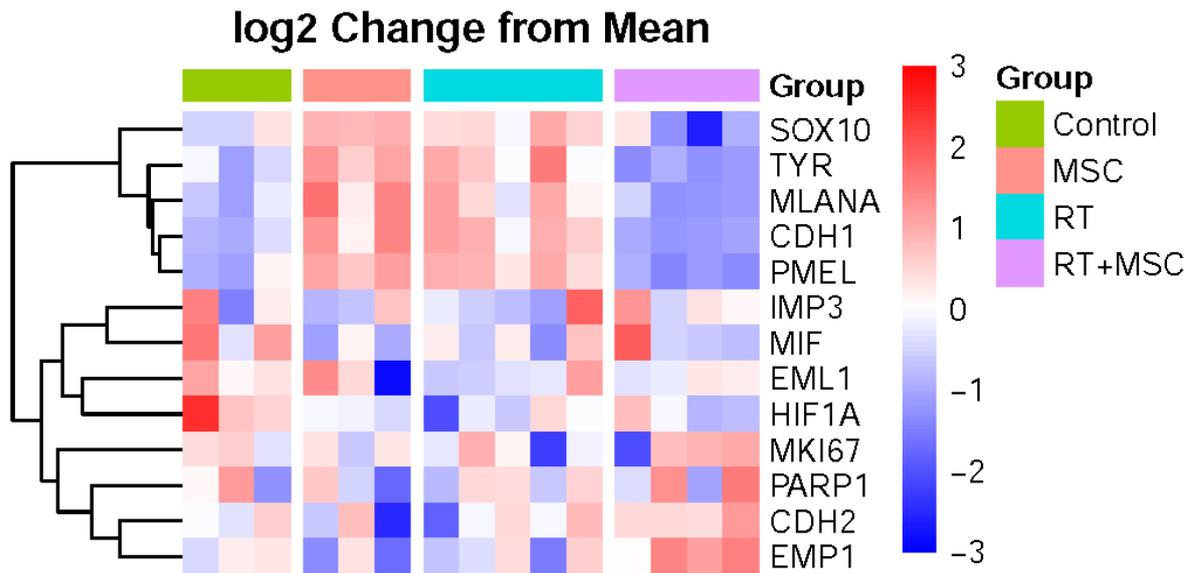


Figura 4.35: *Heatmap* supervisado seleccionando los transcritos que fueron estudiados mediante anticuerpos por inmunohistoquímica en la línea de melanoma xenoinjertada A375 incluyendo los diferentes tratamientos. [TYR (Tirosinasa), PMEL, Ki67 (MKI67), MART-1 (MLANA), MIF, EMP1, IMP3, SOX10, E-Cadherina (CDH1), N-Cadherina (CDH2), PARP1, HIF1 α , EML1].

4.4.5.2.1 Comparación RT+MSC vs Control en la línea celular de melanoma A375 xenoinjertada

El grupo Control comparado con el grupo tratado con RT+MSC muestra en la línea A375 una sobreexpresión de 195 sondas con significación estadística ($p < 0.05$) de los cuales 66 tienen una significación de $p < 0.01$ (Tabla 4.11).

Tabla 4.11: Genes sobreexpresados en el grupo Control en la línea A375 de manera estadísticamente significativa

CMYA5	NR0B1	NFKBIE	YPEL4	CAPN3	NMNAT3	LINGO2
GPR27	SLC2A12	CYLC2	GPR12	ZNF404	HACD1	TLCD4
OR4D2	ZNF235	STAP1	TMEM89	FAM200A	NMU	CCDC152
DYNC2I1	CPNE6	SMYD1	SLC35G6	CSF3	SLAMF6	APOL6
CELA1	MRNIP	CASTOR3	RASSF4	ZNF549	SCCPDH	DCST1

ZFP42	IGSF8	LTK	C1orf35	CCK	LARP6	PPP1R3A
MYOZ1	RAD51AP2	DUXA	BCL3	ADAM29	TXLNB	PHF20
AMER1	CHRD	ALG9	OR2C1	ARHGAP15	LCE6A	TEX51
ATP6V1B2	EEF1AKMT3	CD2AP	OR4N5	ROCK1	HRC	ZNF597
HEMK1	TTBK2	MTMR14				

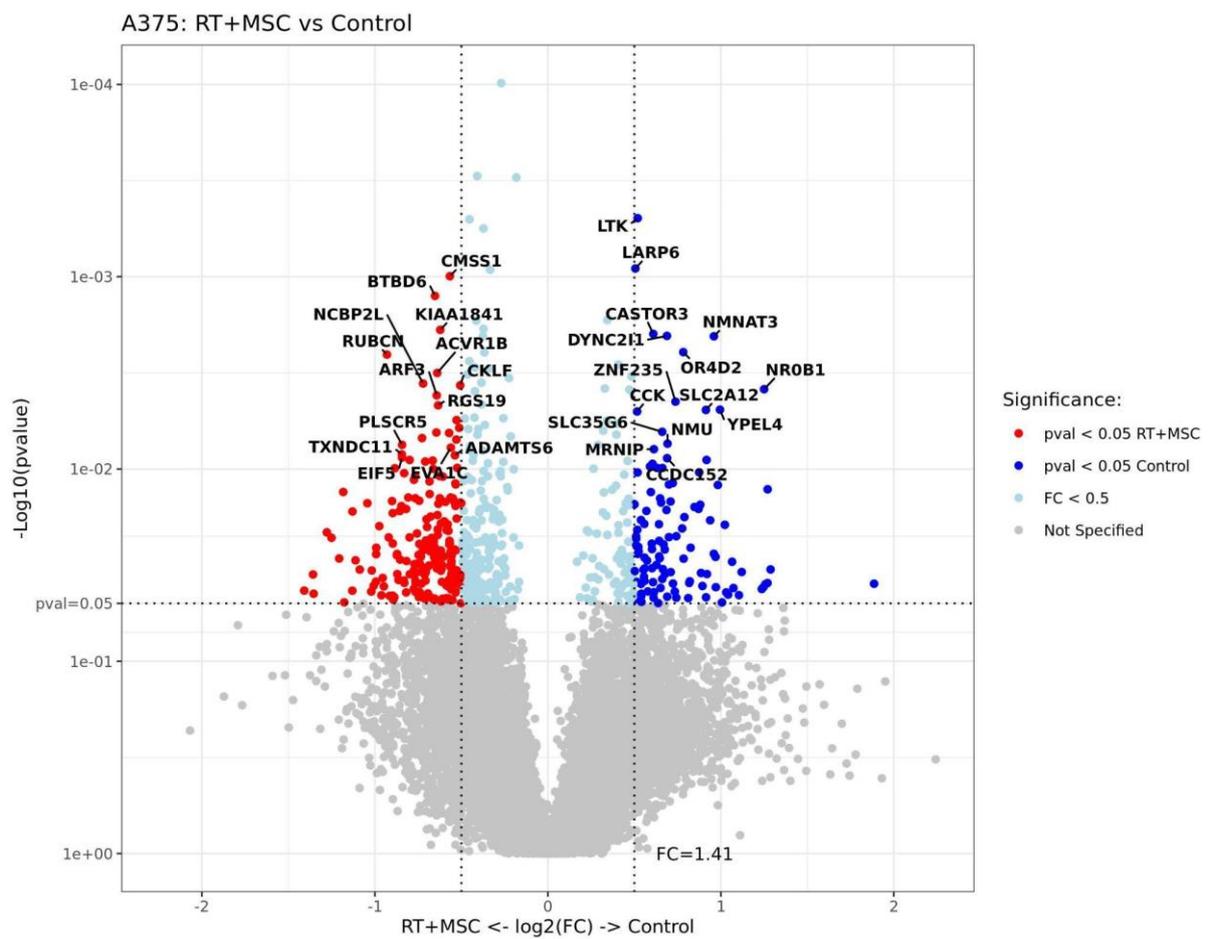


Figura 4.36: Gráfico de tipo volcán de los genes de la línea A375 xenoinjertada comparando el Control con el grupo tratado RT+MSC. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC a partir de los cuales se obtiene significación. Un total de 603 sondas cumplen este criterio. T-test no pareado con corrección Benjamin Hochberg.

Se observan 408 genes sobreexpresados con significación estadística en el grupo RT+MSC con respecto al Control ($p < 0.05$), de los cuales 133 tienen un nivel de probabilidad más alto ($p < 0.01$) (Fig. 4.36; Tabla 4.12).

Tabla 4.12: De los genes sobreexpresados en grupo RT+MSC de la línea A375

JSRP1	OR5H2	POU4F3	COA7	RUBCN	CD82	OAF
ITGB6	GABRG2	PIGW	TXNDC11	EIF5	PLSCR5	CLMP
TCP11X2	SLC25A38	TSPAN16	ENTR1	NUP210L	LSM4	CERCAM
ACER3	NCBP2L	STYK1	FGR	XYLB	OSCAR	POLR2K
HCN1	ZDHHC16	BTBD6	MCHR1	ARF3	ACVR1B	SFXN4
RGS19	PTPA	TMEM30A	MANBAL	KIAA1841	UBE3C	DCAF12
VTI1A	RABEPK	TWSG1	SNRPA1	CMSS1	CYCS	EVA1C
TBCB	RPP14	ADAMTS6	FAM110A	MAST2	PSMB2	PRDX1
STAB1	UBAP2	CIB1	TFDP3	DCUN1D5	ECSIT	CKLF
DDX19A	TEPSIN	CASP8AP2	FUZ	HS6ST2	ACOT7	ZDHHC3
GALNT2	JAGN1	SBDS	COX11	EIF5A	CEP295	CCDC137
PDE3B	SLC4A2	CAP1	IKZF5	KHDC3L	MNS1	LARP4
NME1	FMNL3	POU2AF1	TRAPPC5	ATP5MC2	SRPRB	ATP5IF1
KLHL42	HIRA	UPF3A	SLMAP	BANF1	UQCRQ	RSAD1
LRCH1	RPS28	NABP2	NDUFA4	ZNF121	ARMC8	FBXW5
PRDX5	YIF1A	VEGFC	MTG2	HINT3	RPL30	ASNSD1
TOMM22	TMEM170A	DOCK4	RASGEF1A	MCM5	FBXO7	SPEF1
PLEKHD1	NVL	COX17	MRPL55	SDHB	NGRN	DPP9

CALR	ZBTB34	KIAA1143	SPATA6	NOL10	TMED3	TMEM219
------	--------	----------	--------	-------	-------	---------

En el análisis de enriquecimiento de las vías encontramos seis rutas reguladas a la baja en el grupo RT+MSC en la línea A375 comparándolo con el grupo Control con una FDR <0.05 como se puede observar en la Figura 4.37. La vía de la glicólisis y la gluconeogénesis. El aumento de la glucólisis es un *hallmark* de las células neoplásicas (391). Además, algunas vías asociadas al cáncer, incluida la señalización de PPAR, la glicólisis/gluconeogénesis, la señalización de MAPK, la señalización de VEGF y la señalización de calcio, se asocian con una mayor respuesta de inmunoterapia en el melanoma.

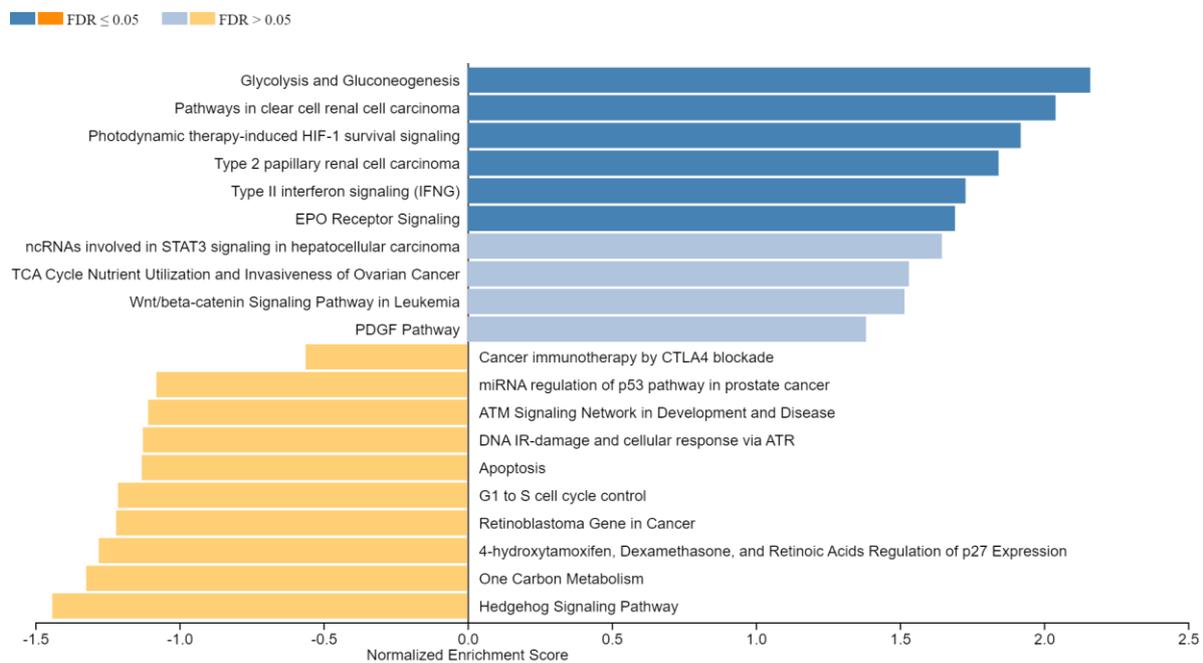


Figura 4.37: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes de DEG entre muestras del grupo RT+MSC (naranja) y el grupo Control (azul). Ordenadas según la tasa de descubrimiento falso (FDR), en el que se muestran las vías con un FDR <0.05 en tono más oscuro. Wikipahtway Cancer.

4.4.5.2.2 Comparación RT vs Control en la línea celular de melanoma A375 xenoinjertada

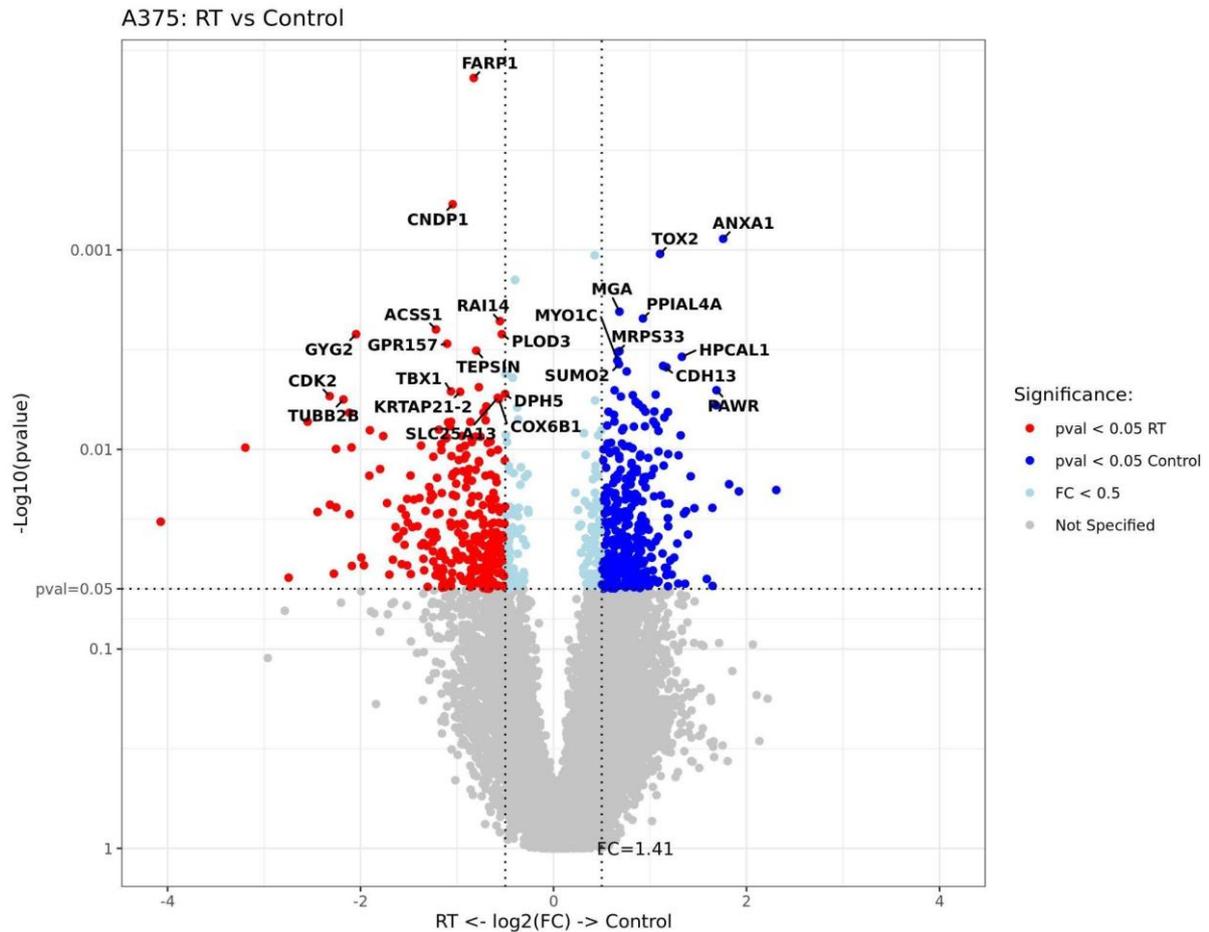


Figura 4.38. Gráfico de tipo Volcán de los genes de la línea A375 xenoinjertada comparando el grupo Control con el tratado con RT. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC a partir de los cuales se obtiene significación. Un total de 774 sondas cumplen este criterio. T-test no pareado con corrección Benjamin Hochberg.

Encontramos 425 genes sobreexpresados en Control con una $p < 0.05$ y 167 de ellos con $p < 0.01$ de ellos TRBC1 se expresa con Log_2 mayor a 2. Se considera que el receptor de células T constante beta 1 (TRBC1) ubicado en la membrana plasmática, forma parte del complejo de inmunoglobulinas circulantes y se expresa con Log_2 mayor a 2 (Fig. 4.38). Se considera que TRBC1 participa en varios procesos, incluida la activación de la respuesta inmune; respuesta de defensa a otro organismo; y fagocitosis. Por otro lado 349 genes son sobreexpresados en RT con un probabilidad

($p < 0.05$), de los cuales 117 tienen un valor de $p < 0.01$ y un $\text{Log}_2 > 2$ en 16 de ellos (Tabla 4.13).

Tabla 4.13: De los genes sobreexpresados en el grupo RT de la línea A375

HES2	TUBB2B	QPCT	S100B	OLFM1	CTAG2	CDH1
RCN3	S100A1	CRYAB	TYRP1	ADGRG1	GYG2	PMEL
CDK2	MBP					

En el grupo RT tiene regulada a la baja con un $\text{FDR} < 0.05$ solamente las rutas de señal de supervivencia inducida por HIF-1 y glicólisis y gluconeogénesis, ambas rutas implicadas en la proliferación celular (Fig. 4.39).

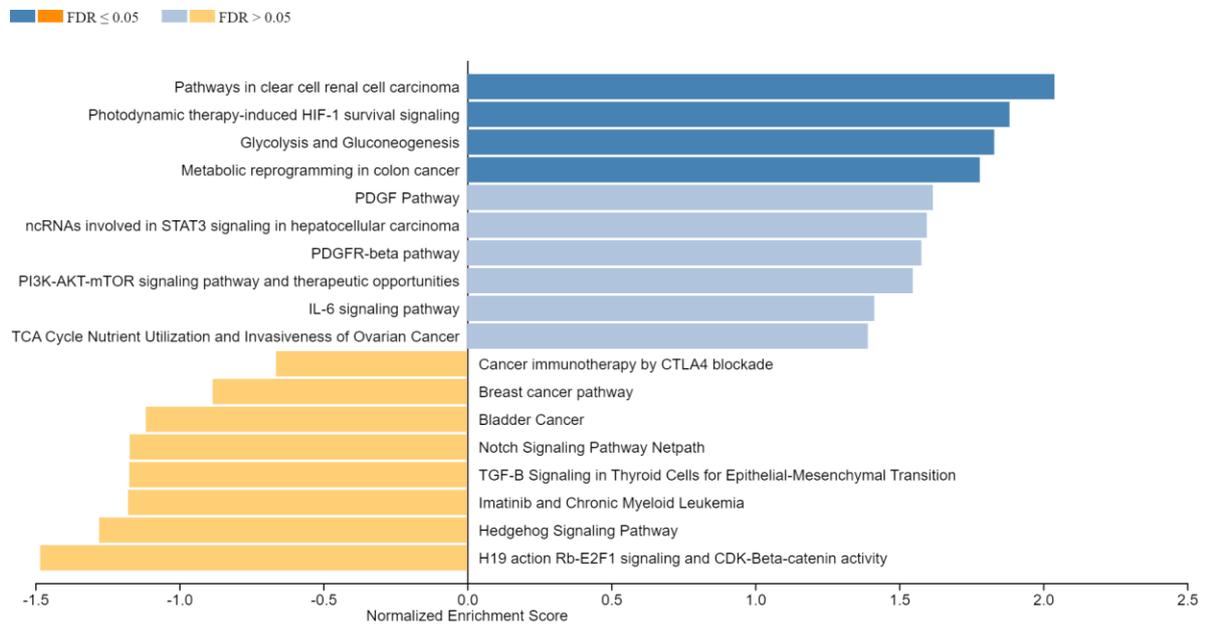


Figura 4.39: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes del grupo RT (naranja) y el grupo Control (azul). Ordenadas según la tasa de descubrimiento falso (FDR), en el que se muestran las vías con un $\text{FDR} < 0.05$ en tonalidad más oscura. Wikipathway Cancer.

4.4.5.2.3 Comparación MSC vs Control en la línea celular de melanoma A375 xenoinjertada

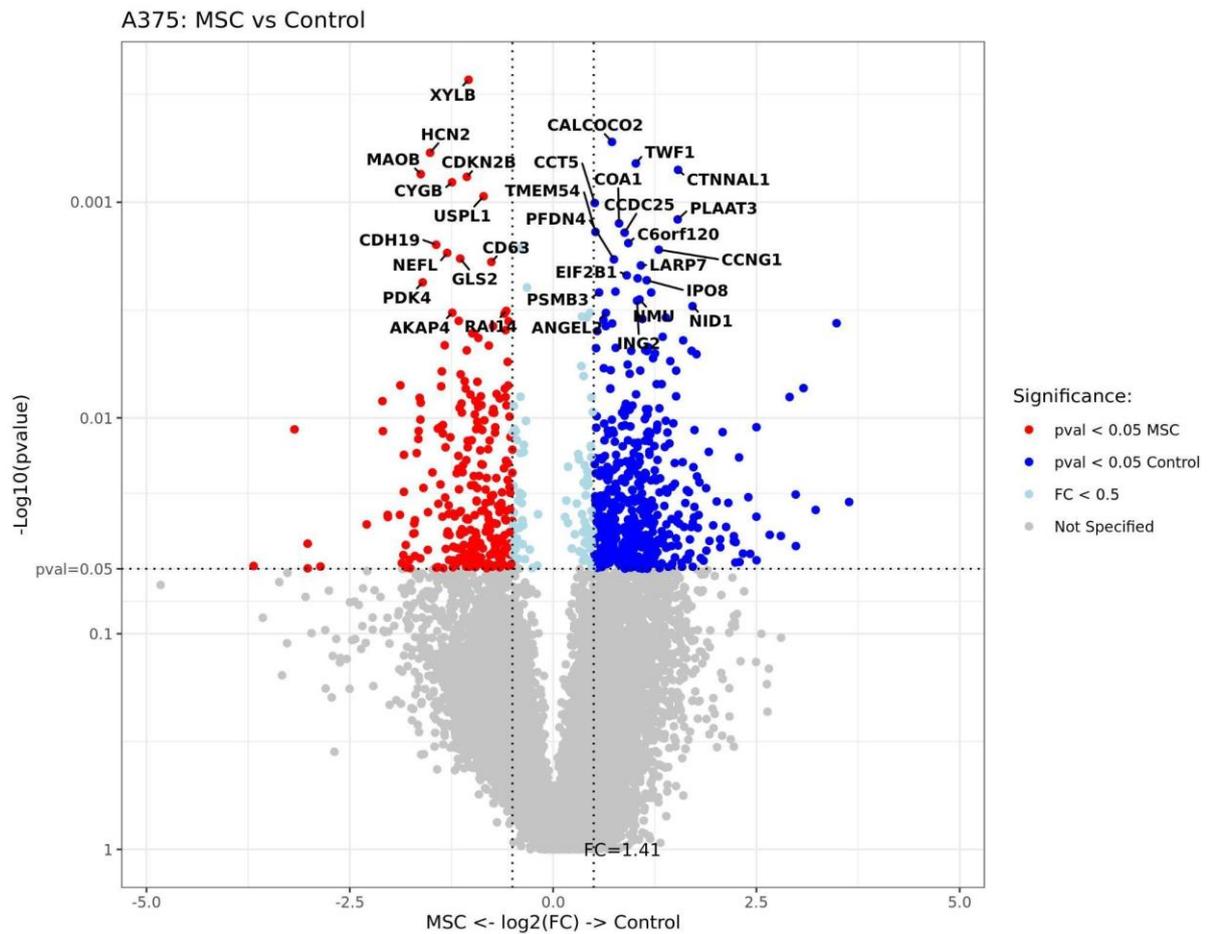


Figura 4.40: Gráfico tipo volcán de los genes de la línea A375 xenoinjertada comparando el grupo Control con el tratado con MSC. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de “fold change” (FC) a partir de los cuales se obtiene significación. Un total de 846 sondas cumplen este criterio. T-test no pareado con corrección Benjamin Hochberg.

Los melanomas xenoinjertados en el grupo Control presentan 545 genes sobreexpresados de forma estadísticamente significativa (Fig. 4.40) con respecto al grupo tratado exclusivamente con MSC ($p < 0.05$) de los cuales 176 genes tienen una probabilidad $p < 0.01$ y un “fold change” > 2 en 18 de ellos (Tabla 4.14).

Tabla 4.14: Genes sobreexpresados en el grupo Control de la línea A375

IFITM3	ANXA1	XAGE1A	CFL1	NDUFB11	BLID	MAGEA10
CAV1	KRT80	RPL24	MAGEA4	ANPEP	CT45A1	ID1
KRT18	GTSF1	PAGE5	PMAIP1	PCOLCE	S100A4	EPHA2
LAMA5	NT5E	TRBC1	PAGE2B	HMGA1	BGN	

Y en el grupo MSC encontramos 301 genes sobreexpresados de manera estadísticamente significativa comparados con el grupo Control ($p < 0.05$) de los cuales 113 presentan una $p < 0.01$ y un “fold change” > 2 , 10 de ellos (Tabla 4.15).

Tabla 4.15: Genes sobreexpresados en el grupo MSC de la línea A375

BACE2	S100A1	HES6	TNFRSF19	PPARGC1A	IGSF3	MAPK4
MIA	CDK2	MBP				

El tratamiento con células MSC no modifica al alza ni a la baja ninguna ruta metabólica de manera estadísticamente significativa ($FDR > 0.05$) (Fig. 4.41).

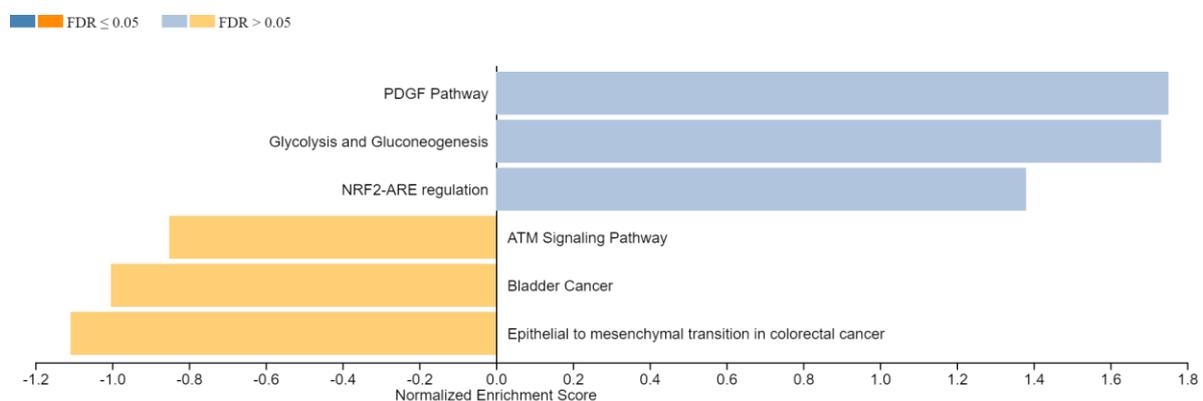


Figura 4.41: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes de DEG entre muestras del grupo MSC (naranja) y el grupo Control (azul). Ordenadas según la tasa de descubrimiento falso (FDR), en el que se muestran las vías con un $FDR < 0.05$ en tonalidad más oscura. Wikipathway Cancer.

Se puede observar la reducción de IMP3 e HIF1 α respecto al grupo Control en el grupo RT+MSC sin llegar a ser significativo. Y una expresión de E-Cadherina (CDH1) del grupo RT sobre el grupo Control y sobre el grupo RT+MSC de manera estadísticamente significativa ($p=0.008$ y $p=0.009$, respectivamente). Entre el grupo Control y el grupo MSC no se observaron diferencias (Fig. 4.42).

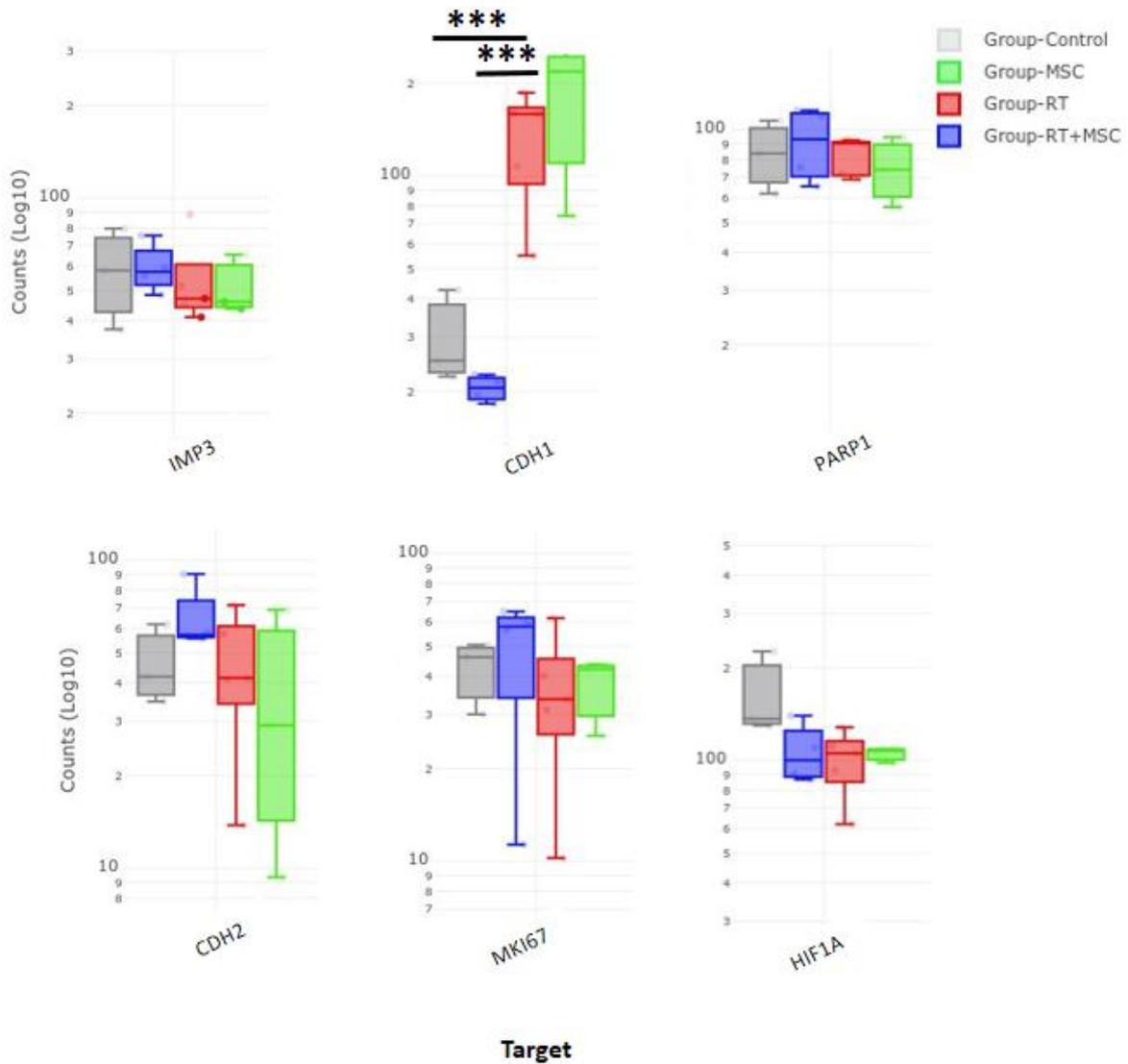


Figura 4.42: Diagramas de cajas seleccionando las moléculas estudiadas por inmunohistoquímica en este trabajo. Media \pm SD. *T-test* no pareado con corrección Benjamin Hochberg. La significación se indica con *valor de $p<0.05$, ** valor de $p<0.01$, * valor de $p<0.001$.**

Con respecto al comportamiento de los marcadores histogenéticos de melanocitos (Fig. 4.43) se puede observar que hay una expresión variable de los transcritos, encontrando una expresión incrementada de manera estadísticamente significativa con respecto al grupo Control de PMEL y MLANA en el grupo RT ($p=0.024$, $p=0.045$), de SOX10 en el grupo MSC ($p=0.027$), y diferencias entre grupos de tratamiento, PMEL, SOX10 y MLANA se sobreexpresan en el grupo RT versus el grupo RT+MSC ($p=0.019$, $p=0.025$, $p=0.029$, respectivamente). Y SOX10 y TYR están sobreexpresados en el grupo MSC comparándolo con RT+MSC ($p=0.005$, $p=0.047$, respectivamente).

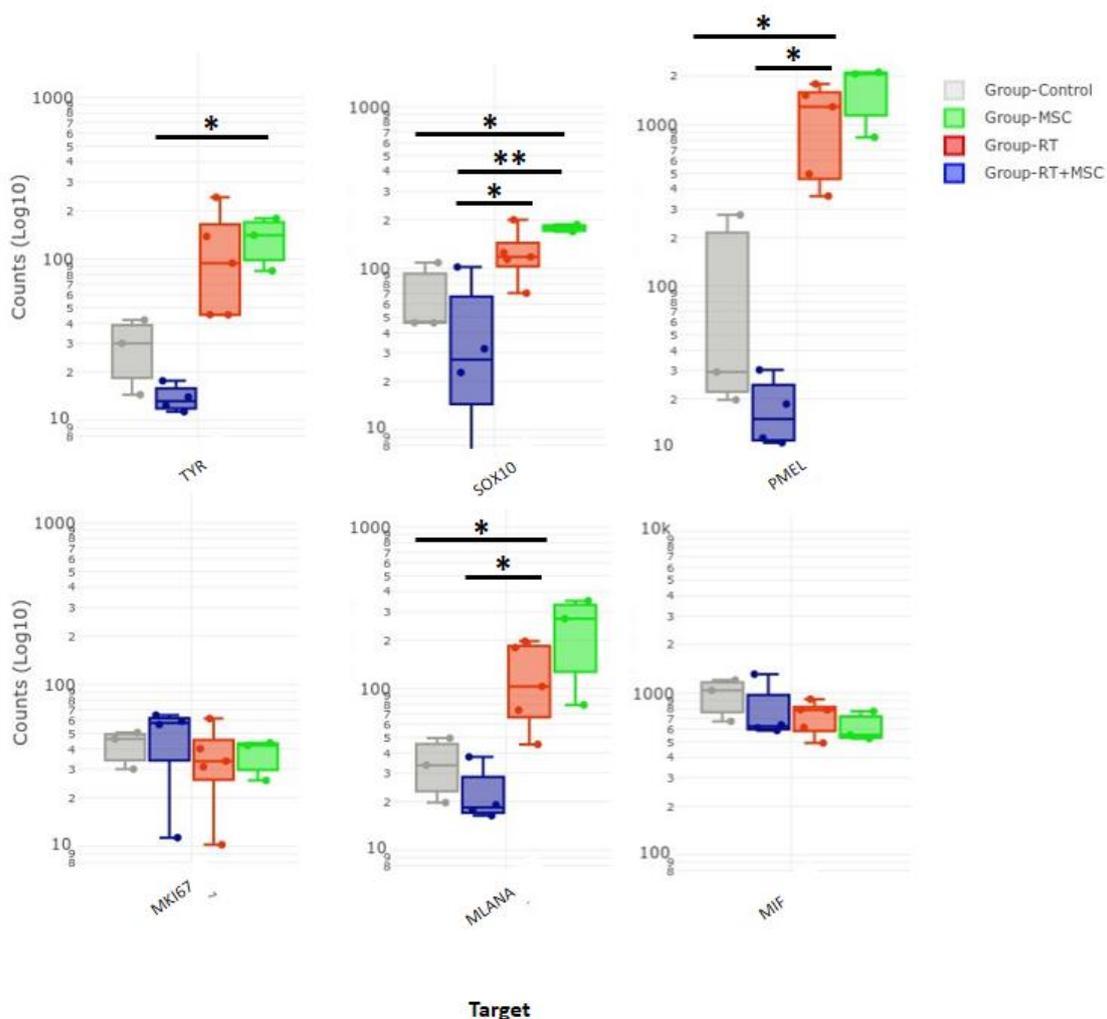


Figura 4.43: Gráfico de cajas de la expresión de los marcadores de melanoma en la línea A375 xenoinjertada en relación con el grupo de tratamiento. La significación se indica con *valor de $p<0.05$, ** valor de $p<0.01$, *** valor de $p<0.001$.

4.4.5.3 Efecto de los diferentes tratamientos en la línea celular de melanoma G361 xenoinjertada.

Los tratamientos inducen cambios evidenciables en los tumores xenoinjertados con la línea de melanoma G361 y que permiten separar todos los grupos mediante un *heatmap* supervisado (Fig. 4.44) y a los marcadores de melanoma estudiados en esta Tesis Doctoral (Fig. 4.45).

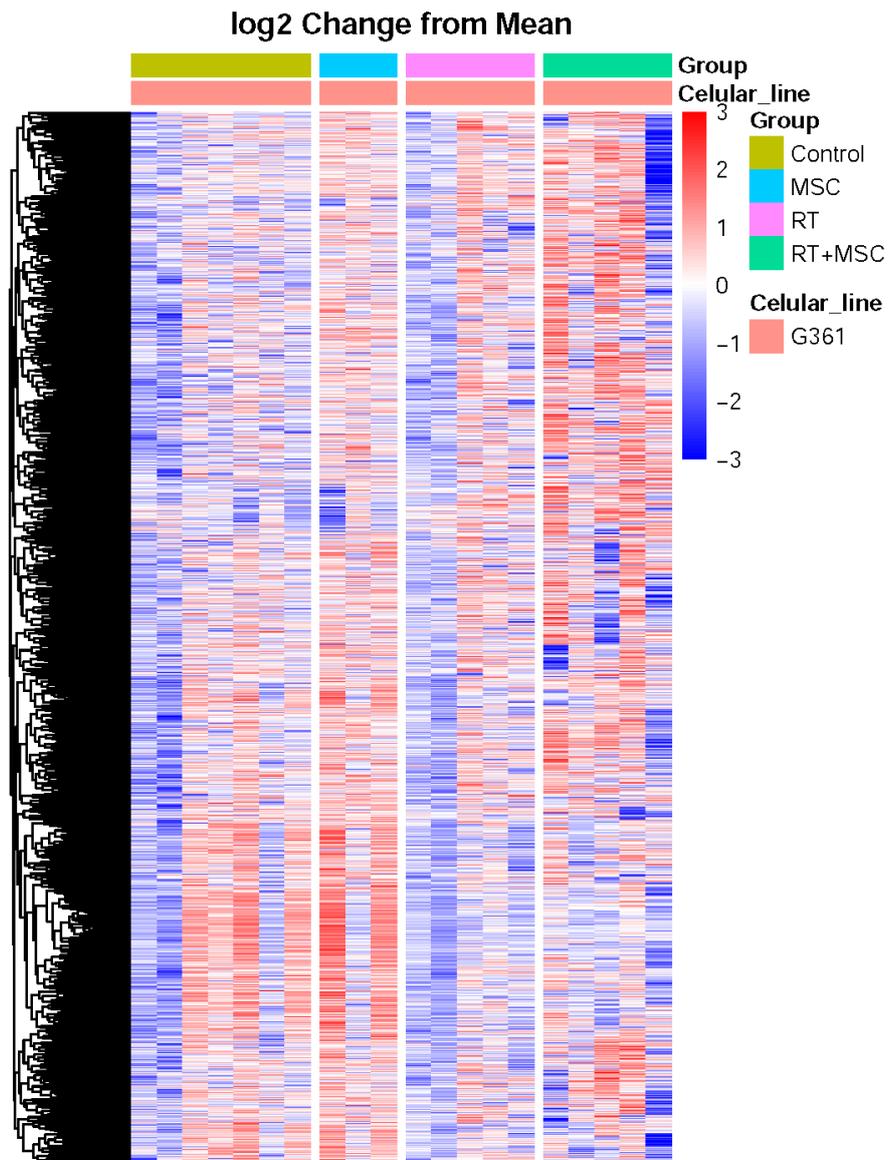


Figura 4.44: *Heatmap* supervisado de la expresión de transcritos ordenados por grupos de tratamiento en la línea G361 xenoinjertada.

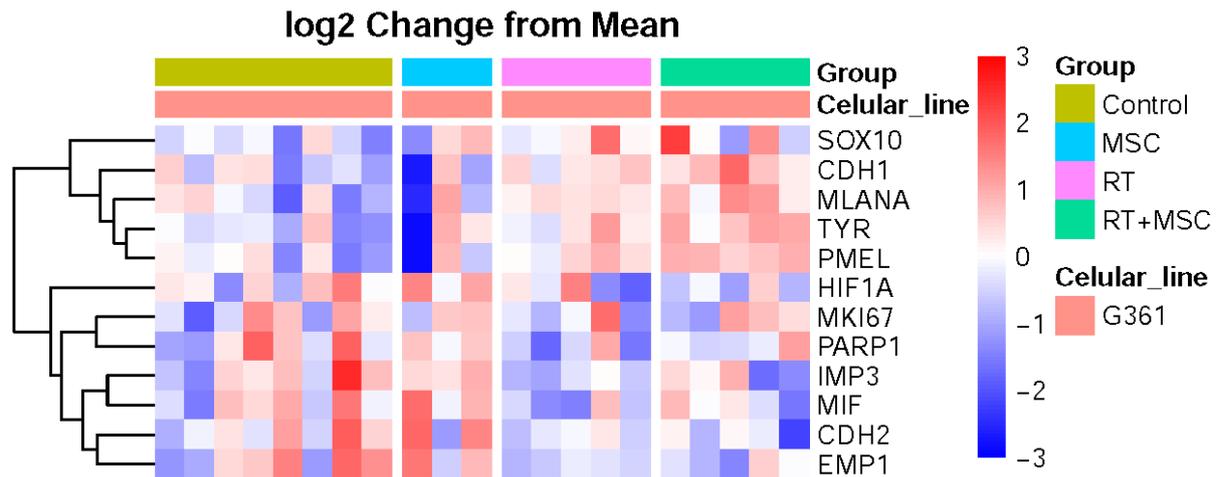


Figura 4.45: Heatmap supervisado de la expresión de transcritos ordenados por grupos de tratamiento en la línea G361 xenoinjertada. [TYR (Tirosinasa), PMEL, Ki67 (MKI67), MART-1 (MLANA), MIF, EMP1, IMP3, SOX10, E-Cadherina (CDH1), N-Cadherina (CDH2), PARP1, HIF1 α , EML1].

4.4.5.3.1 Comparación RT+MSC vs Control en la línea celular de melanoma G361 xenoinjertada

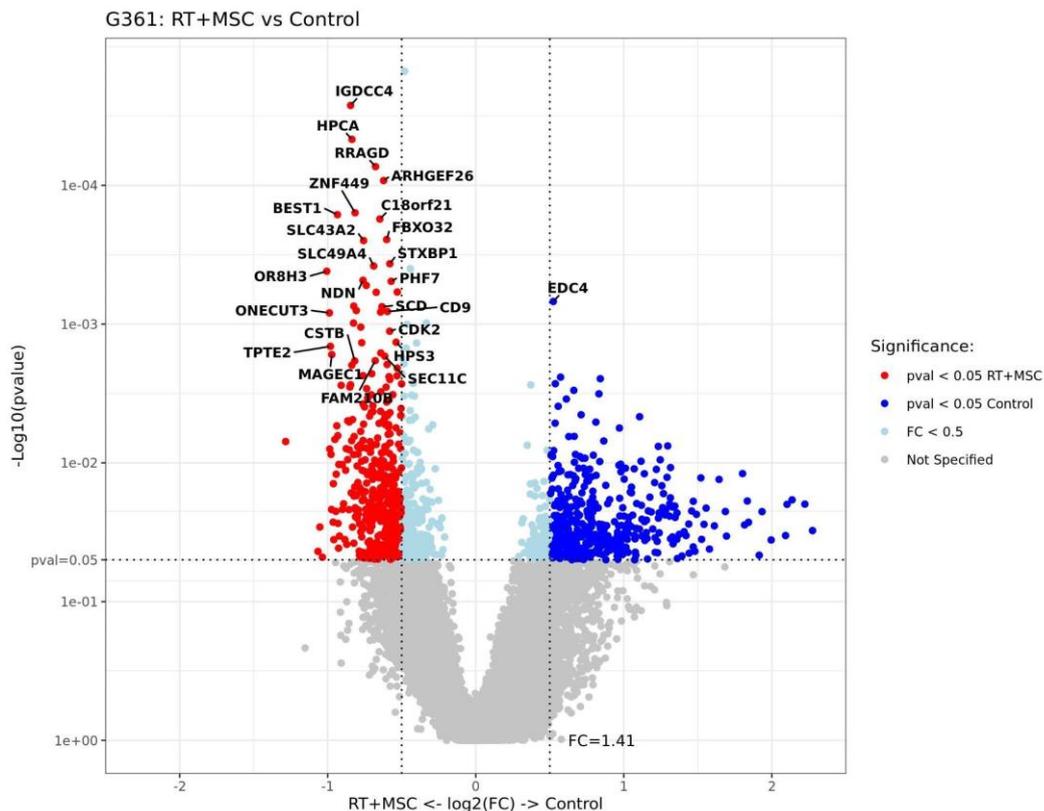


Figura 4.46: Gráfico de tipo volcán de los genes de la línea G361 xenoinjertada comparando el grupo Control con el tratado con RT+MSC. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de F

C a partir de los cuales se obtiene significación. Un total de 1172 sondas cumplen este criterio. T-test no pareado con corrección Benjamin Hochberg.

Al comparar el grupo RT+MSC vs. el grupo Control observamos que hay una sobreexpresión de 540 sondas en el grupo Control con un valor de $p < 0.05$ y 116 sondas con una $p < 0.01$ de los cuales 5 de ellos tiene un $\text{Log}_2(\text{FC})$ mayor a 2 (Tabla 4.16) (Fig. 4.46).

Tabla 4.16. Genes sobreexpresados en Control en la línea G361

IFITM3	CA9	IL11	CT45A1	H3C8
--------	-----	------	--------	------

La anhidrasa carbónica IX (CA9) es inducida por la hipoxia, funcionalmente está vinculada a la acidosis, implicada en la invasividad y correlacionada con la resistencia terapéutica. IFITM3 se expresa altamente en cánceres y es un marcador de mal pronóstico. CT45A1 actúa como un protooncogén para desencadenar tumorigénesis y metástasis en neoplasias. El tratamiento los reduce de manera estadísticamente significativa.

Y del grupo de RT+MSC tenemos 632 genes con una $p < 0.05$ y de ellos 286 con una probabilidad de $p < 0.01$ (Tabla 4.17).

Tabla 4.17: Genes sobreexpresados en RT+MSC de la línea G361

FNTB	OR8H3	ONECUT3	LRRTM3	TPTE2	WIPF3	MAGEC1
CYLC2	SLC15A5	PERM1	SEMA5A	BEST1	HTN1	DIPK1C
APOLD1	KRTAP17-1	CYP4F8	PRSS55	ANO4	ST6G	SLC26A3
MYH2	PARP15	NYAP2	IGDCC4	TFF3	ISLR	EDN2
ADGRA1	HPCA	NEK3	FSD2	ACSM1	DPPA4	MPP4
AHNAK2	CAPN3	CSTB	ZNF449	MAGEE2	SLC1A4	HERPUD1
AKR1C2	ALNAC2					

En el tratamiento con RT+MSC se encuentran sobreexpresadas las siguientes rutas destacadas: ruta metabólica de bloqueo de CTLA4 y PD-1, lo que facilitaría la acción de los fármacos inmunoterápicos. Asimismo, activa la vía de señalización ATM y ATR, pero también el metabolismo anaerobio y la angiogénesis, pero con unos valores de FDR >0.05 (Fig. 4.47).

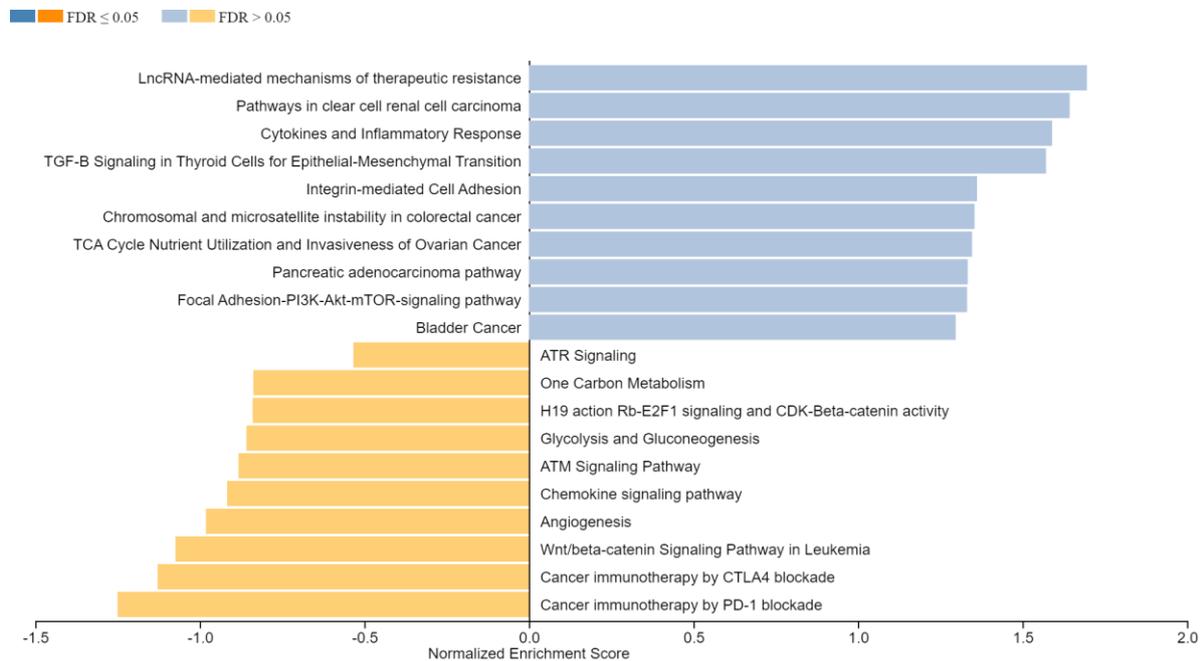


Figura 4.47: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes de DEG entre muestras del grupo RT+MSC (naranja) y el grupo Control (azul). Ordenadas según la tasa de descubrimiento falso (FDR), en el que se muestran las vías con un FDR <0.05 y FDR > 5 .

4.4.5.3.2 Comparación RT vs Control en la línea celular de melanoma G361 xenoinjertada

El tratamiento con radioterapia induce modificación en la expresión de ARN como se puede apreciar en el gráfico de tipo volcán en la línea de melanoma G361 xenoinjertada con modificación en numerosos transcritos (Fig. 4.48). En esta comparación encontramos 1354 genes sobreexpresados en el grupo Control vs. RT con una $p < 0.05$ y 243 genes con una $p < 0.01$ (Tabla 4.18).

Tabla 4.18: Genes sobreexpresados en el grupo Control de la línea G361

HMGA1	AJAP1	S100A2	TRMT112	TNFAIP2	NNMT	CALHM2
CCDC85B	PAGE5	BST2	SLC1A3	LDOC1	ZNF22	CFL1
KCNMA1	VAMP5	CDH13	PTPN14	COL27A1	NIBAN2	SNCG
WDR83OS	FHL1	DNMBP	NAA38	NSD2	GFPT2	LTBP2
NR2F2	ANTXR2	SH3BP2	PPP1R14B	PPA2	CYB561	AMOTL2
DCTD	NFIB	LIMD2	UBE2S	PIGO	F2RL1	CACNB3
SSRP1	TNFRSF10A					

En el grupo RT 109 genes están sobreexpresados en comparación al grupo Control con una $p < 0.05$, de los cuales 42 genes tienen una significación estadística de $p < 0.01$ (Tabla 4.19).

Tabla 4.19: Genes sobreexpresados en el grupo RT en la línea G361

PDK4	HES2	MAGEC1	TUBB4A	FBLN5	SGK1	TTYH2
BTN2A2	IGSF3	RNF19A	TMEM98	JAG1	DMXL1	RAB27A
HSPB8	OLFM1	ADGRG1	OGDHL	ST3GAL6	MAGEB2	TOLLIP
WIPF3	DNER	SPON2	FARP2	HCN2	SDC3	SEC11C
PRCD	ACSS1	PTGES	MAD1L1	PRAME	BACE2	CYSTM1
SMIM4	ACO2	TBC1D16	TRAM1	OTUD7B	ATM	OSTM1

Destacar los genes que codifican para factores de transcripción (HES2), genes que codifican para proteínas enzimáticas (TOLLIP); respuesta ante el estrés (SGK1); miembros de la familia de antígenos de melanoma (MAGEC1, MAGEB2); supresores de tumores que inhiben la migración y la invasión neoplásica (FBLN5); la proliferación

(TTYH2); o reguladores de la respuesta inmune como PRAME que facilita el reconocimiento de las células melánicas por los linfocitos T citotóxicos, etc.

La radiación induce una modificación importante en el transcriptoma de las células de melanoma G631 con 1465 sondas sobreexpresadas (Fig. 4.48). Y con una FDR >0.05 estimula las rutas metabólicas que se muestran en la Figura 4.49.

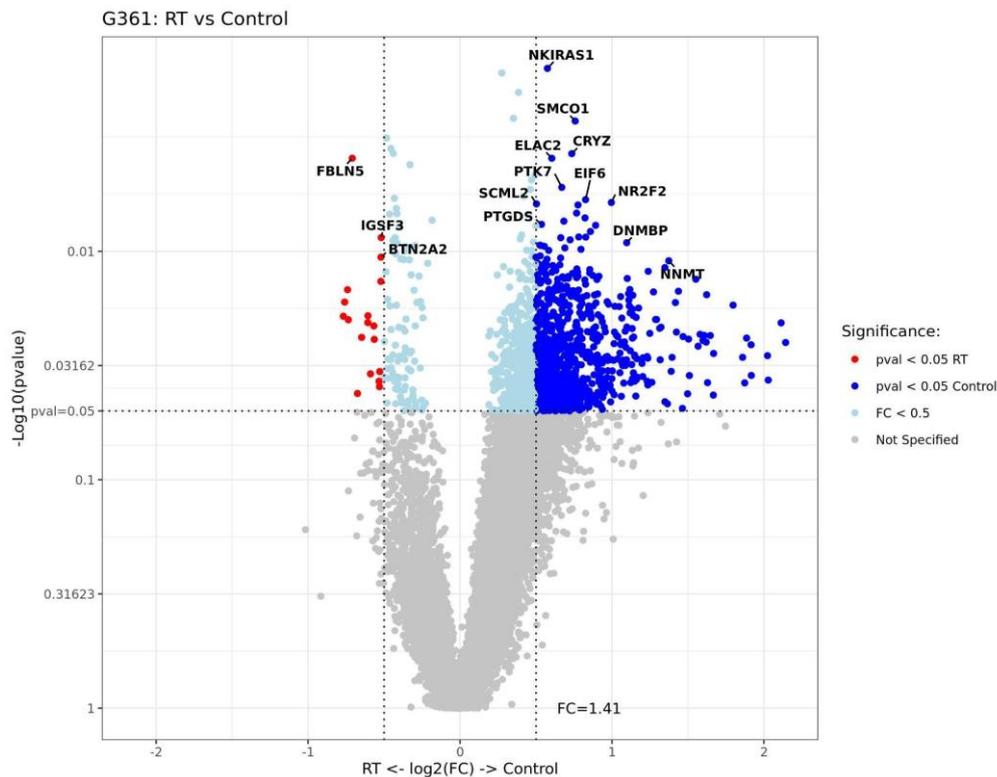


Figura 4.48: Gráfico de tipo volcán de los genes de la línea G361 xenoinjertada comparando el grupo Control con el tratado con RT. El eje "x" muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje "y" indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC "fold change" a partir de los cuales se obtiene significación. Un total de 1465 sondas cumplen este criterio. T-test no pareado con corrección Benjamin Hochberg.

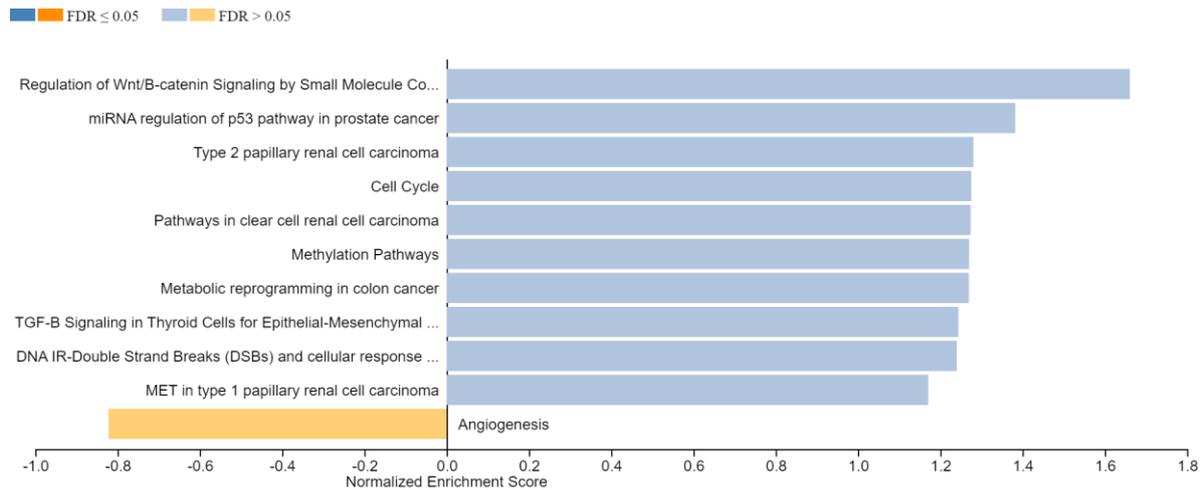


Figura 4.49: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes de DEG entre muestras del grupo RT (naranja) y el grupo Control (azul). Ordenadas según la tasa de descubrimiento falso (FDR), en el que se muestran las vías con un $FDR < 0.05$ en tonalidad más oscura y con un $FDR > 0.05$ la tonalidad más clara.

4.4.5.3.1 Comparación MSC vs Control en la línea celular de melanoma G361 xenoinjertada

El tratamiento con MSC induce modificación en la expresión de ARN como se puede apreciar en el gráfico tipo de tipo volcán (Fig. 4.50) en la línea de melanoma G361 xenoinjertada, pero en menor número de transcritos. En el grupo Control vs el grupo MSC 56 sondas tienen un valor de $p < 0.05$ y de ellos 15 un valor de $p < 0.01$ (Tabla 4.20).

Tabla 4.20: Genes sobreexpresados en Control en la línea G361

BOLA3	GTF3A	UXS1	IGFBP7	SLC41A2	ITM2B	ME2
APMAP	CFD	DMKN	GALNT18	GCLM	SPTA1	GUCY1A1
ARF4						

342 sondas aparecen como sobreexpresadas en el grupo MSC con una probabilidad ($p < 0.05$), de los cuales 114 tienen una mayor significación estadística ($p < 0.01$) (Tabla 4.21).

Tabla 4.21: Genes sobreexpresados en el grupo MSC de la línea G361

OR2L2	SMYD1	SLAMF6	USP17L12	LRRC72	SPEF1	CCDC182
GABRA2	GADL1	BSX	USP17L3	LHX3	ALOX12B	CD84
PRAMEF1	SOX15	SERPIND1	SLC26A8	SNCAIP	GRHL1	CALY
APOBEC3F	CYP8B1	PRSS48	PRR30	NME8	NECTIN4	RGSL1
TRIML1	CDCA2	ALDH1A2	APBA3			

Destacar la activación genética de la vía de autofagia (USP17L3, USP17L12, TRIML1) entre las modificaciones inducidas por las células MSC y la vía metabólica de apoptosis, metilación del ADN y la regulación inmunológica con un valor de FDR >0.05 (Fig. 4.51).

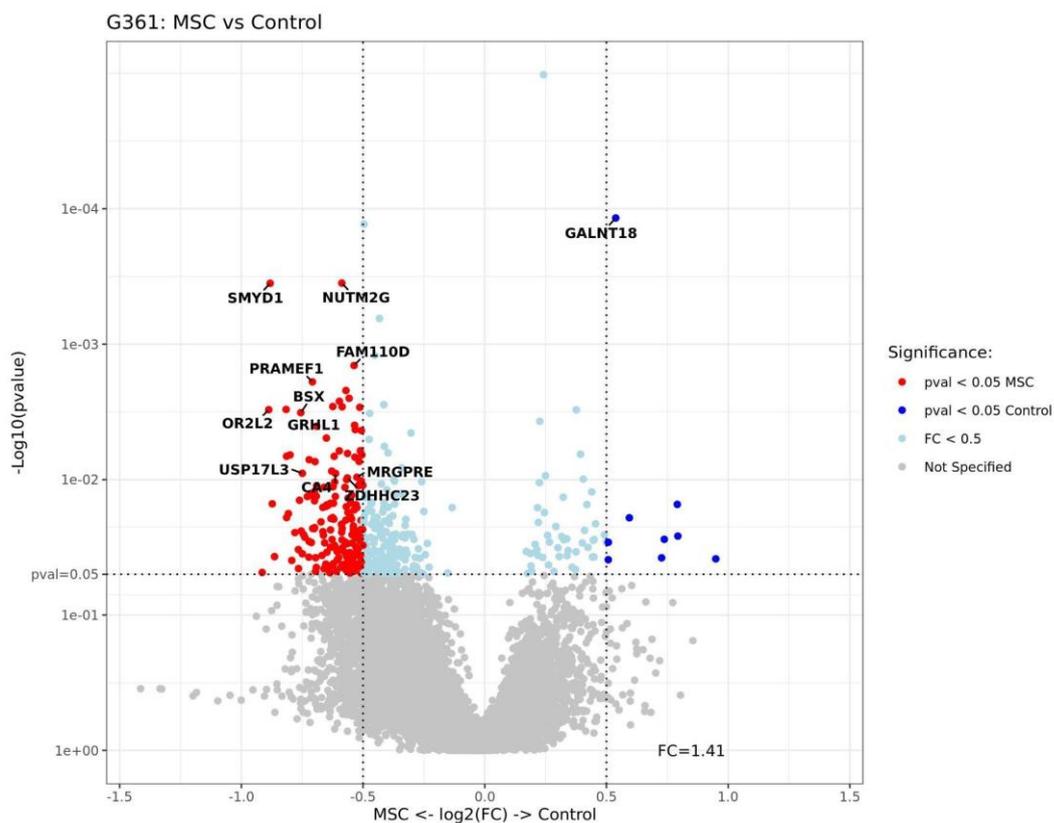


Figura 4.50: Gráfico de tipo volcán de los genes de la línea G361 xenoinjertada comparando el grupo Control con el tratado con MSC. El eje "x" muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica);

el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. Un total de 398 sondas cumplen este criterio. T-test no pareado con corrección Benjamin Hochberg.

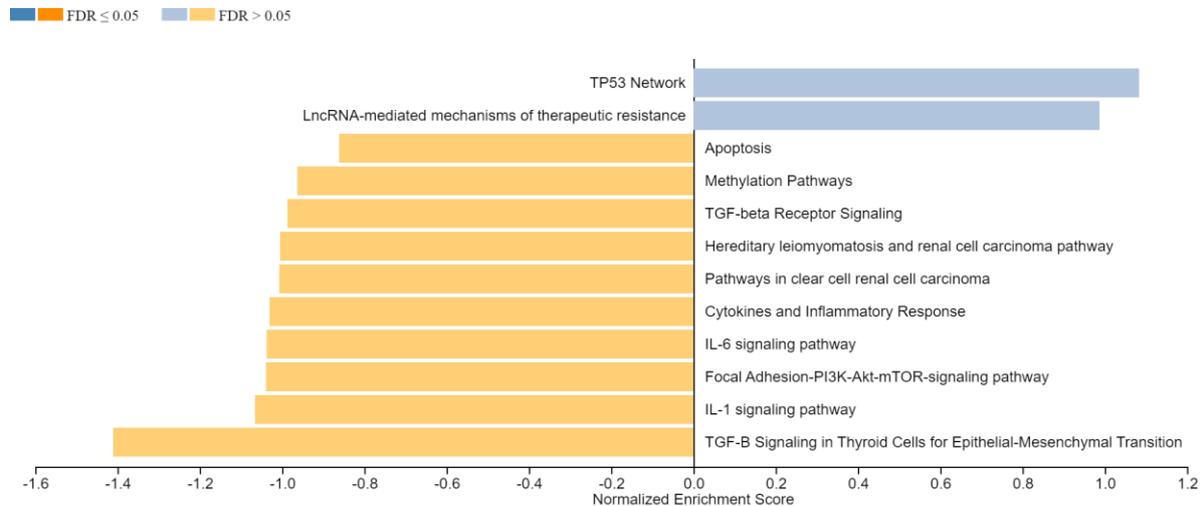


Figura 4.51: Análisis de enriquecimiento del conjunto de genes de DEG entre muestras del grupo MSC (naranja) y el grupo Control (azul). Ordenadas según la tasa de descubrimiento falso (FDR), en el que se muestran las vías con un FDR<0.05 en tonalidad más oscura.

Solamente encontramos diferencias en la expresión de los marcadores estudiados por inmunohistoquímica en esta Tesis Doctoral en el grupo RT+MSC con una sobreexpresión de CDH1 versus el grupo Control ($p=0.045$) y de IMP3 en el grupo MSC versus el grupo RT ($p=0.013$) (Fig. 4.51).

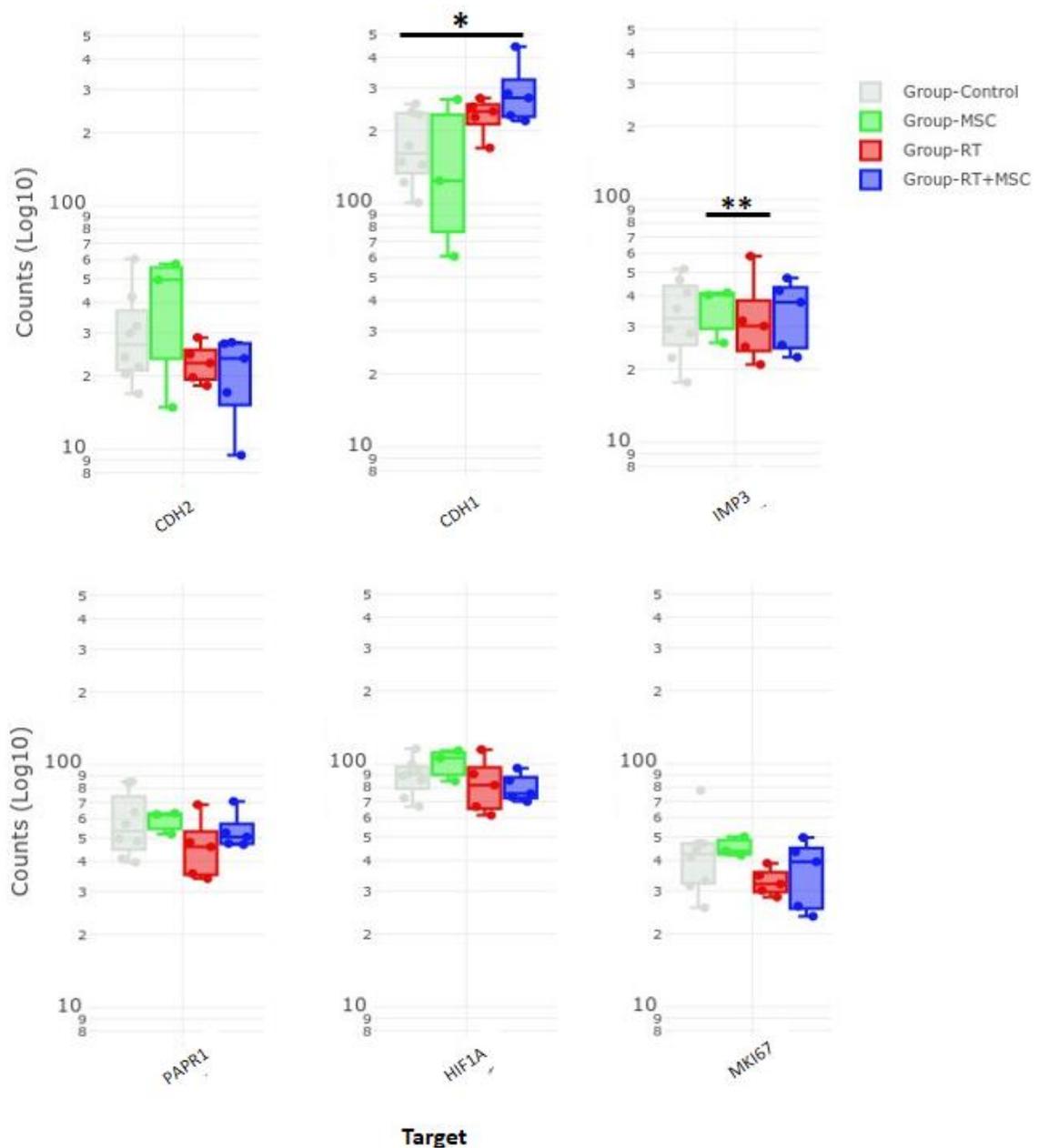


Figura 4.52: Diagramas de cajas de los principales marcadores analizados en esta Tesis Doctoral. Se puede observar sus modificaciones en la expresión comparando los diferentes tratamientos en la línea de melanoma G631 xenoinjertada. Se observa una reducción significativa de transcritos de IMP3 y de E-Cadherina con los diferentes tratamientos. Media \pm SD. *T-test* no pareado con corrección Benjamin Hochberg. La significación se indica con *valor de $p < 0.05$, ** valor de $p < 0.01$, *** valor de $p < 0.001$.

En el grupo de marcadores histogénéticos de melanocitos diferencias estadísticamente significativas con mayor expresión en el grupo RT de MLANA

($p=0.039$). Y PMEL, TYR y MLANA en el grupo RT+MSC *versus* el grupo Control ($p=0.000$, $p=0.004$ y $p=0.031$) (Fig. 4.53).

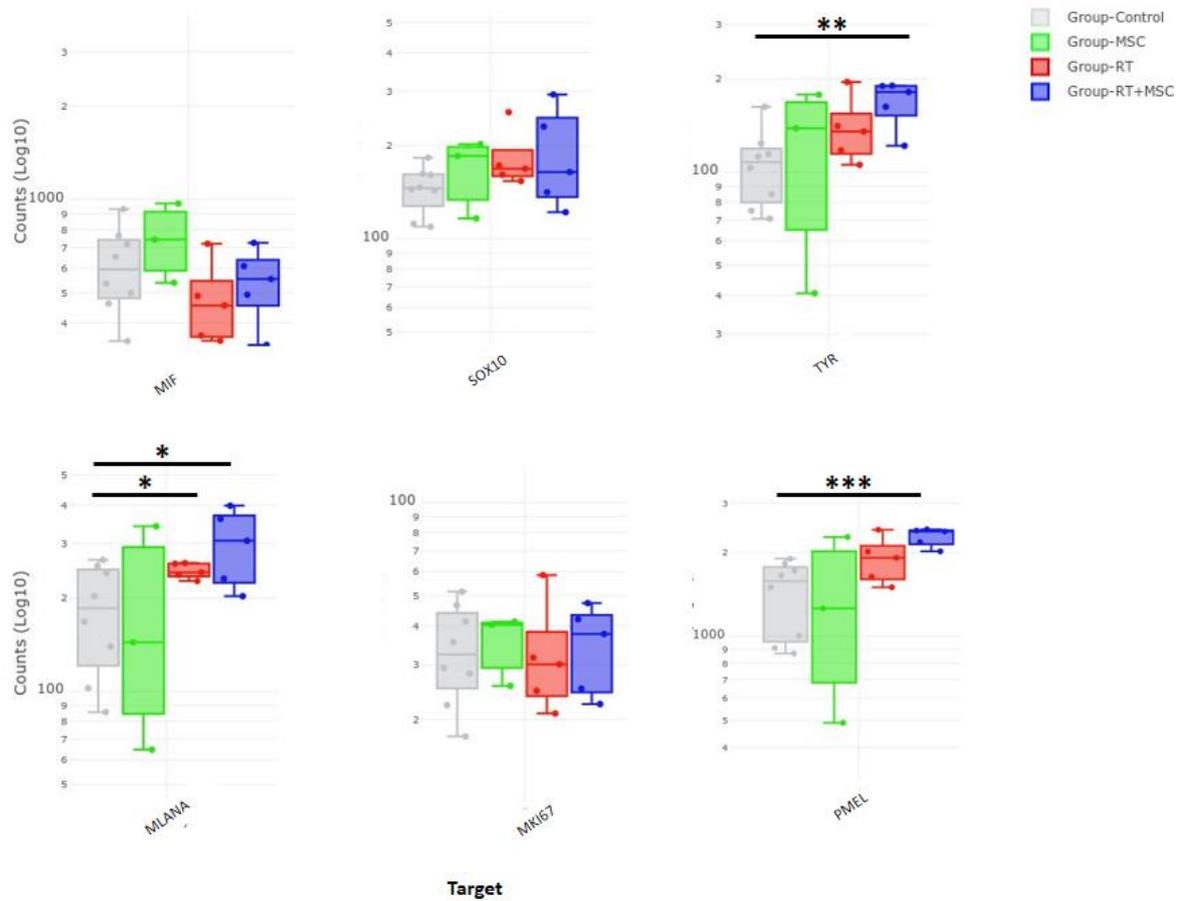


Figura 4.53: Histograma de barras de la expresión de los marcadores de melanoma en la línea G361 xenoinjertada en relación con el grupo de tratamiento. Se aprecia escasas modificaciones en la detección de las sondas seleccionadas. Media \pm SD. *T-test* no pareado con corrección Benjamin Hochberg. La significación se indica con *valor de $p<0.05$, ** valor de $p<0.01$, *** valor de $p<0.001$.

4.5 Estudio clínico-patológico

4.5.1 Resultados del estudio clínico, morfológico e inmunohistoquímico de los melanomas cutáneos de la serie retrospectiva

La serie retrospectiva de melanomas cutáneos estuvo constituida por 102 Melanomas de Extensión Superficial y 12 Melanomas Nodulares. En la serie, 67 fueron mujeres (58.8%) y 47 hombres (41.2%) (no significativo, Chi2 de Pearson). La localización cutánea de los melanomas fue en tronco 45 casos, 24 en miembros superiores y 45 en miembros inferiores (no significativo, Chi2 de Pearson). Con respecto a las biopsias, 31 de los melanomas presentaron ulceración (27.2%) y 83 (72.8%) no ($p=0.09$, Chi2 de Pearson). Se detectó solo en 5 melanomas invasión linfática intratumoral y en 109 no fue observada ($p=0.025$, Chi2 de Pearson) y en 2 melanomas invasión perineural ($p=0.012$). Los melanomas alcanzaron un nivel de Clark II: 1; nivel III: 51; nivel IV: 58 y nivel V: 4; con un espesor de Breslow medio en la totalidad de casos de 2.72 mm. El 31.6% (36 melanomas) presentaban afectación ganglionar linfática (pN1a: 25; pN1b: 1; pN1c: 2; pN2a: 7, pN3a: 1).

La valoración semicuantitativa del microambiente tumoral (TIL) demostró un infiltrado linfocitario intenso en 20 casos (19.6%) de MES frente a uno solo de los MN (8.3%) el resto de los melanomas presentaron o un infiltrado inflamatorio leve o ausente. El estudio cuantitativo de las diferentes subpoblaciones leucocitarias mediante inmunohistoquímica demuestra diferencias estadísticamente significativas entre los dos tipos histológicos de melanoma (Fig. 4.54).

El microambiente tumoral ha mostrado diferencias estadísticamente significativas en todas las subpoblaciones leucocitarias analizadas al comparar el MES con el MN (Tabla 4.22).

El ligando 1 del receptor de muerte programada (PD-L1 o CD274) es un miembro de la familia B7, se ha demostrado que el receptor de muerte programada 1 (PD-1), regula negativamente la señalización del receptor de células T (TCR). Al ligar su receptor, se ha informado que PD-L1 disminuye la proliferación mediada por TCR y la producción de citocinas. La expresión de PD-L1 es abundante en los melanomas cutáneos humanos y podría aumentar aún más con la estimulación con IFN-gamma. Por tanto, PD-L1 podría desempeñar un papel importante en la evasión inmunitaria de tumores y nuestros resultados señalan que está significativamente más expresado en los MN (Tabla 4.22).

Tabla 4.22: Comparación expresión inmunohistoquímica de subpoblaciones leucocitarias del microambiente tumoral así como del ligando y del receptor de muerte programada en ambos tipos de melanoma.

Variables	MES	MN	Valor de p*
CD45 céls./mm ²	1461.16±1600.1	634.40±799.16	0.071
CD68 céls./mm ²	487.03±894.73	1108.87±926.29	0.016
CD3 céls./mm ²	314.51±612.98	820.78±861.37	0.001
CD20 céls./mm ²	107.33±266.22	121.86±130.81	0.022
CD56 céls./mm ²	155.06±554.86	161.29±202.09	0.019
PDL1 céls./mm ²	1278.53±1405.26	3390.68±2848.83	0.035
PD1 céls./mm ²	802.27±1142.93	795.69±803.13	0.764
IMP3 (%)	31.90±34.88	40.80±33.94	0.245
IMP3 (Intensidad)	1.40±1.17	21.00±0.99	0.055

Los valores están expresados como la media ± la desviación estándar. MES, melanoma de extensión superficial; MN, melanoma nodular. Intensidad (Escala 0-3). * Prueba U de Mann-Whitney.

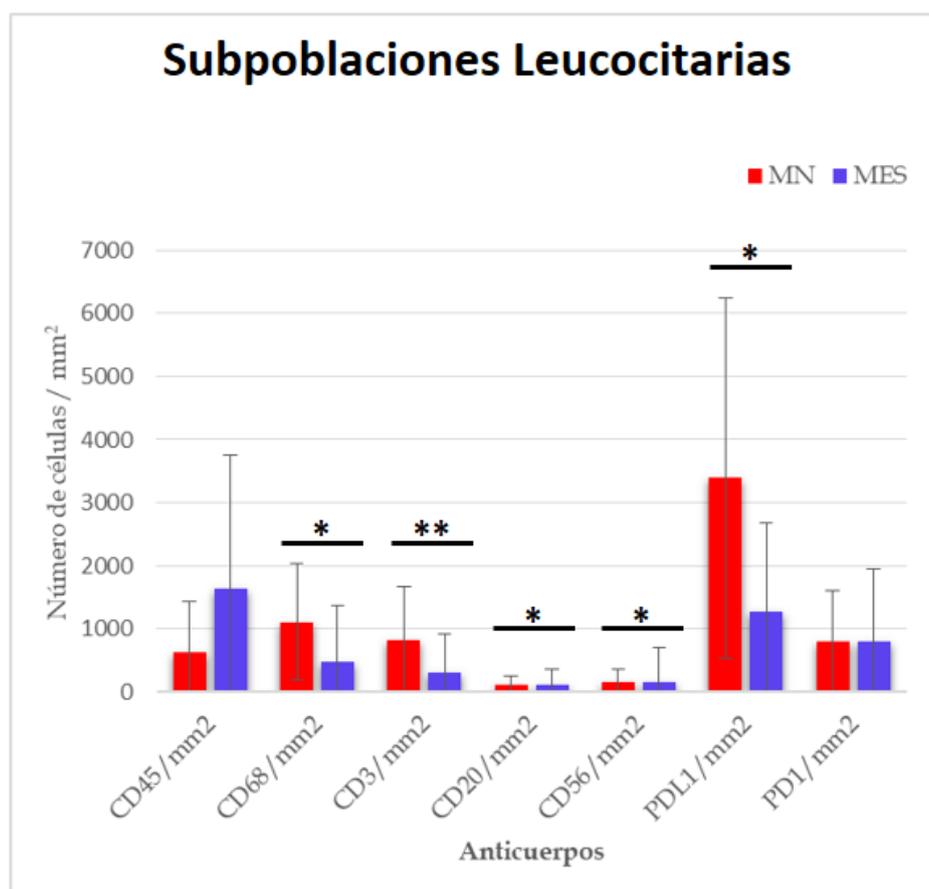


Figura 4.54: Histograma de barras de la expresión inmunohistoquímica de subpoblaciones leucocitarias en MN y MES cutáneos. Prueba U de Mann-Whitney La significación se indica con *valor de $p < 0.05$, ** valor de $p < 0.01$, *** valor de $p < 0.001$.

Mediante inmunohistoquímica la intensidad y el porcentaje de expresión de IMP3 fue mayor de manera estadísticamente significativa en los casos con metástasis en los ganglios linfáticos ($p=0.029$ y $p=0.020$, respectivamente, prueba U de Mann-Whitney) y espesor de Breslow ($p=0.006$, prueba U de Mann-Whitney) (Tabla 4.23, Fig. 4.55). Asimismo, la expresión inmunohistoquímica de IMP3 se correlacionó con el espesor de Breslow y el nivel histológico de Clark ($r=0.218$, $p=0.020$; $r=0.198$, $p=0.035$, respectivamente, correlación de Pearson).

Tabla 4.23: Comparación de los datos clínicos, morfológicos e inmunohistoquímicos entre melanomas sin infiltración o con infiltración de ganglios linfáticos.

Variabes	Grupo GC-	Grupo GC+	Valor de p*
Edad	61.85±14.38	61.42±13.69	0.905
Seguimiento (años)	7.85±1.96	7.27±1.80	0.074
Espesor de Breslow	2.31±1.86	3.05±0.61	0.006
Nivel Clark	3.52±0.61	3.75±0.56	0.064 [†]
IMP3 (%)	28.29±34.1	43.45±34.45	0.020
IMP3 (score 0-3)	1.38±1.17	1.91±1.07	0.029[†]

Los valores se expresan como media±desviación estándar. *Prueba U de Mann-Whitney; † prueba exacta de Fisher.

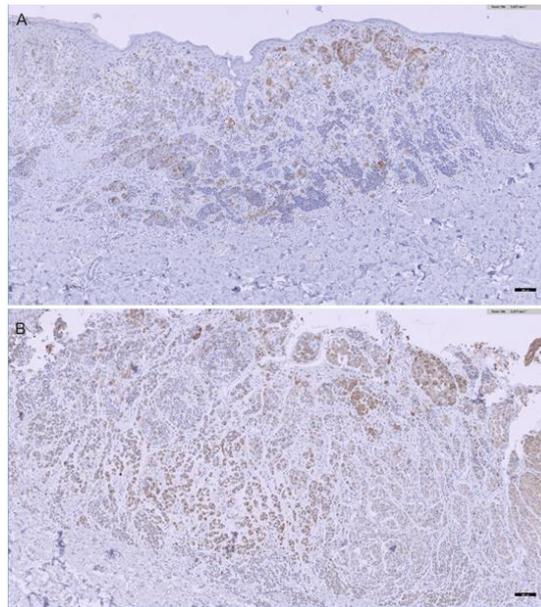


Figura 4.55: Expresión inmunohistoquímica de IMP3 en Melanoma cutáneo humano. Obsérvese la menor expresión (porcentaje de células) en un caso de melanoma sin metástasis ganglionares (A) en comparación con un melanoma con afectación ganglionar (B).

Mientras que la expresión de IMP3 fue estadísticamente significativa comparado el estado del GC, la valoración semicuantitativa de la expresión

inmunohistoquímica de EMP1 mostró una inmunotinción moderada en casi todos los melanomas cutáneos sin diferencias apreciables con esta técnica y la inmunotinción para EML1 resultó en la mayoría de los casos de intensidad leve.

4.5.2 Resultados del estudio de transcriptómica espacial en melanomas cutáneos

Con el fin de establecer el perfil de la expresión génica intratumoral en los melanomas y comprobar las diferencias moleculares que ocurren en el MES y el MN, perfilamos 76 muestras utilizando la tecnología GeoMx[®]DSP. Para cada muestra, se seleccionaron los ROI (Regiones específicas de interés) (Fig. 4.56). Para examinar específicamente las alteraciones transcripcionales intratumorales dentro de los compartimentos tumoral y estromal investigamos en conjunto y por separado las AOI (Área de iluminación) de las fracciones positivas para la proteína S100 (S100+) correspondiente a las células melanocíticas malignas y positivas para CD45 (CD45+) correspondiente al microambiente tumoral dentro de cada ROI (Fig. 4.56).

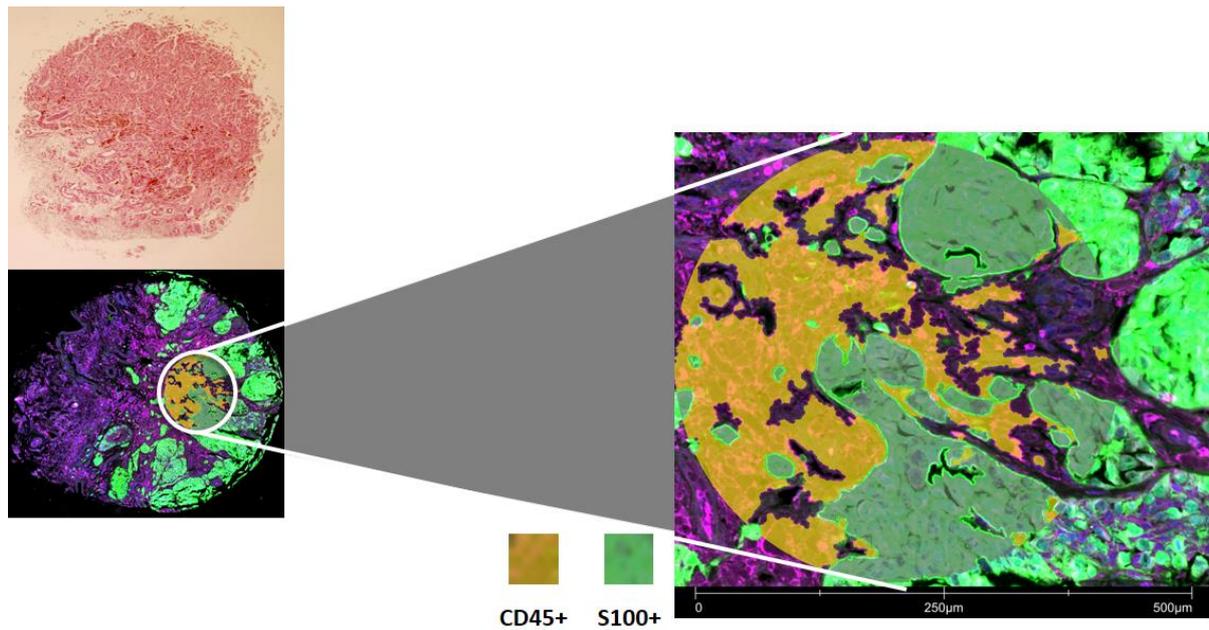


Figura 4.56: Ejemplo de selección de ROI con DSP. Tejido teñido con H&E con la correspondiente inmunofluorescencia, segmentación de tejido para cada ROI, visualizando los segmentos CD45+ y S100+. Recuadro: mayor aumento de un ROI individual. Barra escala 500 μm .

Los gráficos UMAP están anotados por Tipo (izquierda), Área (centro) y afectación Ganglio Centinela (derecha). Se puede apreciar como hay una diferente expresión génica en función del tipo histopatológico de melanoma y de su transcriptómica espacial que se realiza sobre las células tumorales o sobre el infiltrado inflamatorio. No obstante, resultan menos evidentes en muchos casos las diferencias entre los melanomas con GC- y GC+.

Al utilizar el método de reducción dimensional UMAP (“Uniform Manifold Approximation and Projection”) se obtuvo una clara segregación de AOI por segmento (S100+/CD45+) (Fig. 4.57B), si bien en todos los AOI hay positividad para ambos marcadores morfológicos (Fig. 4.59). La gran mayoría de los genes en este estudio en WTA en melanoma se expresaron diferencialmente entre segmentos: 464 genes estaban regulados positivamente en los segmentos tumorales (S100+) y 12609 genes estaban regulados positivamente en los segmentos estromales de microambiente tumoral CD45+ (prueba U de Mann-Withney corrección de Benjamin Hochberg, FDR

<0.05) (Fig. 4.58A). El mapeo de AOI en el UMAP permite separar entre los subtipos histológicos MES y MN. Para obtener una descripción general de alto nivel, posteriormente visualizamos la expresión de los 18672 genes en mapas de calor agrupados de manera supervisada, por segmento (Fig. 4.58B).

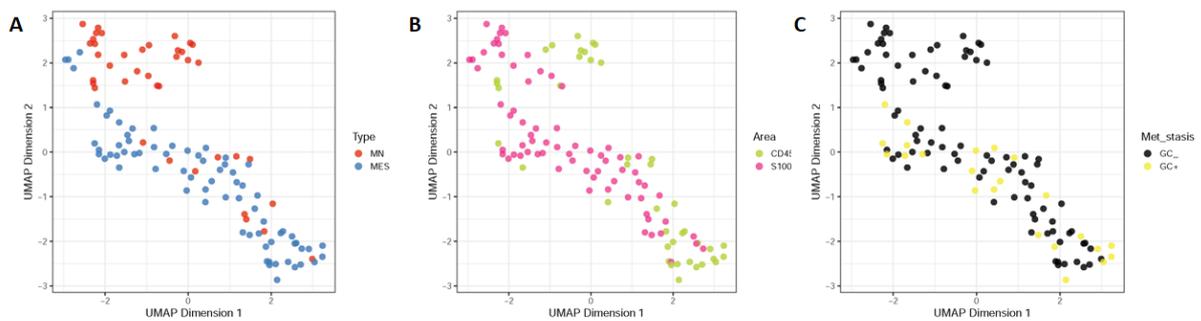


Figura 4.57: Gráficos UMAP. Visualización de reducción de dimensionalidad de todas las AOI de acuerdo con los perfiles generales de expresión génica por UMAP. (A) Tipo melanoma: MES (azul), MN (rojo); (B) Área: CD45+ (verde), S100+ (rosa); (C) Afectación del ganglio centinela: GC+ (amarillo), GC- (negro).

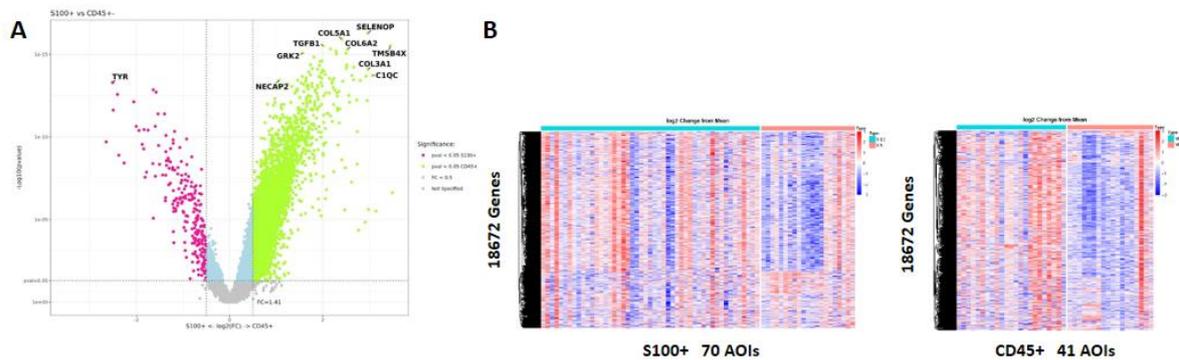


Figura 4.58: Expresión de genes en las áreas S100+ y CD45+. (A) Gráfico de volcán de los genes expresados diferencialmente entre los segmentos de S100+ y CD45+ mediante la prueba Mann Withney. La FDR se ha calculado utilizando el método de Benjamin Hochberg. (B) Mapas de calor de expresión génica ($n = 18672$) utilizando agrupamiento supervisado para cada AOI de S100+ ($n = 70$, izquierda) y AOI de CD45+ ($n = 41$, derecha). Los mapas de calor están anotados por región histológica e ID de muestra. AOIs, áreas de iluminación; FDR: tasa de descubrimiento falso; ROI, región de interés.

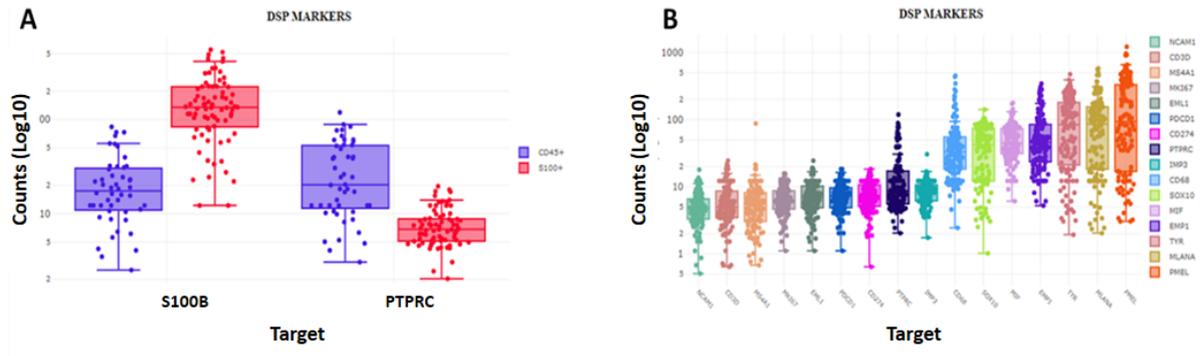


Figura 4.59: A) Gráfico de cajas que incluye recuentos de DSP para CD45 y S100B en los compartimentos/AOI correspondientes. B) Recuentos medios de DSP \pm SEM en todos los compartimentos para cada marcador de melanoma estudiado en esta Tesis. Nótese que a todos los anticuerpos ha sido posible detectarlos mediante esta técnica.[CD45 (PTPRC), CD68, CD3 (CD3G), CD20 (MS4A1), CD56 (NCAM1), PD-L1 (CD274), PD1 (PDCD1), TYR (Tirosinasa), PMEL, Ki67 (MKI67), MART-1 (MLANA), MIF, EMP1, IMP3, SOX10].

4.5.2.1 Comparación de la expresión del transcriptoma de los MES versus MN

El transcriptoma global de los melanomas cutáneos estudiados en los AOI S100+ y CD45+ demuestra diferencias notables entre MES y MN (Fig. 4.60).

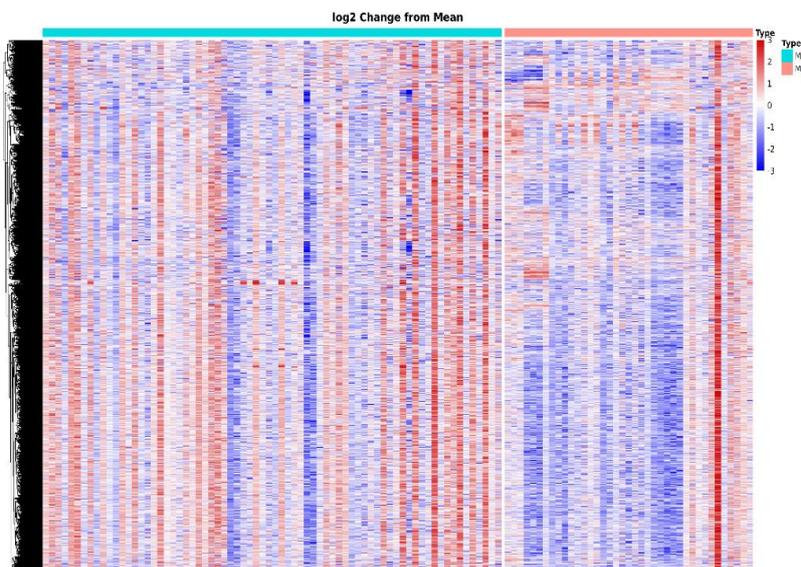


Figura 4.60: *Heatmap* de los transcritos de MES y MN en nuestro estudio. Mapa de calor supervisado de la expresión de transcritos que permiten diferenciar entre el tipo de melanoma de extensión superficial (MES) y del melanoma nodular (MN).

Comparando ambos tipos de melanoma (Fig. 4.61) se aprecia una sobreexpresión de 810 sondas con una $p < 0.05$ en MN y con una $p < 0.01$ 589 sondas que cumplen los criterios, y de ellos los que tienen un “fold changes” (FC) mayor de 2 encontramos 12 sondas (Tabla 4.24).

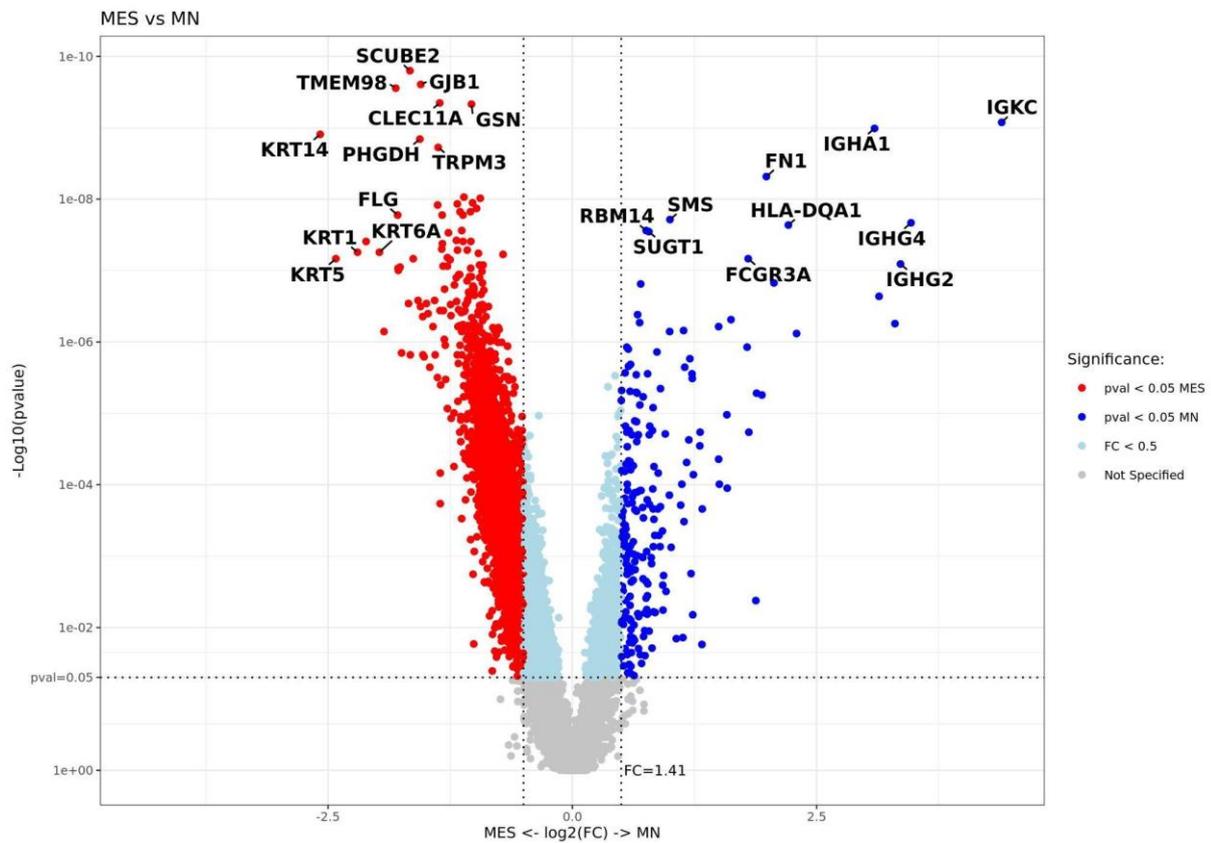


Figura 4.61: Gráfico de tipo volcán comparando la expresión diferencial de sondas entre los tipos histológicos de melanoma. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. MES (rojo); MN (azul). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

Tabla 4.24: Genes sobreexpresados en MN comparado con el grupo MES

HLA-DQA1	HLA-DRB1	CD74	IGHG3	IGKC	FN1	HLA-DPA1
IGHG1	IGHG4	HLA-DPB1	IGHA1	IGHG2		

Claramente las sondas sobreexpresadas están relacionadas con las células inflamatorias del microambiente tumoral. Las rutas MHC1 causada por fallos en la presentación de antígenos en el escape inmunológico del cáncer ($p=1.42e^{-12}$), MHC2-Presentación mediada por antígenos ($p=1.22e^{-07}$) y la ruta de genes con mutaciones en el escape inmunológico del cáncer ($p=2.62e^{-07}$) como se observa en las Figuras 4.62 y 4.63.

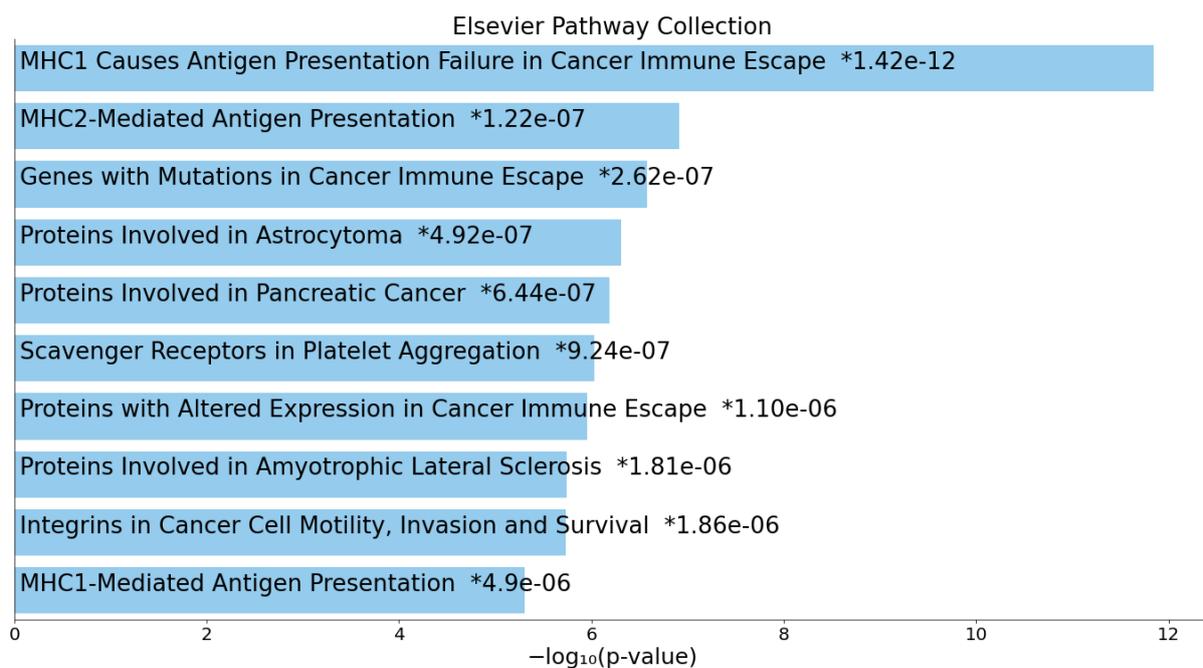


Figura 4.62: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes Elsevier_Pathway_Collection. Los 10 términos enriquecidos principales para el conjunto de genes de entrada se muestran en función del $-\log_{10}$ (valor p), y el valor p real se muestra junto a cada término. El término en la parte superior tiene la superposición más significativa con el conjunto de genes de consulta de entrada. Las barras de colores corresponden a términos con valores de p significativos (<0.05). Un asterisco (*) junto a un valor p indica que el término también tiene un valor p ajustado significativo (<0.05).

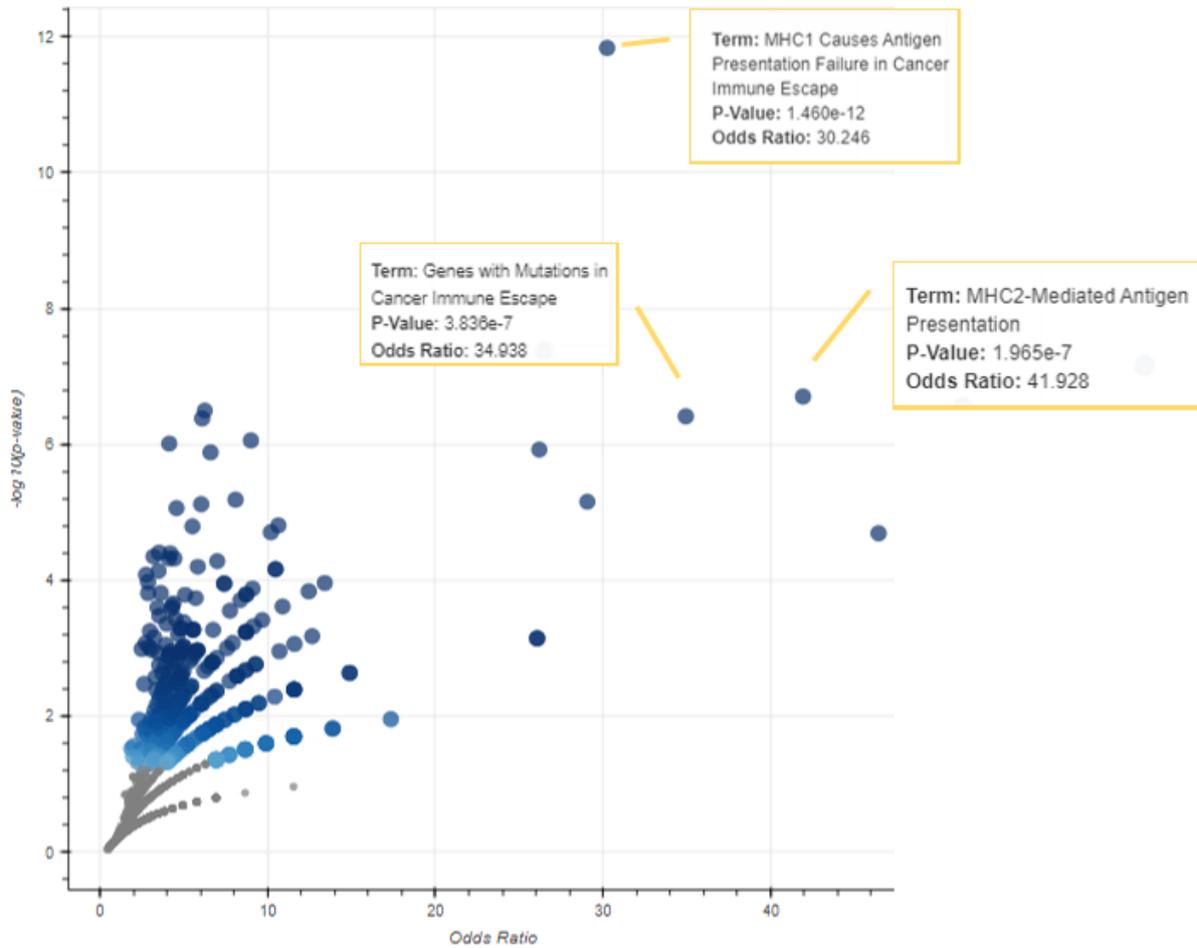


Figura 4.63: Gráfico de tipo volcán de los términos del conjunto de genes Elsevier_Pathway_Collection. Cada punto representa un término único, trazado por la relación de probabilidades correspondiente (posición x) y $-\log_{10}$ (valor p) (posición y) de los resultados de enriquecimiento del conjunto de genes de consulta de entrada. Cuanto más grande y de color más oscuro sea el punto, más significativamente se enriquecerá el conjunto de genes de entrada para el término. Señalando el punto se observa el término del conjunto de genes, el índice de probabilidades y el valor p del análisis de enriquecimiento. El gráfico del volcán muestra la importancia de cada conjunto de genes de la biblioteca seleccionada frente a su odds ratio. El eje x mide el odds ratio (0, inf) calculado para el conjunto de genes, mientras que el eje y da el $-\log$ (valor p) del conjunto de genes. Los puntos azules más grandes representan términos significativos (valor $p < 0.05$); Los puntos grises más pequeños representan términos no significativos. Cuanto más oscuro es el color azul de un punto, más significativo es.

En el MES encontramos 9389 sondas sobreexpresadas comparado con el MN con una $p < 0.05$; y 7902 sondas sobreexpresadas con una $p < 0.01$ (Fig. 4.61), de los cuales 5 han tenido un “fold changes” (FC) mayor de 2 (Tabla 4.25).

Tabla 4.25: Genes sobreexpresados en el grupo MES comparado con el grupo MN

KRT1	KRT5	KRT10	KRT15	SPRR1B
------	------	-------	-------	--------

Todos ellos relacionados con los filamentos intermedios de queratina del citoesqueleto. Esta eventualidad puede deberse al atrapamiento en los ROI de queratinocitos, pero no hay que olvidar que un número significativo de melanomas muestran positividad para queratinas de bajo peso molecular (44) (Fig. 4.64).

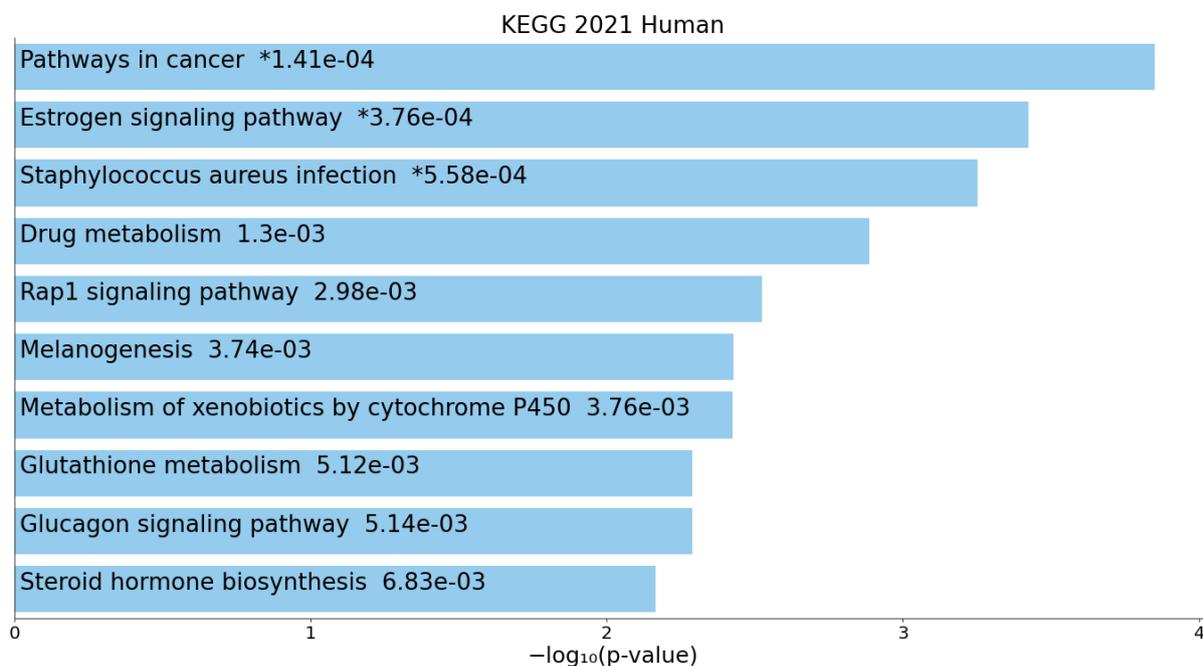


Figura 4.64: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca KEGG_2021_Human. Los 10 términos enriquecidos principales para el conjunto de genes de entrada se muestran en función del $-\log_{10}$ (valor p), y el valor p real se muestra junto a cada término. El término en la parte superior tiene la superposición más significativa con el conjunto de genes de consulta de entrada. Las barras de colores corresponden a términos con valores de p significativos (<0.05). Un asterisco (*) junto a un valor p indica que el término también tiene un valor p ajustado significativo (<0.05).

En el análisis de enriquecimiento en MES hemos definido una serie de rutas con expresión significativa destacando las rutas “Pathways en cáncer” ($p=0.000141$), la vía “Rap1 signaling pathway” ($p=0.00298$) y “Melanogénesis” ($p=0.00374$) (Fig. 4.65).

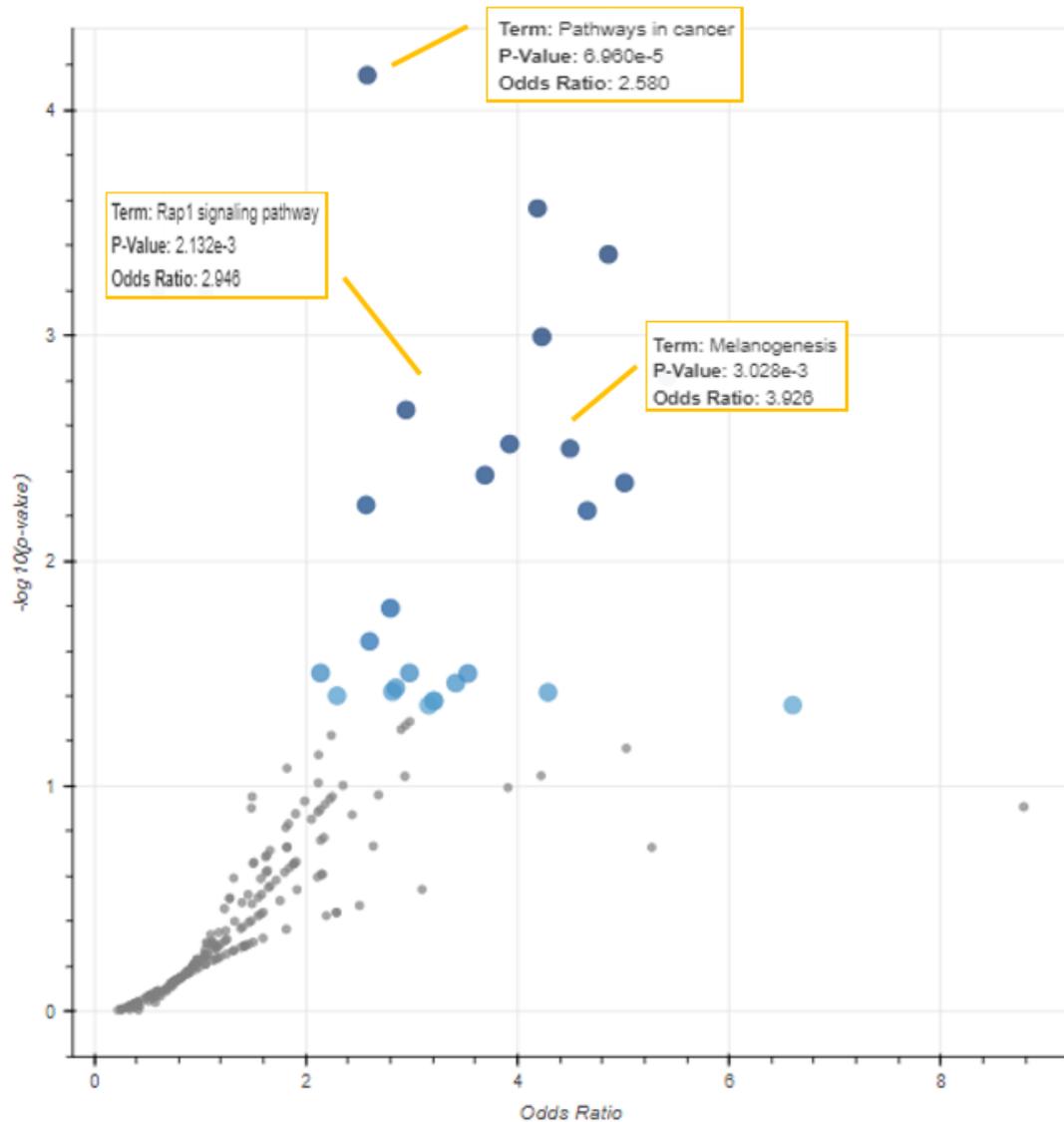


Figura 4.65: Gráfico de tipo volcán de los términos del conjunto de genes KEGG_2021_Human. Cada punto representa un término único, trazado por la relación de probabilidades correspondiente (posición x) y $-\log_{10}(\text{valor } p)$ (posición y) de los resultados de enriquecimiento del conjunto de genes de consulta de entrada. Cuanto más grande y de color más oscuro sea el punto, más significativamente se enriquecerá el conjunto de genes de entrada para el término. Señalando el punto se observa el término del conjunto de genes, el índice de probabilidades y el valor p del análisis de enriquecimiento. El gráfico del volcán muestra la importancia de cada conjunto de genes de la biblioteca seleccionada frente a su odds ratio. El eje x mide el odds ratio (0, inf) calculado para el conjunto de genes, mientras que el eje y

da el $-\log$ (valor p) del conjunto de genes. Los puntos azules más grandes representan términos significativos (valor $p < 0.05$); Los puntos grises más pequeños representan términos no significativos. Cuanto más oscuro es el color azul de un punto, más significativo es.

Analizando la totalidad de casos se aprecia una heterogeneidad entre los diferentes casos en la expresión de marcadores histogenéticos de melanocitos pero es posible separar los dos tipos más frecuentes mediante gráficas de *heatmap* (Fig. 4.66).

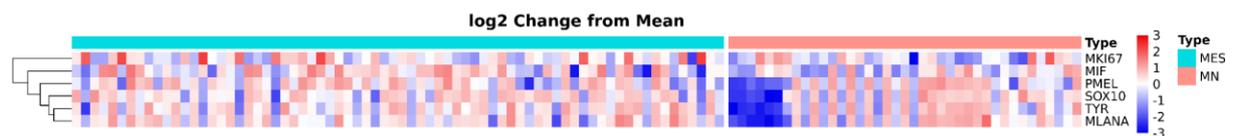


Figura 4.66: *Heatmap* supervisado con los marcadores histogenéticos de melanocitos en los melanomas cutáneos.

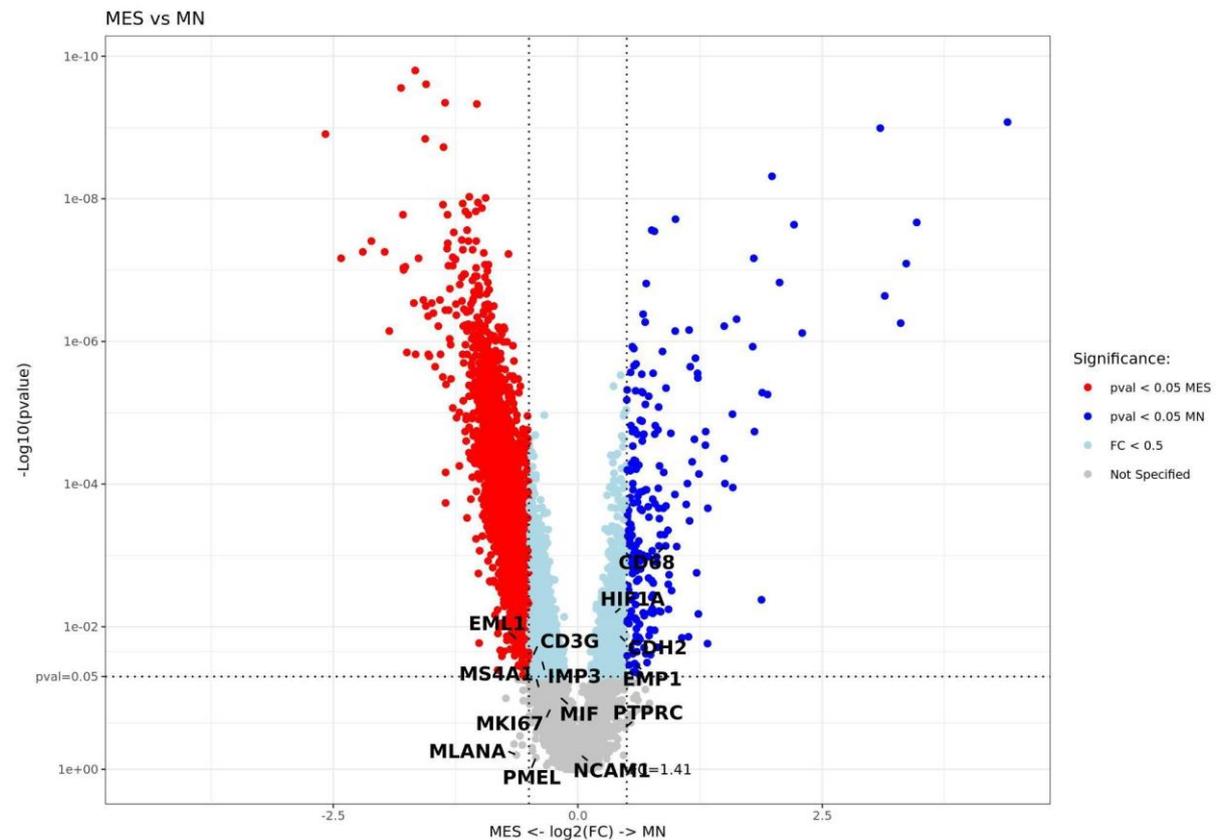


Figura 4.67: Gráfico de tipo volcán que representa la diferencia de expresión de los marcadores relativos a melanoma y microambiente tumoral en ambos tipos de melanoma. [CD45 (PTPRC), CD68, CD3 (CD3G), CD20 (MS4A1), CD56 (NCAM1), PD-L1 (CD274), PD1 (PDCD1), TYR (Tirosinasa), PMEL,

Ki67 (MKI67), MART-1 (MLANA), MIF, EMP1, IMP3, SOX10, EML1 e HIF1 α]. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. Señalando las sondas que identifican los transcritos utilizados en inmunohistoquímica. MES (rojo); MN (azul). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

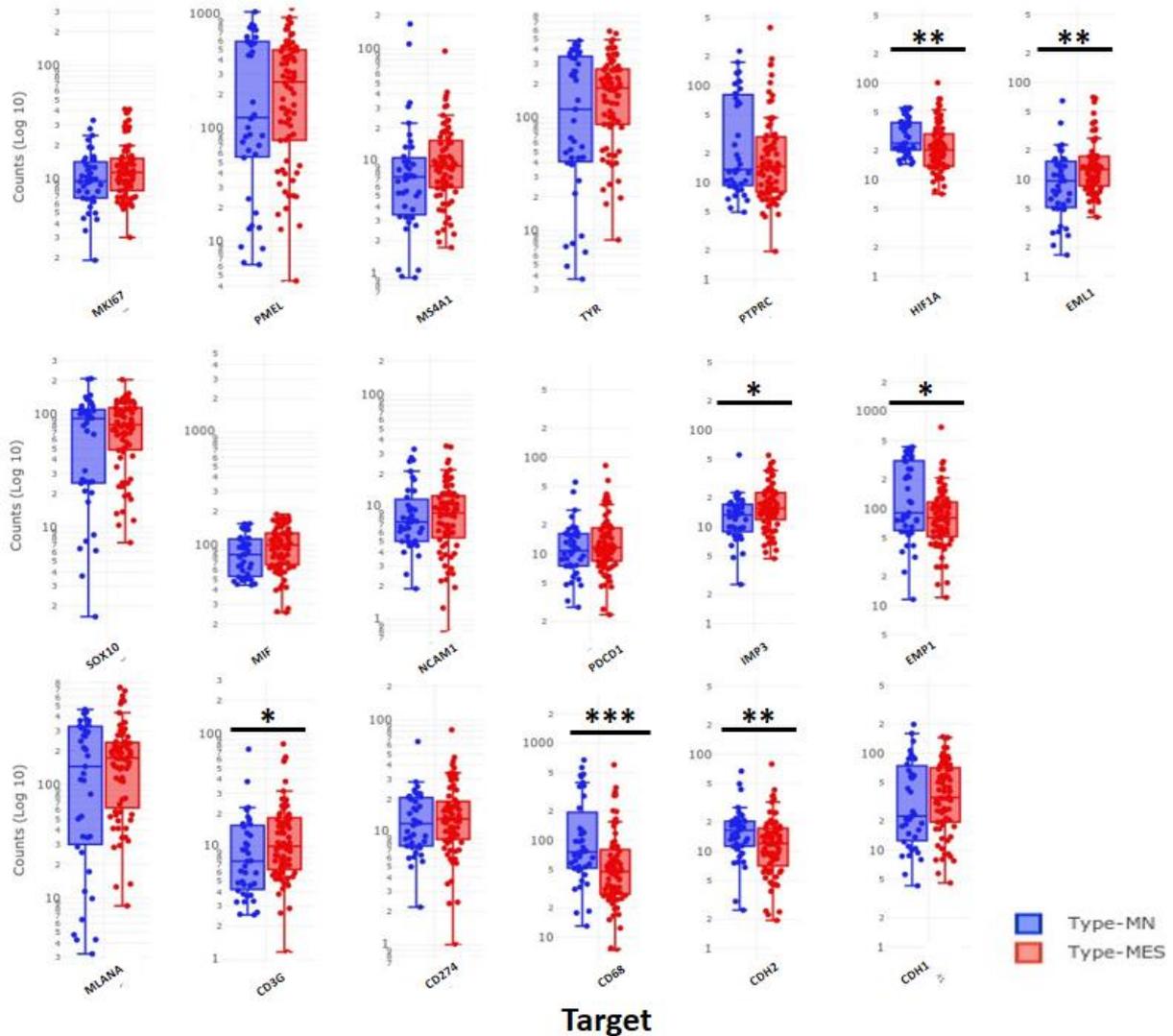


Figura 4.68: Diagrama de cajas de los anticuerpos estudiados mediante inmunohistoquímica. Media \pm SD. [CD45 (PTPRC), CD68, CD3 (CD3G), CD20 (MS4A1), CD56 (NCAM1), PD-L1 (CD274), PD1 (PDCD1), TYR (Tirosinasa), PMEL, Ki67 (MKI67), MART-1 (MLANA), MIF, EMP1, IMP3, SOX10, EML1 e HIF1 α]]. Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg. La significación se indica con *valor de $p < 0.05$, ** valor de $p < 0.01$, *** valor de $p < 0.001$.

Con respecto a la expresión de genes concretos estudiados y marcadores de melanoma encontramos diferencias estadísticamente significativas con CD68, EMP1, CDH2 (N-Cadherina) e HIF1 α en MN ($p=0.0007$, $p=0.03$, $p=0.01$ y $p=0.006$), y de CD3, IMP3 y EML1 en MES ($p=0.02$, $p=0.02$ y $p=0.01$) como se puede observar en las Figuras 4.67 y 4.68. Al analizarlos mediante mapa de calor es posible identificar diferentes patrones de expresión (Fig. 4.69).

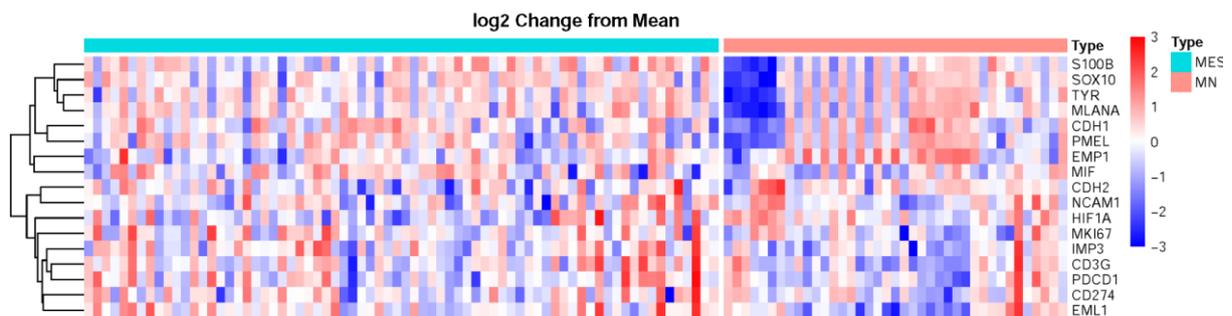


Figura 4.69: *Heatmap* supervisado de la expresión de anticuerpos estudiados por tipos de melanoma. [CD3 (CD3G), CD56 (NCAM1), PD-L1 (CD274), PD1 (PDCD1), TYR (Tirosinasa), S100B, PMEL, Ki67 (MKI67), MART-1 (MLANA), MIF, EMP1, IMP3, SOX10, EML1, CDH1, CDH2 e HIF1 α].

Con respecto a los genes que se estudian en la prueba 31-GEP cuando se analizan mediante transcriptómica espacial 16 sondas muestran significación estadística en los MES frente a MN (Figs. 4.70, 4.71) (Tabla 4.26).

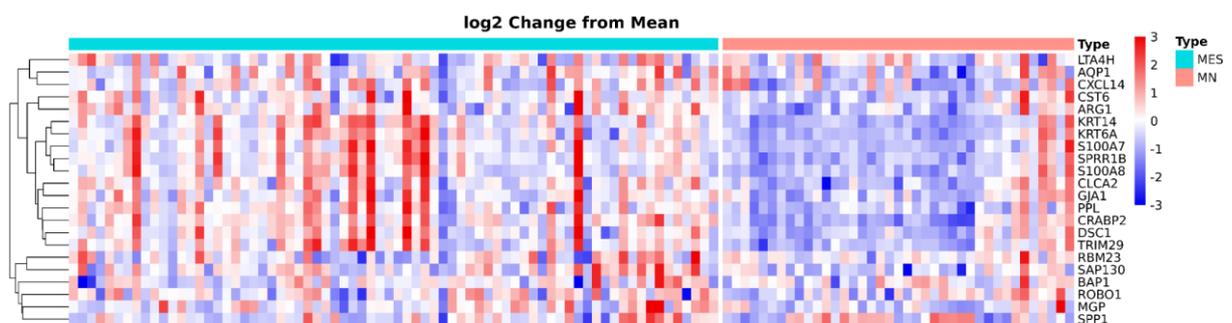


Figura 4.70: *Heatmap* supervisado de la expresión de transcritos del grupo 31-GEP en ambos tipos de melanoma. MES (izquierda) y MN (derecha).

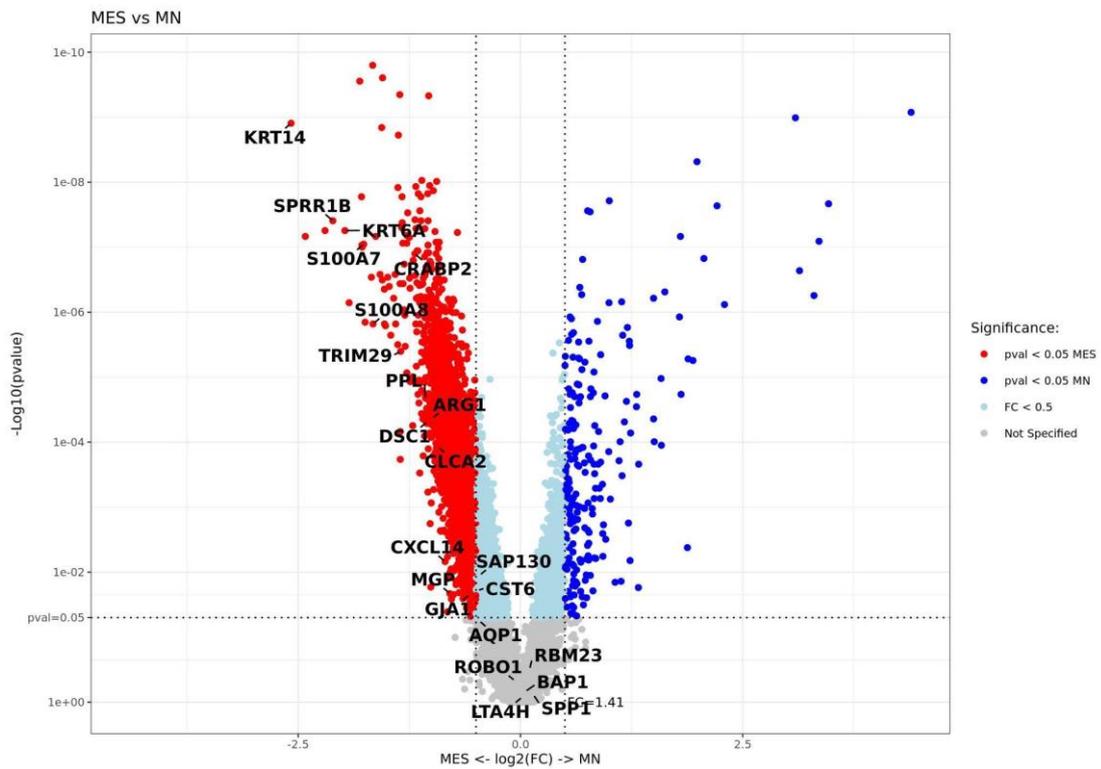


Figura 4.71: Gráfico de tipo volcán de los genes en los melanomas cutáneos de la prueba 31-GEP, comparando MES con MN. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. Señalando las sondas que identifican los transcritos utilizados en la prueba 31-GEP. MES (rojo); MN (azul). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

Tabla 4.26: Relación de Marcadores de la prueba 31-GEP que han resultado significativos en el estudio en las AOIs S100+

Prueba 31-GEP					
KRT14	0.000	KRT6A	0.000	S100A8	0.000
SPRR1B	0.000	S100A7	0.000	TRIM29	0.000
CRABP2	0.000	DSC1	0.000	CLCA2	0.000
PPL	0.000	ARG1	0.000	CXCL14	0.000
MGP	0.002	CST6	0.001		
GJA1	0.002	SAP130	0.001		

Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg. p valor.

4.5.2.1.1 Comparación de la expresión del transcriptoma de MES versus MN solo en las áreas S100+

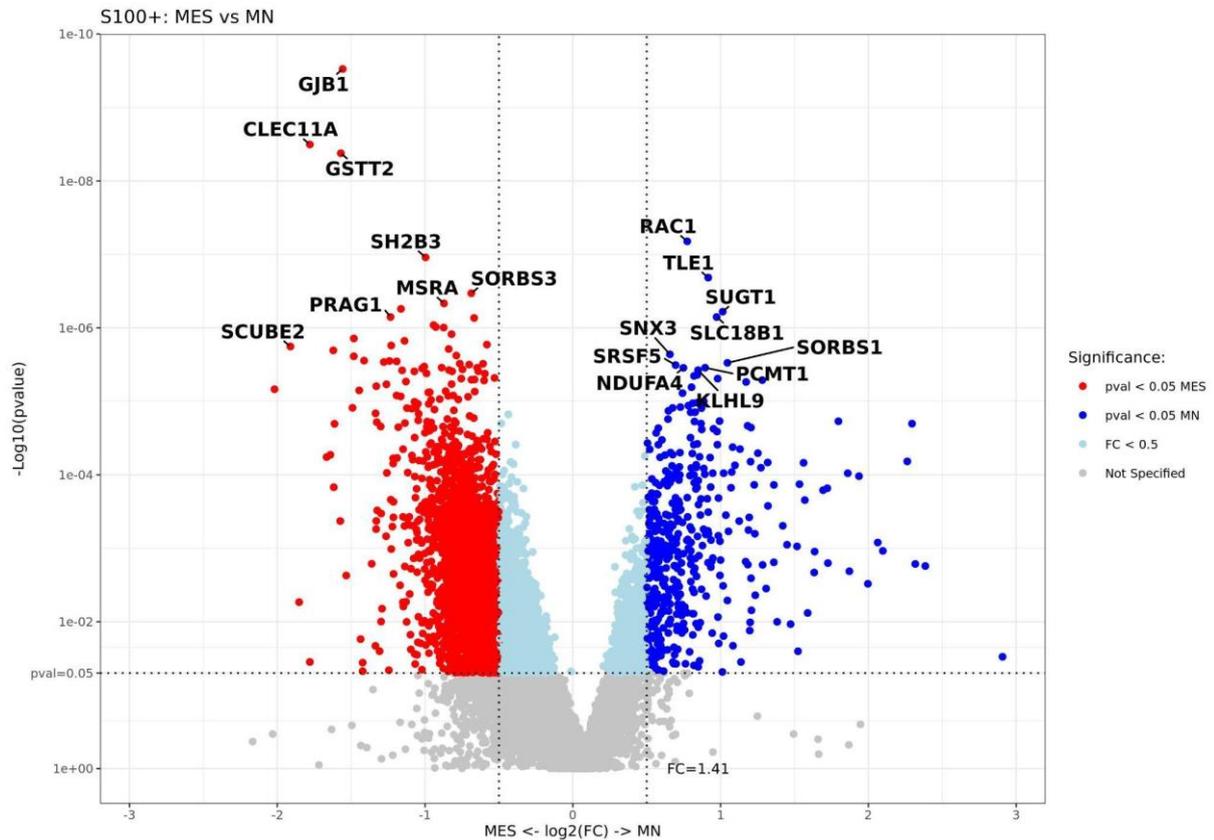


Figura 4.72: Gráfico de tipo volcán de los genes en los melanomas cutáneos comparando MES con MN en las áreas S100+. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. MES (rojo); MN (azul). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

Comparando ambos tipos de melanoma en las AOIs S100+ hay una sobreexpresión de 911 sondas con una $p < 0.05$ en MN y con una $p < 0.01$ encontramos 673 sondas, y de ellos los que tienen un “fold changes” (FC) mayor de 2 fueron 10 (Tabla 4.27) (Fig. 4.72).

Tabla 4.27: Genes sobreexpresados en el grupo MN comparado con el grupo MES en las AOIs S100+

HLA-DQA1	HLA-DRB1	CD74	IGKC	ABCB5	MMP2	ITGB8
HLA-DPA1	FN1	IGHG4				

El gen ABCB5 está relacionado con las propiedades de quimiorresistencia y agresividad del melanoma, y la activación de los genes MMP2 e ITGB8 median en la digestión de matriz extracelular y en el crecimiento y migración a través de señales de adhesión focal mediadas por integrinas. Las principales rutas activadas se indican en la Figura 4.73.

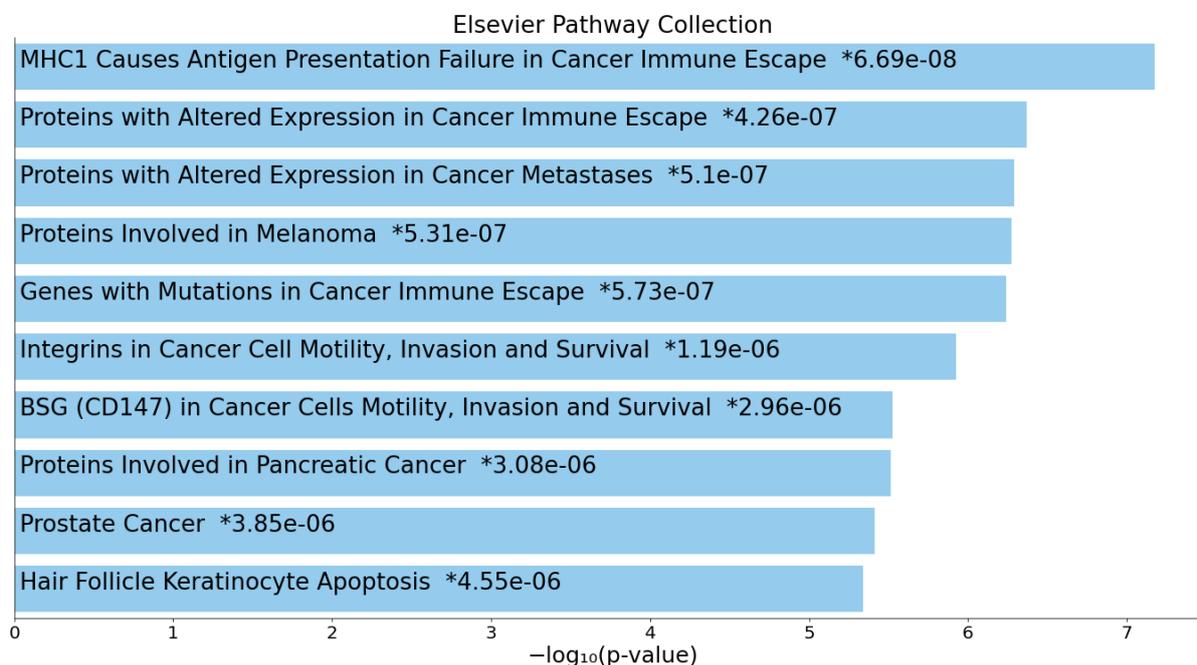


Figura 4.73: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes Elsevier_Pathway_Collection. Los 10 términos enriquecidos principales para el conjunto de genes de entrada se muestran en función del $-\log_{10}$ (valor p), y el valor p real se muestra junto a cada término. El término en la parte superior tiene la superposición más significativa con el conjunto de genes de consulta de entrada.

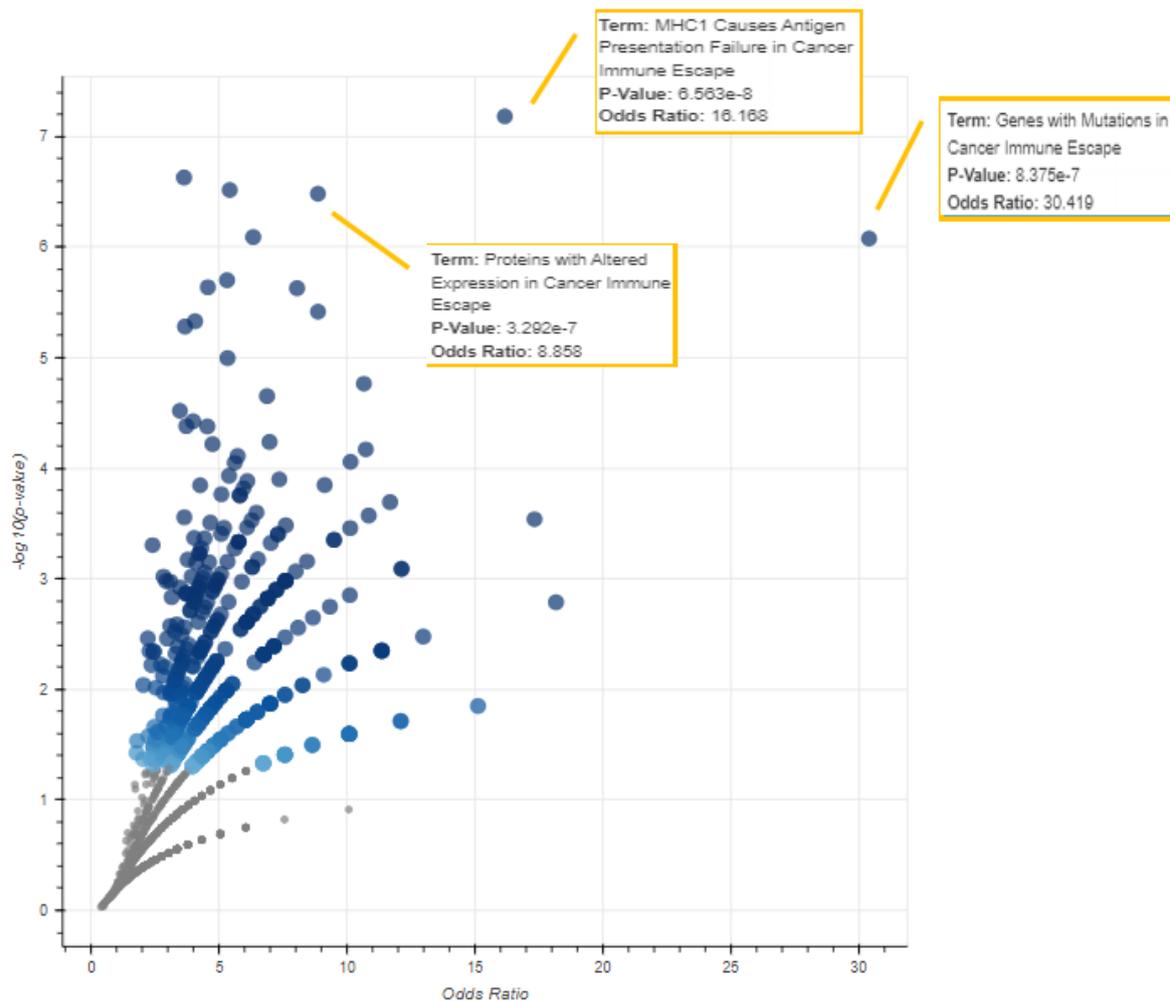


Figura 4.74: Gráfico de tipo volcán de los términos del conjunto de genes KEGG_2021_Human. Cada punto representa un término único, trazado por la relación de probabilidades correspondiente (posición x) y $-\log_{10}(\text{valor } p)$ (posición y) de los resultados de enriquecimiento del conjunto de genes de consulta de entrada. Cuanto más grande y de color más oscuro sea el punto, más significativamente se enriquecerá el conjunto de genes de entrada para el término. Señalando el punto se observa el término del conjunto de genes, el índice de probabilidades y el valor p del análisis de enriquecimiento. El gráfico del volcán muestra la importancia de cada conjunto de genes de la biblioteca seleccionada frente a su odds ratio. El eje x mide el odds ratio (0, inf) calculado para el conjunto de genes, mientras que el eje y da el $-\log$ (valor p) del conjunto de genes. Los puntos azules más grandes representan términos significativos ($p < 0.05$); Los puntos grises más pequeños representan términos no significativos. Cuanto más oscuro es el color azul de un punto, más significativo es.

En MN obtenemos que las tres rutas más destacadas por su significación estadística ($p < 0.001$) se encuentran en relación con el escape a la respuesta inmune del melanoma (Fig. 4.74).

En el MES encontramos 6754 sondas sobreexpresadas comparadas con MN con una $p < 0.05$; y 4636 sondas sobreexpresados con una $p < 0.01$, de los cuales ha alcanzado un “fold changes” (FC) mayor de 2 solo TMEM98.

La familia TMEMs está regulada al alza en el cáncer. Algunos de ellos están implicados en la progresión tumoral, la invasión y la formación de metástasis, mientras que otros están asociados con un mal pronóstico y podrían usarse como biomarcadores pronósticos (392).

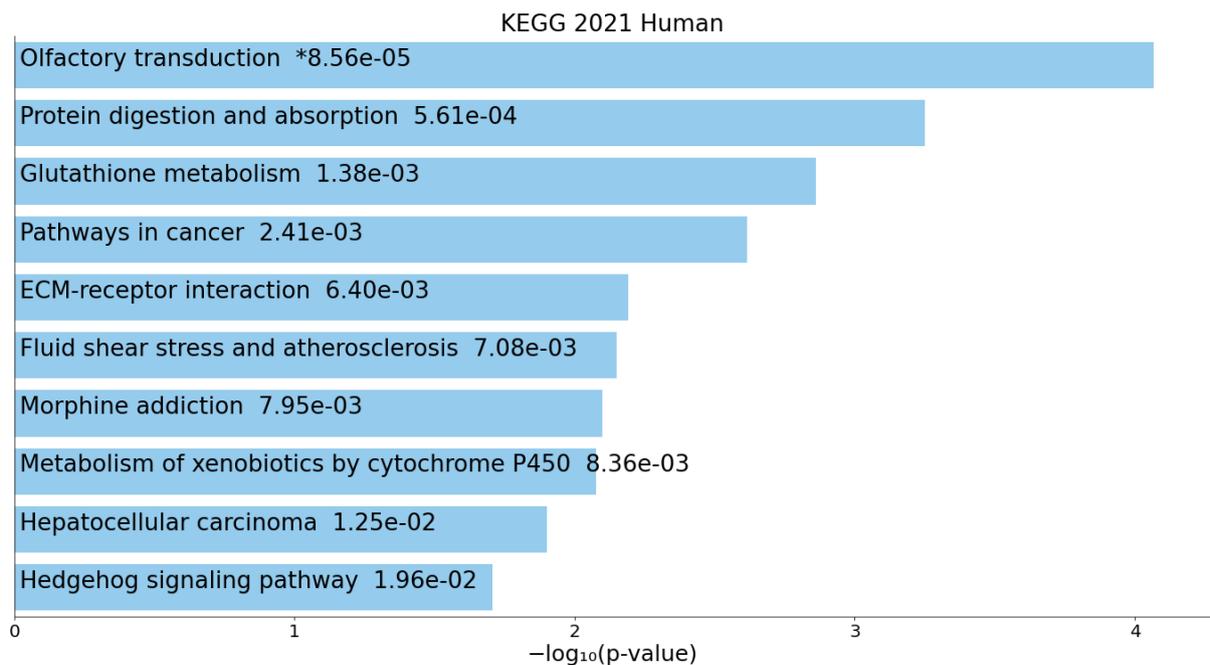


Figura 4.75: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes KEGG_2021_Human. Los 10 términos enriquecidos principales para el conjunto de genes de entrada se muestran en función del $-\log_{10}$ (valor p), y el valor p real se muestra junto a cada término. El término en la parte superior tiene la superposición más significativa con el conjunto de genes de consulta de entrada.

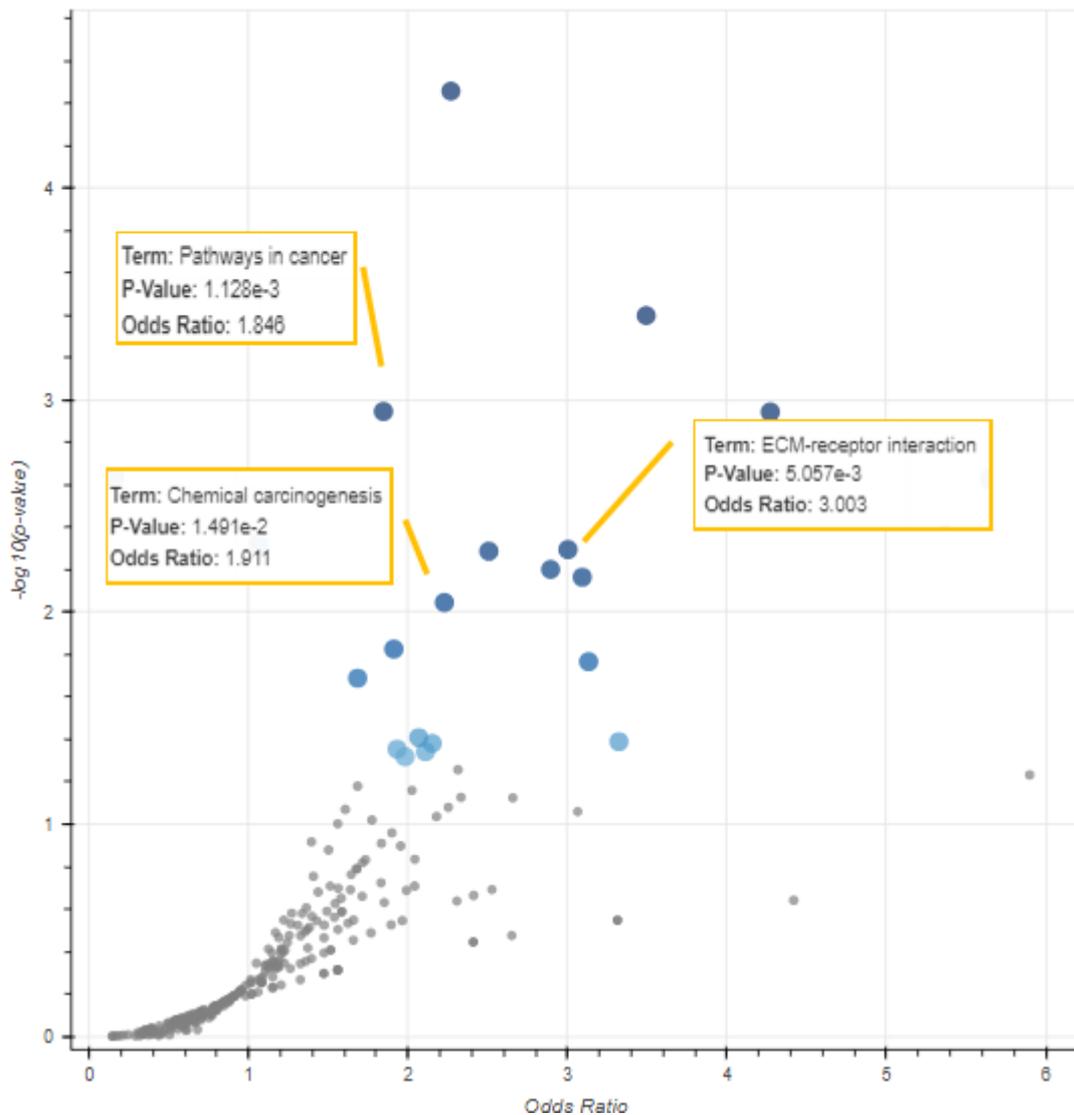


Figura 4.76: Gráfico de tipo volcán de los términos del conjunto de genes KEGG_2021_Human. Cada punto representa un término único, trazado por la relación de probabilidades correspondiente (posición x) y $-\log_{10}$ (valor p) (posición y) de los resultados de enriquecimiento del conjunto de genes de consulta de entrada. Cuanto más grande y de color más oscuro sea el punto, más significativamente se enriquecerá el conjunto de genes de entrada para el término. Señalando el punto se observa el término del conjunto de genes, el índice de probabilidades y el valor p del análisis de enriquecimiento. El gráfico del volcán muestra la importancia de cada conjunto de genes de la biblioteca seleccionada frente a su odds ratio. El eje x mide el odds ratio (0, ∞) calculado para el conjunto de genes, mientras que el eje y da el $-\log$ (valor p) del conjunto de genes. Los puntos azules más grandes representan términos significativos ($p < 0.05$); Los puntos grises más pequeños representan términos no significativos. Cuanto más oscuro es el color azul de un punto, más significativo es.

En MES destacamos las siguientes rutas con significación de $p < 0.05$: Rutas del Cáncer ($p = 0.0024$), Interacción del receptor ECM ($p = 0.0064$) y Carcinogénesis química ($p = 0.015$) (Figs. 4.75, 4.76).

En las AOIs S100+ estudiando los marcadores de melanoma y los propuestos en esta Tesis Doctoral, hay una expresión estadísticamente significativa en el grupo de MN de CDH2, EMP1, MLANA, HIF1 α , SOX10, TYR y CDH1 y en el grupo MES de CD3G, EML1 y con significación marginal IMP3 (Figs. 4.77, 4.78) (Tabla 4.28).

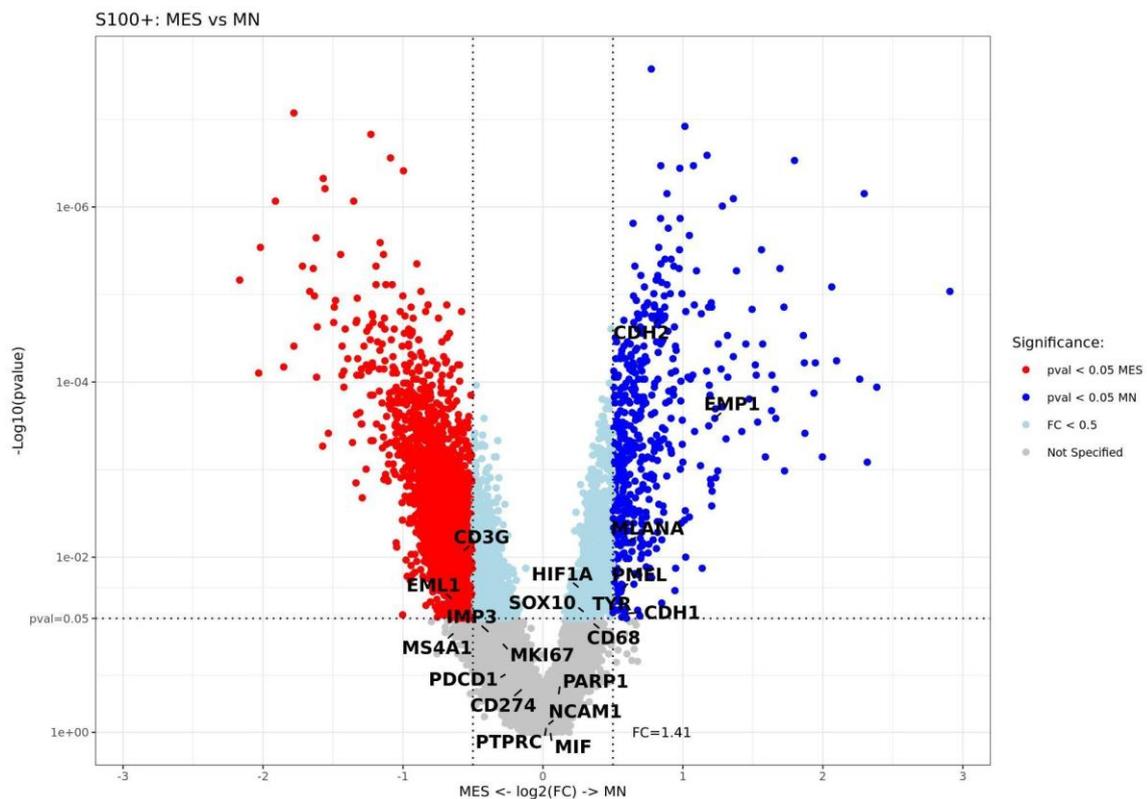


Figura 4.77: Gráfico de tipo volcán de los genes en los melanomas cutáneos comparando MES con MN en las áreas S100+. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. MES (rojo); MN (azul). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

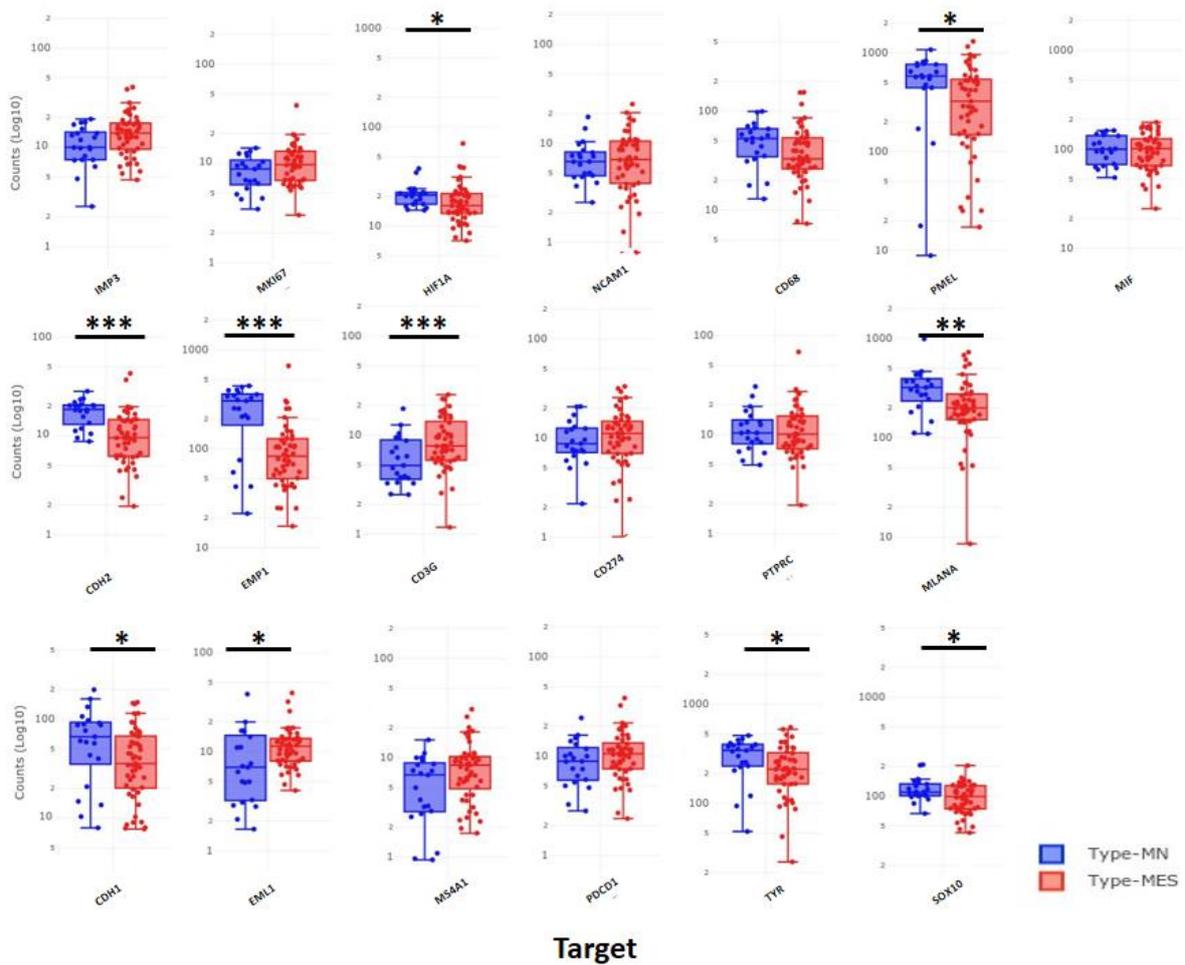


Figura 4.78: Diagrama de cajas de los anticuerpos estudiados mediante inmunohistoquímica comparando su expresión en MSE y MN. Media±SD. [CD45 (PTPRC), CD68, CD3 (CD3G), CD20 (MS4A1), CD56 (NCAM1), PD-L1 (CD274), PD1 (PDCD1), TYR (Tirosinasa), PMEL, Ki67 (MKI67), MART-1 (MLANA), MIF, EMP1, IMP3, SOX10, EML1 e HIF1α)]. T-test no pareado corrección Benjamin Hochberg. La significación se indica con *valor de $p < 0.05$, ** valor de $p < 0.01$, *** valor de $p < 0.001$.

Tabla 4.28: Marcadores histogenéticos de melanocitos en las AOIs S100+

Marcadores de melanocitos					
TYR	0.026	NCAM1	0.822	CD274	0.271
CD3G	0.008	MKI67	0.091	MLANA	0.006
MS4A1	0.072	SOX10	0.042	PDCD1	0.213
IMP3	0.056	EMP1	0.000	CD68	0.056
PTPRC	0.867	HIF1α	0.022	EML1	0.030
PMEL	0.023	MIF	0.098		
CDH1	0.044	CDH2	0.000		

Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg. Nombre del marcador y su p valor.

4.5.2.1.2 Comparación de la expresión del transcriptoma de MES versus MN en las áreas CD45+

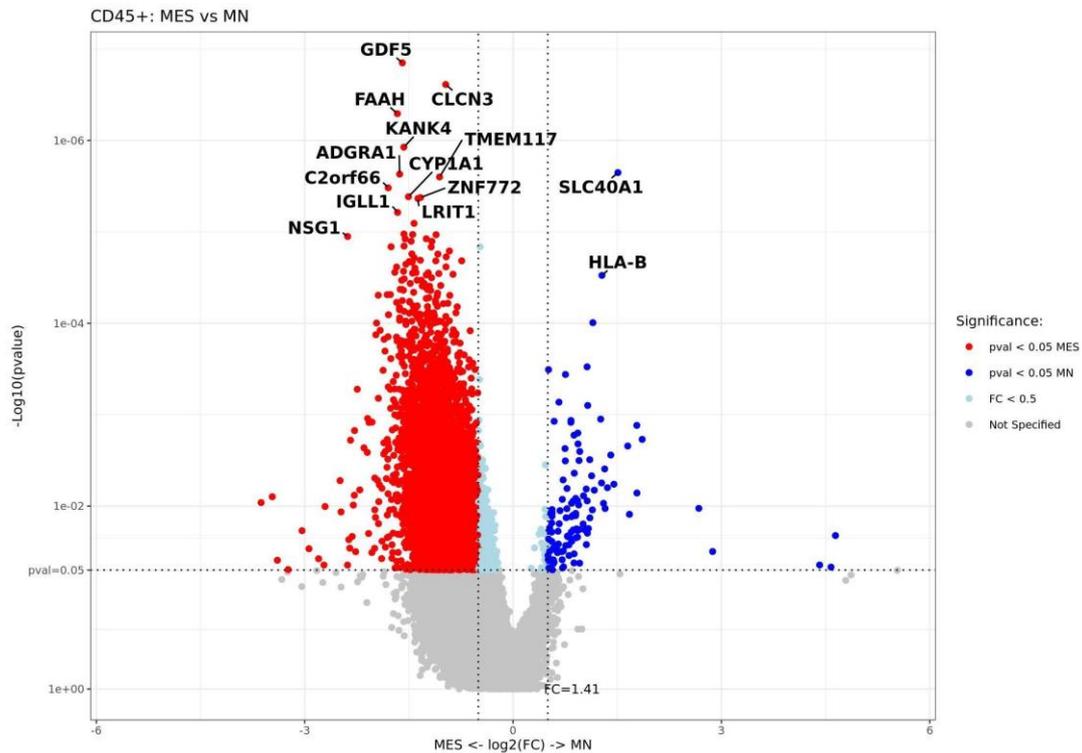


Figura 4.79: Gráfico de tipo volcán de los genes en los melanomas cutáneos comparando MES con MN en las áreas CD45+. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. MES (rojo); MN (azul). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

Comparando ambos tipos de melanoma en las AOIs de microambiente tumoral CD45+ hay una sobreexpresión de 141 sondas con $p < 0.05$ en MN; y con una $p < 0.01$ encontramos 81 sondas, y de ellos los que alcanzaron un “fold changes” (FC) mayor de 2 fueron 12 (Tabla 4.29) (Fig. 4.79).

Tabla 4.29: Genes sobreexpresados en el grupo MN comparado con el grupo MES en las AOIs CD45+

HLA-DQA1	IGHG3	IGKC	FCGR3A	TXNDC5	FN1	IGHG1
IGLL5	IGHG4	JCHAIN	IGHA1	IGHG2		

Destacar además los genes relacionados con la respuesta inmune TXNDC5 inducido por la hipoxia y que puede proteger a las células neoplásicas de la apoptosis.

Las rutas metabólicas extraídas de la inducción del conjunto de genes en MN se señalan en la Figura 4.80 y las más significativas en la Figura 4.81.

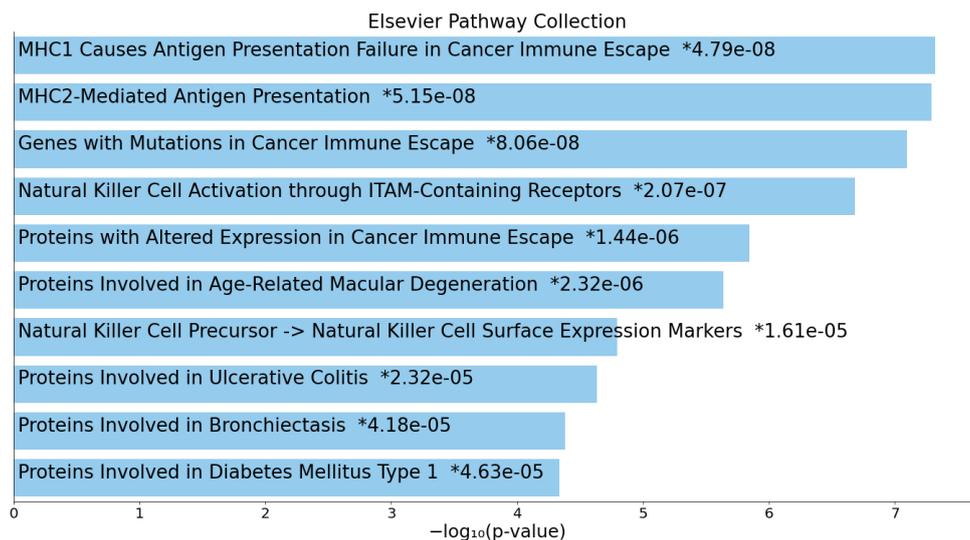


Figura 4.80: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes Elsevier_Pathway_Collection. Los 10 términos enriquecidos principales para el conjunto de genes de entrada se muestran en función del $-\log_{10}$ (valor p), y el valor p real se muestra junto a cada término. El término en la parte superior tiene la superposición más significativa con el conjunto de genes de consulta de entrada.

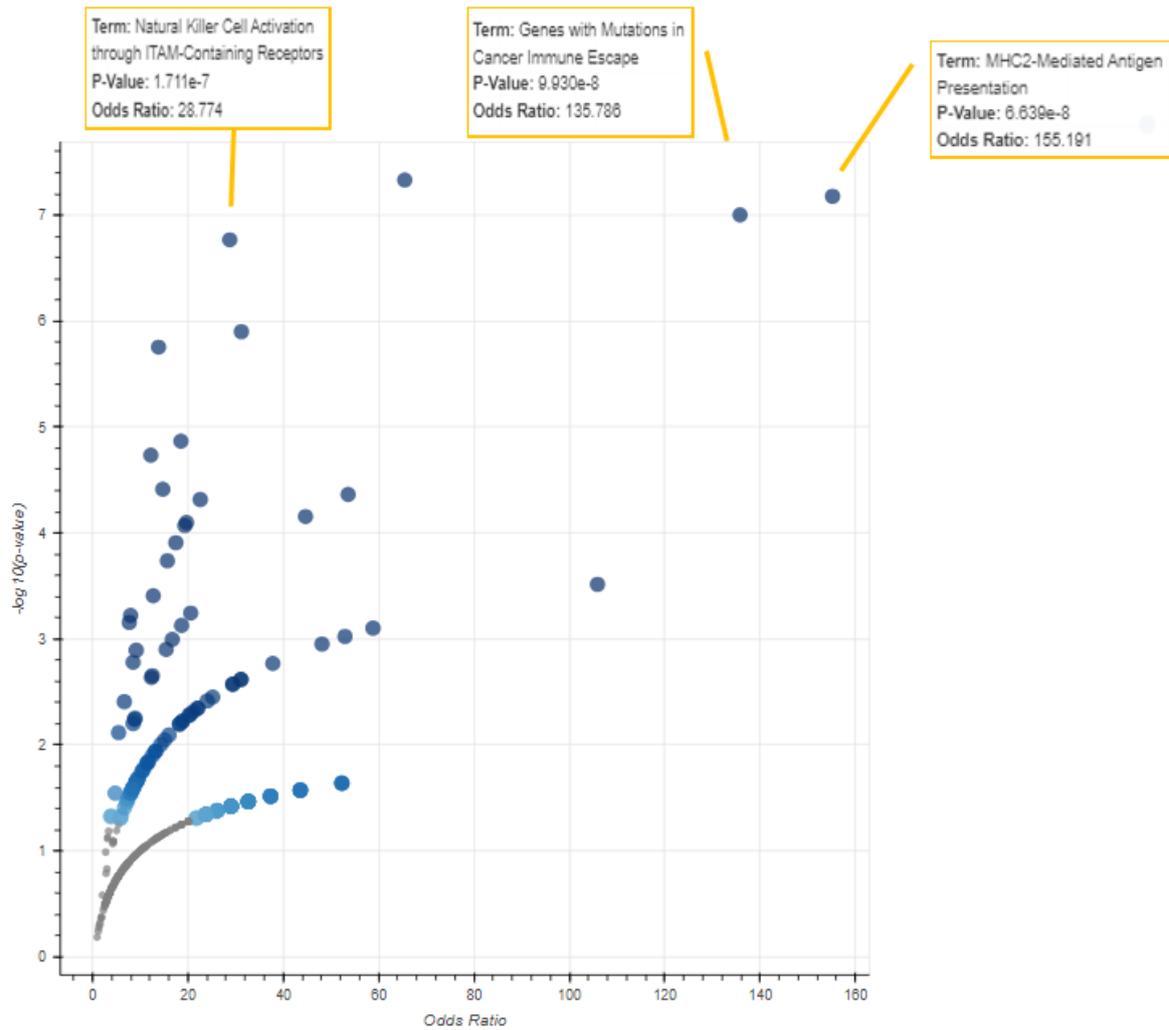


Figura 4.81: Gráfico de tipo volcán de los términos del conjunto de genes Elsevier_Pathway_Collection. Cada punto representa un término único, trazado por la relación de probabilidades correspondiente (posición x) y $-\log_{10}(\text{valor } p)$ (posición y) de los resultados de enriquecimiento del conjunto de genes de consulta de entrada. Cuanto más grande y de color más oscuro sea el punto, más significativamente se enriquecerá el conjunto de genes de entrada para el término. Señalando el punto se observa el término del conjunto de genes, el índice de probabilidades y el valor p del análisis de enriquecimiento. El gráfico del volcán muestra la importancia de cada conjunto de genes de la biblioteca seleccionada frente a su odds ratio. El eje x mide el odds ratio (0, inf) calculado para el conjunto de genes, mientras que el eje y da el $-\log$ (valor p) del conjunto de genes. Los puntos azules más grandes representan términos significativos (valor $p < 0.05$); Los puntos grises más pequeños representan términos no significativos. Cuanto más oscuro es el color azul de un punto, más significativo es.

En las AOIs CD45+ en el MES encontramos 6002 sondas sobreexpresadas comparado con el MN con un valor de $p < 0.05$; y 3869 sondas sobreexpresadas con un valor de $p < 0.01$, de los cuales 40 alcanzaron un “fold changes” mayor de 2 (Tabla 4.30).

Tabla 4.30: Genes sobreexpresados en el grupo MES comparado con el grupo MN en las AOIs CD45+

SPRR2G	SPINK5	C19orf33	S100A7	SPRR2A	KRT14	KRT10
GJB2	POF1B	SBSN	TACSTD2	FLG	CALML3	CASP14
KRT5	SPRR1B	FLG2	S100A8	KRT17	KRTDAP	IVL
NSG1	CALML5	SPRR2E	PKP1	GJB6	JUP	LORICRIN
DMKN	DSP	KRT16	KLK11	KLK7	CNFN	DSG1
SPRR1A	LY6D	KRT6A	TRIM29	KRT1		

Las rutas metabólicas extraídas de la inducción del conjunto de genes en MES se señalan en la Figura 4.82 y las más significativas en la Figura 4.83.

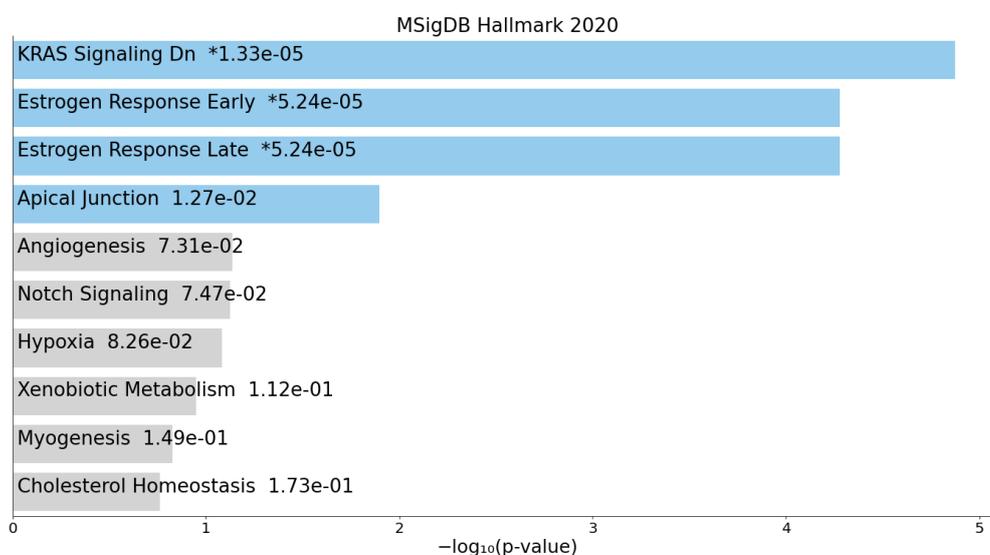


Figura 4.82: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes MSigDB_Hallmark_2020. Los 10 términos enriquecidos principales para el conjunto de genes de entrada se muestran en función del $-\log_{10}$ (valor p), y el valor p real se muestra junto a cada término.

El término en la parte superior tiene la superposición más significativa con el conjunto de genes de consulta de entrada.

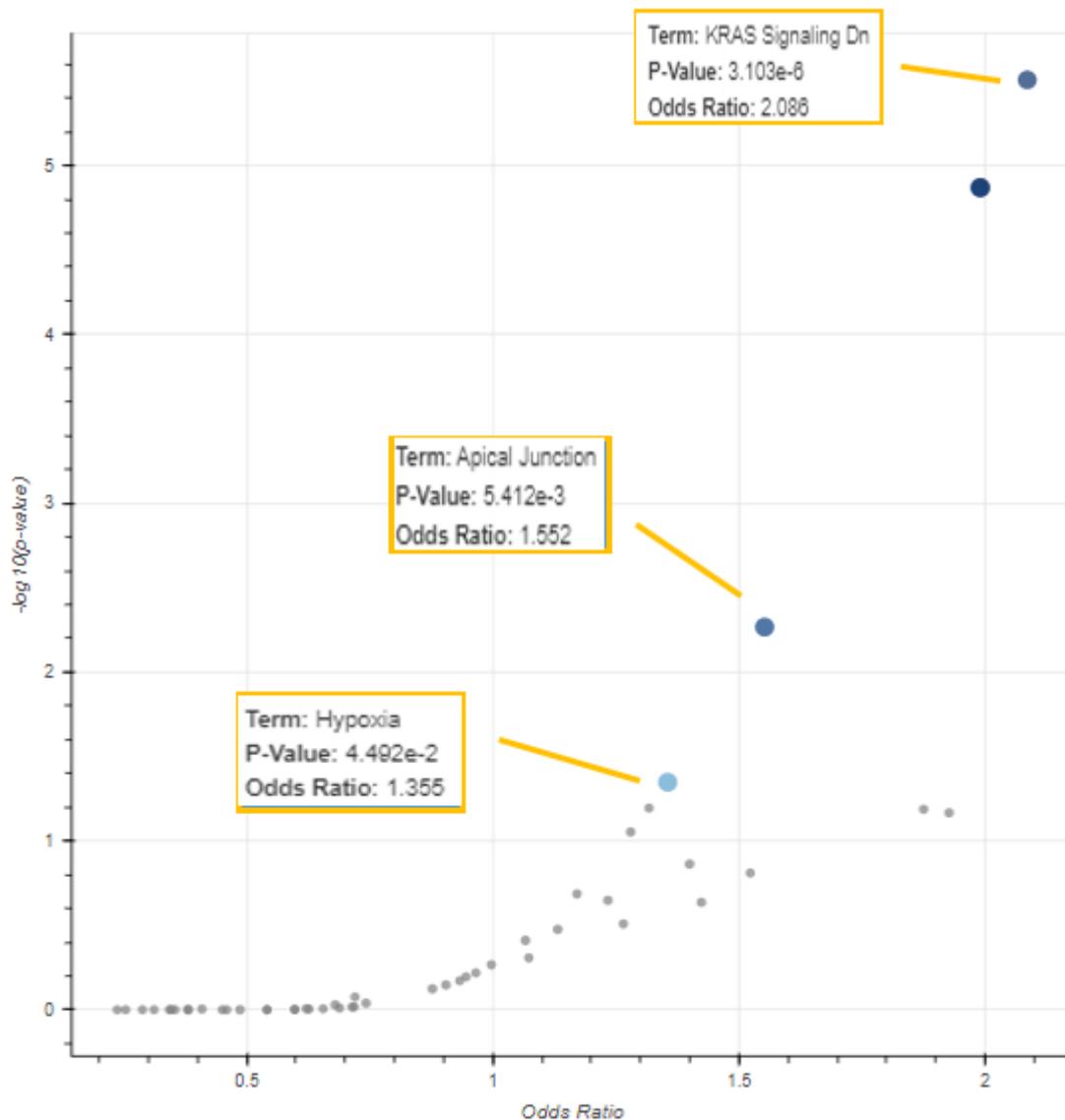


Figura 4.83: Gráfico de tipo volcán de los términos del conjunto de genes MSigDB_Hallmark_2020. Cada punto representa un término único, trazado por la relación de probabilidades correspondiente (posición x) y $-\log_{10}$ (valor p) (posición y) de los resultados de enriquecimiento del conjunto de genes de consulta de entrada. Cuanto más grande y de color más oscuro sea el punto, más significativamente se enriquecerá el conjunto de genes de entrada para el término. Señalando el punto se observa el término del conjunto de genes, el índice de probabilidades y el valor p del análisis de enriquecimiento. El gráfico del volcán muestra la importancia de cada conjunto de genes de la biblioteca seleccionada frente a su odds ratio. El eje x mide el odds ratio (0, inf) calculado para el conjunto de genes, mientras que el eje y da el $-\log$ (valor p) del conjunto de genes. Los puntos azules más grandes representan términos significativos (valor $p < 0.05$); Los puntos grises más pequeños representan términos no significativos. Cuanto más oscuro es el color azul de un punto, más significativo es.

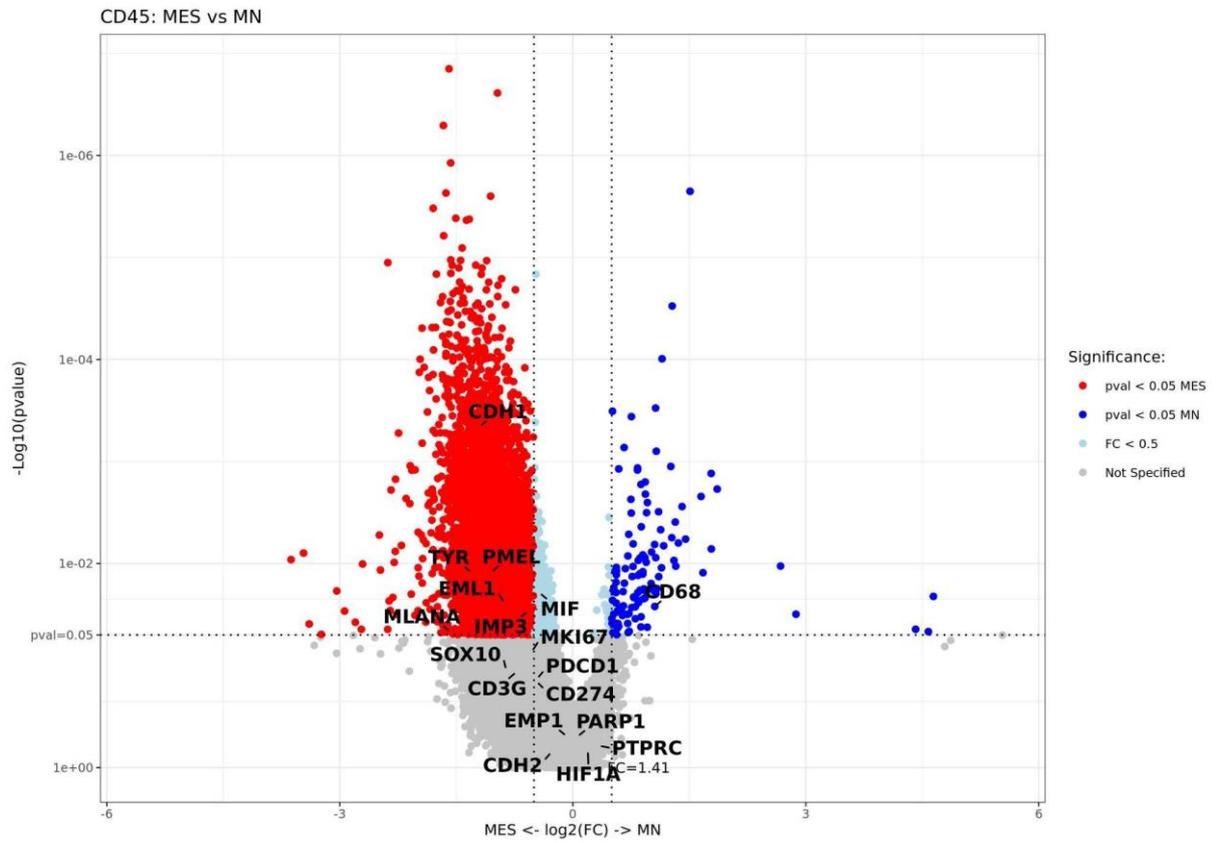


Figura 4.84: Gráfico de tipo volcán de los marcadores de melanoma en área CD45+ de ambos tipos de melanoma. El eje "x" muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje "y" indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC "fold change" a partir de los cuales se obtiene significación. Señalando las sondas que identifican los transcritos utilizados en inmunohistoquímica. MES (rojo); MN (azul). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

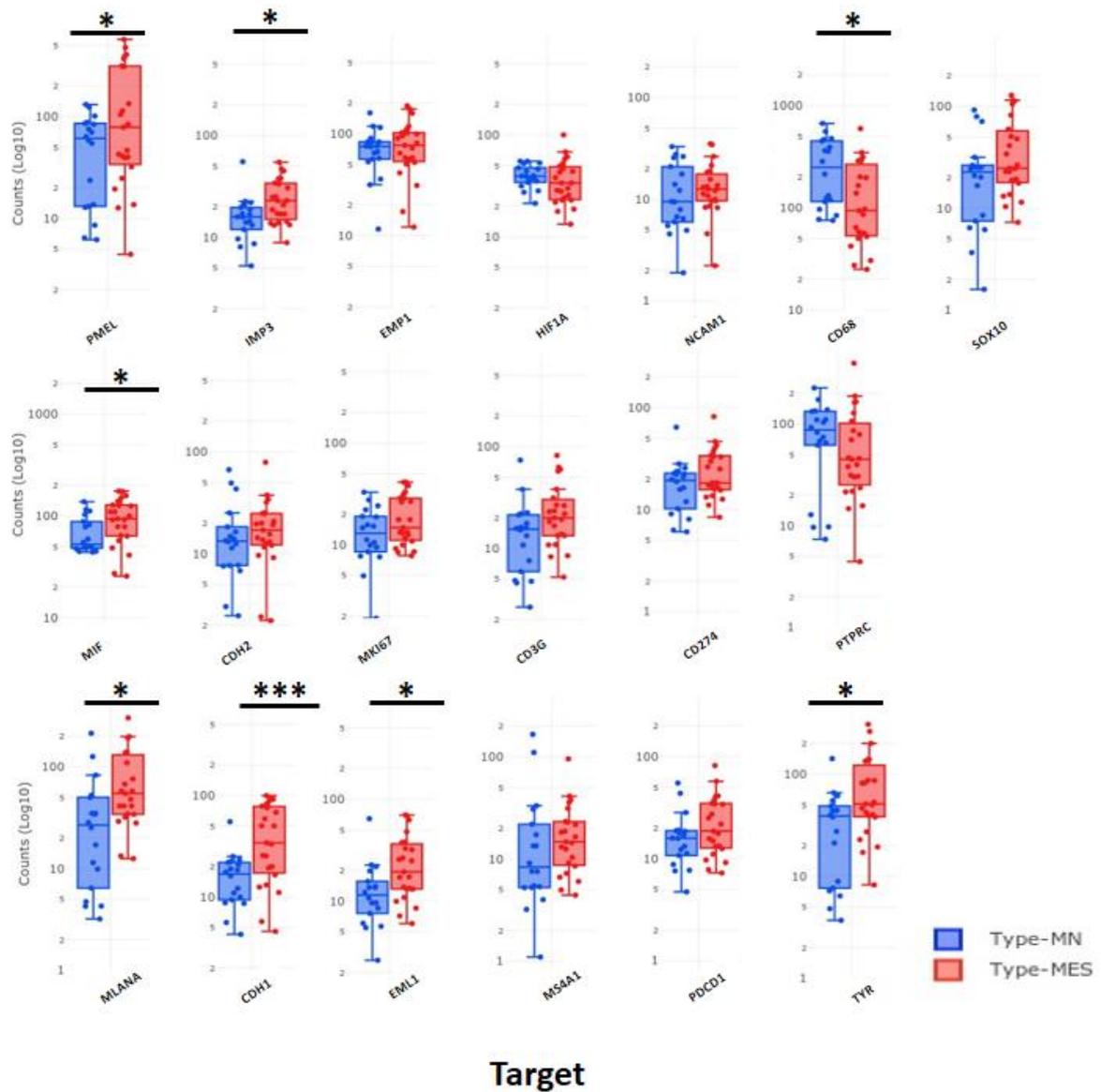


Figura 4.85: Diagrama de cajas de los anticuerpos estudiados mediante inmunohistoquímica. Media \pm SD. [CD45 (PTPRC), CD68, CD3 (CD3G), CD20 (MS4A1), CD56 (NCAM1), PD-L1 (CD274), PD1 (PDCD1), TYR (Tirosinasa), PMEL, Ki67 (MKI67), MART-1 (MLANA), MIF, EMP1, IMP3, SOX10, EML1 e HIF1 α]]. *T-test* no pareado corrección Benjamin Hochberg. La significación se indica con *valor de $p < 0.05$, ** valor de $p < 0.01$, * valor de $p < 0.001$.**

En los MES donde hemos comprobado la respuesta inmune más abundante destaca la expresión significativa en el microambiente tumoral de CDH1, TYR, MLANA, PMEL, EML1, IMP3 e HIF1 α en MES comparado con MN ($p=0.000$, $p=0.012$,

$p=0.046$, $p=0.012$, $p=0.023$, $p=0.029$ y $p=0.019$) y en MN encontramos solamente a CD68 ($p=0.026$) como se puede observar en las Figuras 4.84 y 4.85.

Con respecto a los genes empleados en la prueba 31-GEP para el estadiaje de los melanomas algunos de ellos son inducidos de manera significativa en los MES (Fig. 4.86) en áreas CD45+.

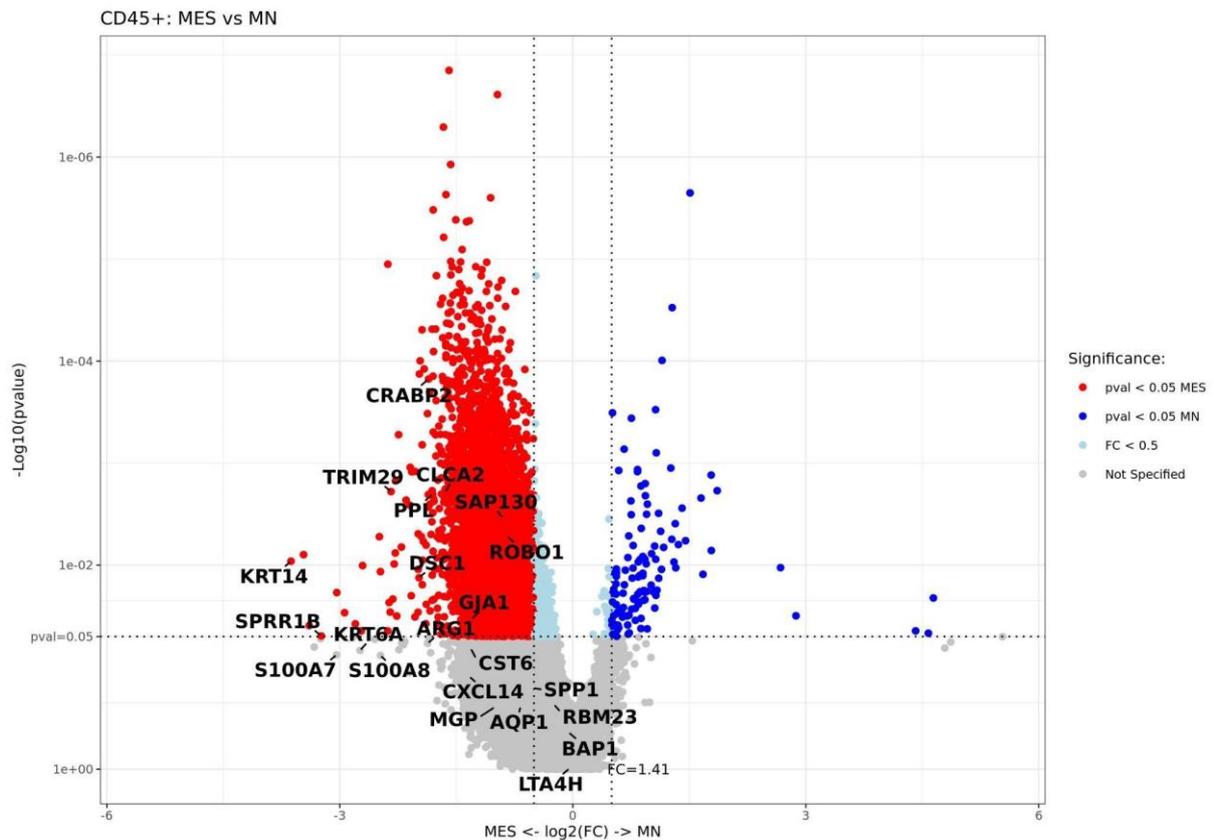


Figura 4.86: Gráfico de tipo volcán de los marcadores de la prueba 31-GEP en ambos tipos de melanoma cutáneo en las áreas CD45+. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. Señalando las sondas que identifican los transcritos utilizados en la prueba 31-GEP. MES (rojo); MN (azul). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

4.5.2.2 Comparación de la serie de melanomas cutáneos en función de la negatividad o positividad del ganglio centinela.

El transcriptoma de los melanomas con ganglio centinela positivo (pN#0) muestra diferencias significativas en un número importante de sondas. En los casos de melanoma GC+ detectamos 4264 sondas sobreexpresadas comparadas con GC- con un valor de $p < 0.05$ y 2253 sondas sobreexpresadas con un valor de $p < 0.01$ (Fig. 4.87; Tabla 4.31).

Tabla 4.31: Genes sobreexpresados en el grupo GC+ comparado con el grupo GC-

MGP	TUBB4A	QPRT	BCHE	S100B	BCAN	ABCA4
RTTN	TEX14	CDH9	ALK	OR2D3	FNTB	OR51H1
SELENBP1	ADGRB1	TRPM3	XKR3	KCNJ13	CCDC113	MAGEL2
FAM135B	GRIFIN	CC2D2A	CLEC11A	TEX19	TMEM98	CLRN1
SYCP1	CARTPT	MKRN3	MS4A3	PTK2	CES3	CRYBA2
NSG1	L1CAM					

Destacar ALK, receptor de la tirosín kinasa y PTK2 una protein kinasa no receptora relacionada con la migración celular y con la activación de MAPK1/ERK2, MAPK3/ERK1 y de la cascada de señalización de MAP kinasas. Igualmente la inducción de TEX19 está ligado a un peor pronóstico en algunas neoplasias (Fig. 4.87).

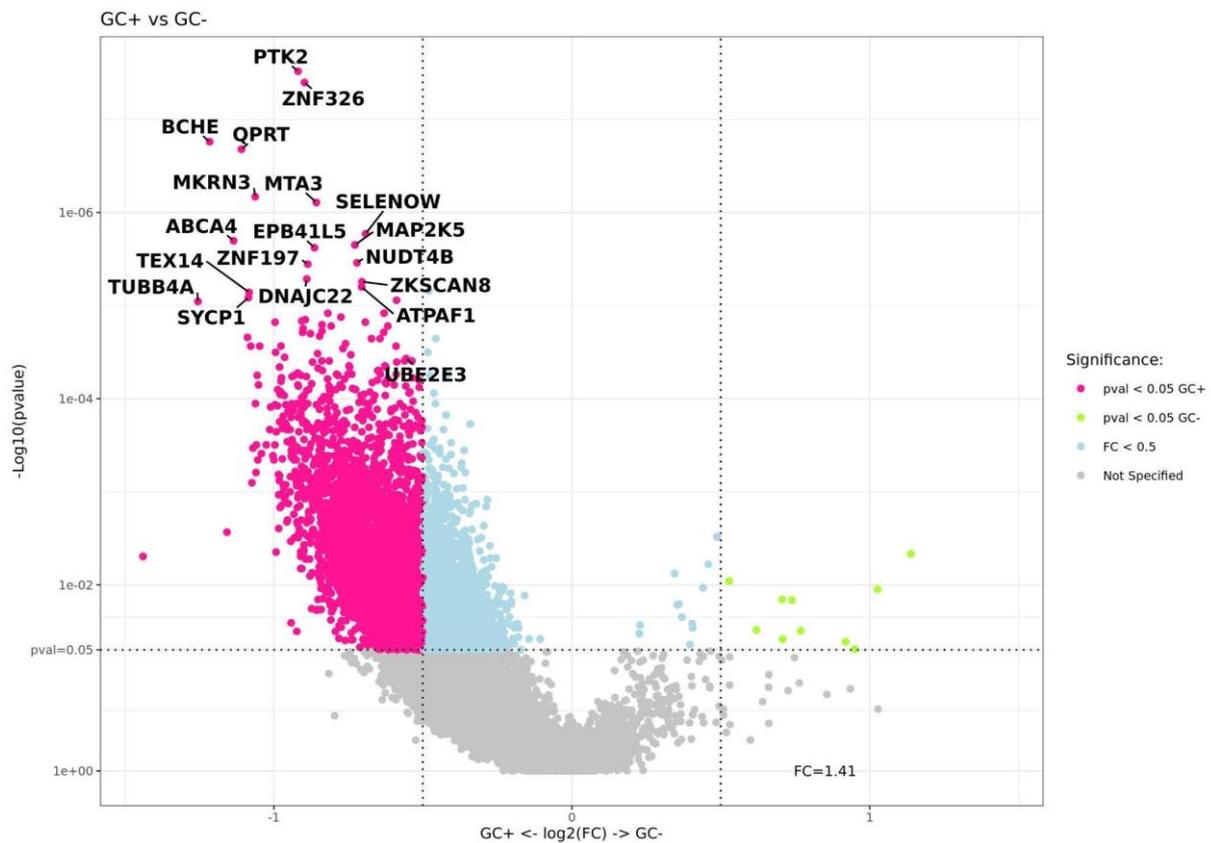


Figura 4.87: Gráfico de tipo volcán de la serie de melanomas con y sin metástasis ganglionares. GC+ (rosa) y GC- (verde). El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. GC+ (rosa); GC- (verde). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg, Mann Whitney BH.

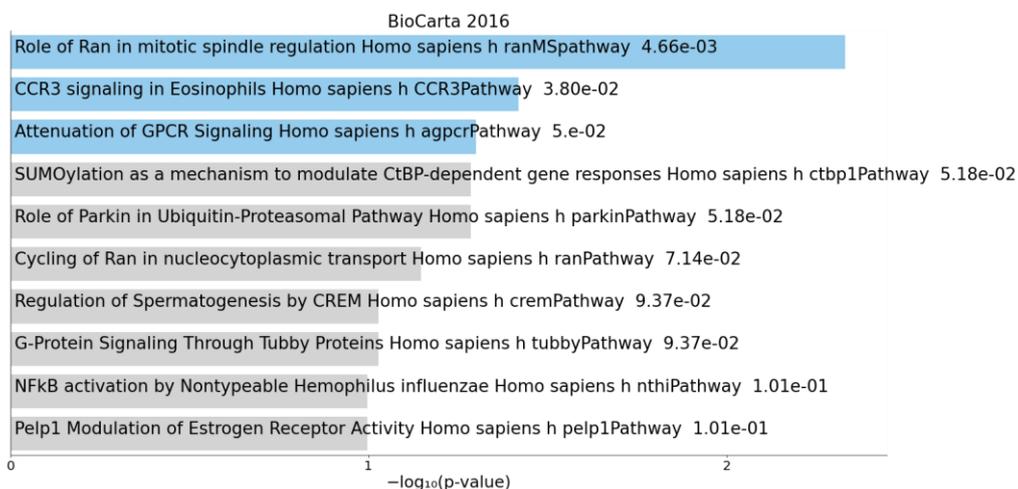


Figura 4.88. Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes BioCarta_2016. Los 10 términos enriquecidos principales para el conjunto de genes de entrada se muestran en función del $-\log_{10}$ (valor p), y el valor p real se muestra junto a cada término. El término en la parte superior tiene la superposición más significativa con el conjunto de genes de consulta de entrada.

Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) desempeñan funciones destacadas en la fisiología del linaje de los melanocitos, su activación inician la señalización celular que modula numerosos procesos celulares esenciales que ocurren durante la génesis del melanoma, incluida la proliferación y la migración. La señalización asociada a GPCR en el melanoma puede activarse mediante la unión de factores paracrinos a sus receptores o directamente mediante la activación de mutaciones (330).

Comparando en las AOIs GC- hay una sobreexpresión de 47 sondas con un valor de $p < 0.05$ y con un valor de $p < 0.01$ encontramos 11 (Tabla 4.32).

Tabla 4.32: Genes sobreexpresados en el grupo GC- comparado con el grupo GC+

ITGB8	TRAF7	ARSB	CELF2	MALSU1	MDFIC	FN1
HLA-B	TAP1	ABHD12	MRPS24			

Todas ellas en el estudio de enriquecimiento dieron como resultado las siguientes rutas con valor estadísticamente significativo (Fig. 4.89):

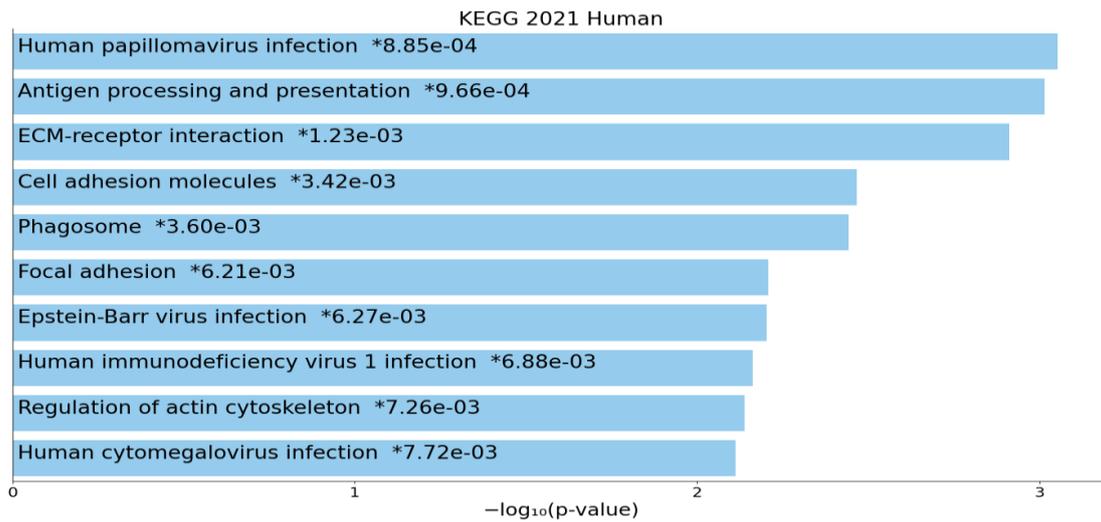


Figura 4.89: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes KEGG_2021_Human. Los 10 términos enriquecidos principales para el conjunto de genes de entrada se muestran en función del $-\log_{10}$ (valor p), y el valor p real se muestra junto a cada término. El término en la parte superior tiene la superposición más significativa con el conjunto de genes de consulta de entrada.

Los mapas de calor supervisados para los biomarcadores incluido IMP3 (Fig 4.90A) y en general todo el transcriptoma (Fig 4.90B) permite separar los melanomas que ha diseminado a ganglios linfáticos de los que permanecen localizados en la piel.

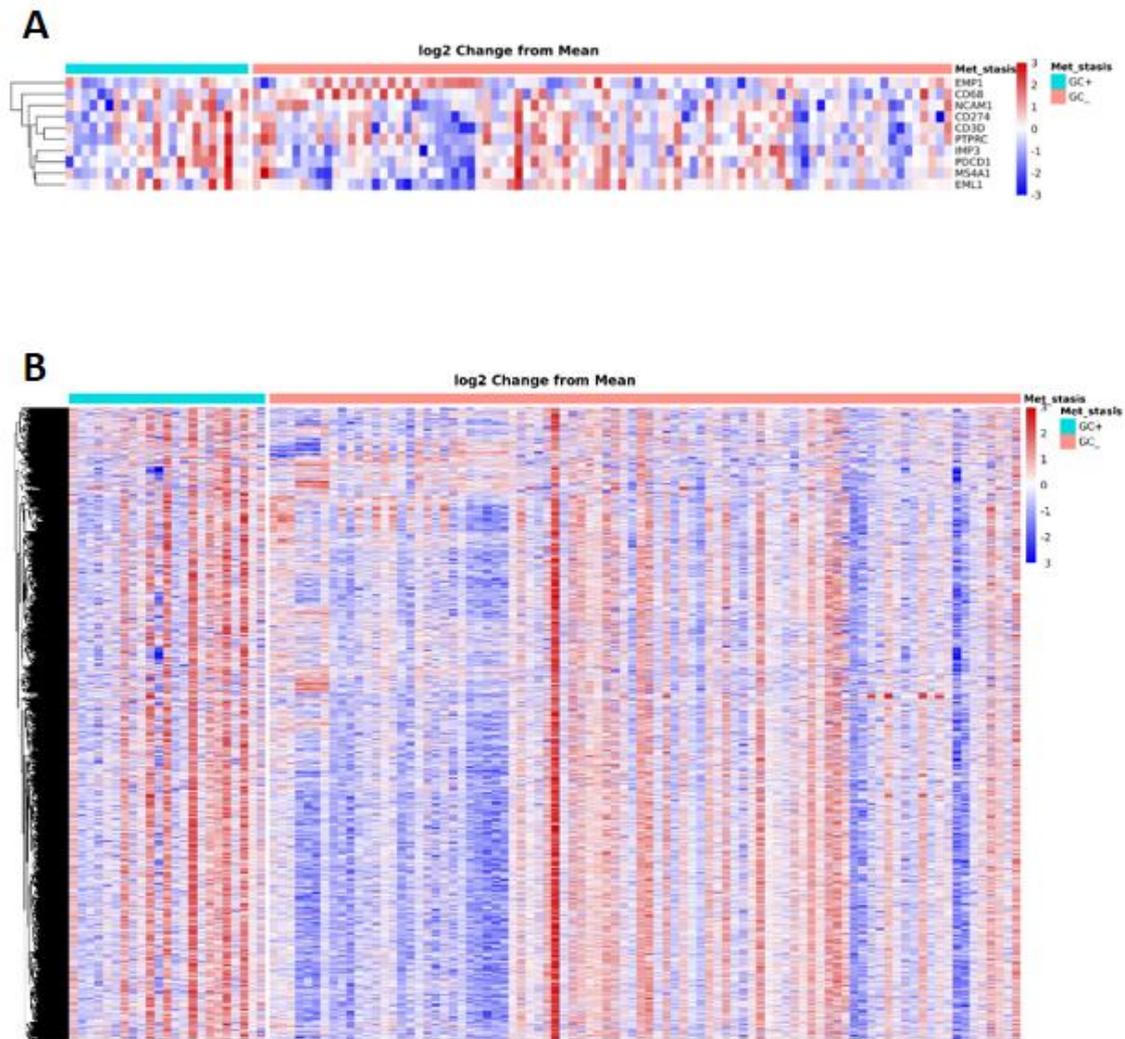


Figura 4.90. A) *Heatmap* supervisado de los anticuerpos estudiados en la Tesis Doctoral en ambas AOIs comparando los casos con diseminación ganglionar y los localizados B) *Heatmap* supervisado comparando los casos de melanoma GC+ vs. GC-.

Dentro de los marcadores estudiados en esta Tesis Doctoral encontramos que IMP3, CD3 y EML1 mostraron diferencias estadísticamente positivas en el grupo pN≠0, ($p=0.03$, $p=0.01$ y $p=0.02$) (Fig. 4.91). Sin embargo, los genes de la prueba 31-GEP no muestran grandes diferencias significativas entre los melanomas con afectación ganglionar con los pN=0 (Fig. 4.92).

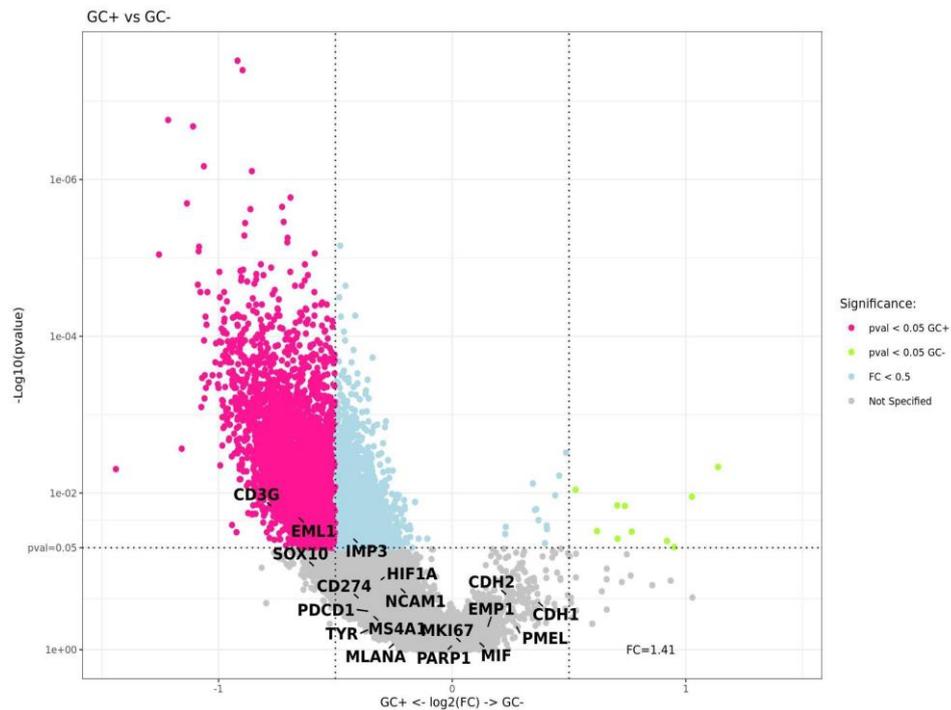


Figura 4.91: Gráfico de tipo volcán de los marcadores histogenéticos de melanocitos en los casos con y sin metástasis ganglionares. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. GC+ (rosa); GC- (verde). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

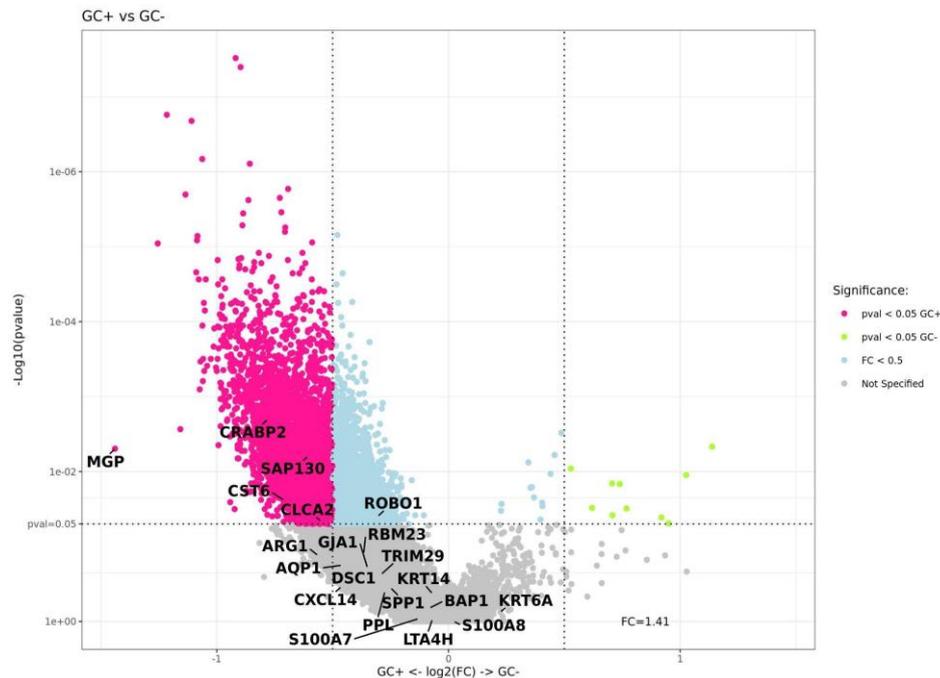


Figura 4.92: Gráfico de tipo volcán de los marcadores de la prueba 31-GEP en los casos con y sin metástasis ganglionares. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje

“y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. GC+ (rosa); GC- (verde). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

Destacar que los marcadores IMP3, EML1 y el infiltrado de linfocitos T (CD3+) han resultado ser mayor expresados en los melanomas pN#0 (Fig. 4.93).

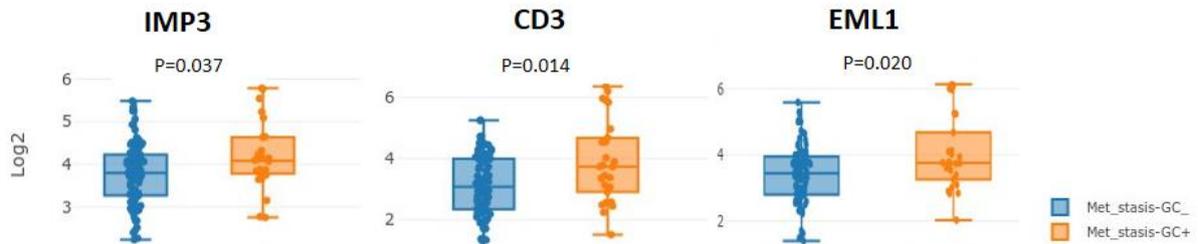


Figura 4.93: Diagrama de cajas de los transcritos en melanoma cutáneo con metástasis (GC+) y sin metástasis (GC-) en ganglios linfáticos. Media±SD. [IMP3, CD3 (CD3G), EML1]. *T-test* no pareado corrección Benjamin Hochberg.

4.5.2.2.1 Comparación de la serie de melanomas cutáneos en función de la negatividad o positividad del ganglio centinela en ROIs (S100+).

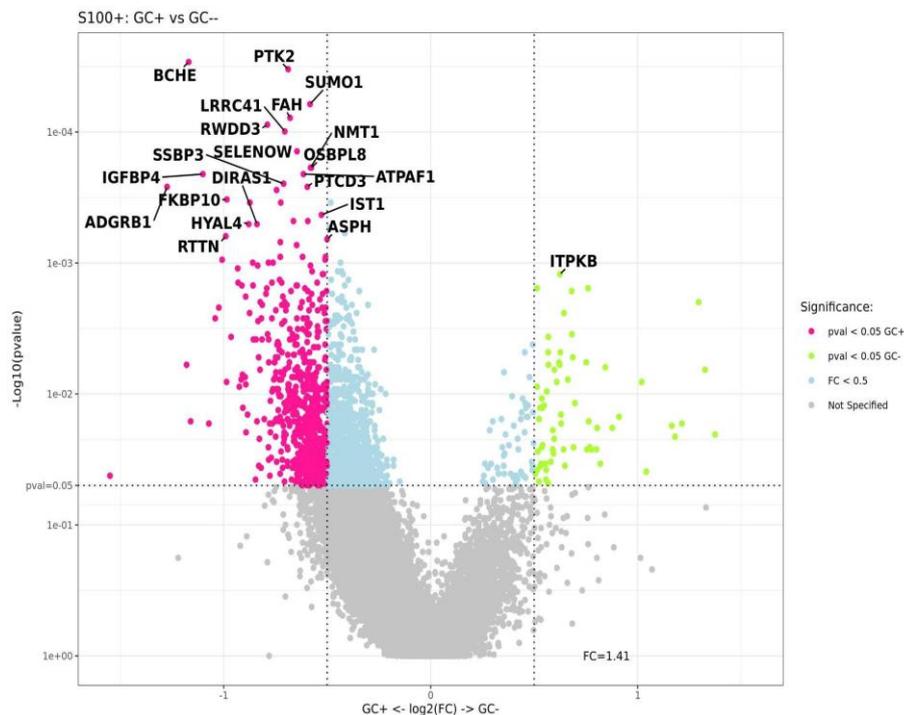


Figura 4.94: Gráfico de tipo volcán de la serie de melanomas con y sin metástasis ganglionares en las AOI S100+. El eje "x" muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje "y" indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC "fold change" a partir de los cuales se obtiene significación. GC+ (rosa); GC-. Prueba U-Mann Whitney corrección Benjamini Hochberg.

Comparando las áreas GC+ en S100+ encontramos 2632 sondas sobreexpresadas comparadas con GC- con un valor de $p < 0.05$ y 1256 sondas sobreexpresadas con un valor de $p < 0.01$ (Fig. 4.95) (Tabla 4.33).

Tabla 4.33: Genes sobreexpresados en el grupo GC+ comparado con el grupo GC- en las AOIs S100+

ADGRB1	COL1A2	BCHE	SERPINF1	IGFBP4	RGS1	IGFBP5
COL6A2	TUBB4A	RTTN	COL6A1	FKBP10	GNG7	NLRP1
CLEC11A	FGFR1	KIF7	MAPT	LRRC39	CAMK2N1	ITM2C
PRAG1	UPK1B	COL3A1	DEPP1	GRIFIN	HYAL4	BGN
ABCA1	CSN3	OR52E6	GSTM3	AFAP1L2	F13A1	DIRAS1
NNT	SYCP1	CES3	RUBCNL	ZEB1	OR2D3	COL6A3
ABCA4	ITIH6	CALR3	CCDC113	RWDD3	GLIS1	QPRT
KCNMB4	LY9	FSTL1	CDH9	CDIN1	LDB2	KCNA7
OR10G6	RGS5	DENND2A	TNS2	CYP7B1	GSN	OR6F1
OR56A1	GARNL3	SCN1B	H2BC8	GIMAP6	RPL22L1	TUB
TM6SF2	ZNF197	FAM166C	CAPN9	TBX3	FXYD1	RASAL3
AKNA	RNF180	CELF5	TSPYL5	MAGI2	SLC10A1	ESM1
ADNJC22						

Entre todos ellos hemos observado que la ruta Transición epitelio mesénquima, se encontraba expresada con un valor estadísticamente significativo de $p=0.014$ compuesto por los siguientes genes [ITGB5, IGFBP4, FUCA1, BGN, P3H1, PCOLCE, FBLN1, TNFRSF11B, FSTL1, FBLN2, RGS4, GREM1, COL1A2, CXCL12, COL5A1, ID2, COL6A2, SERPINH1, COL6A3, EDIL3, SNTB1] (Fig. 4.95).

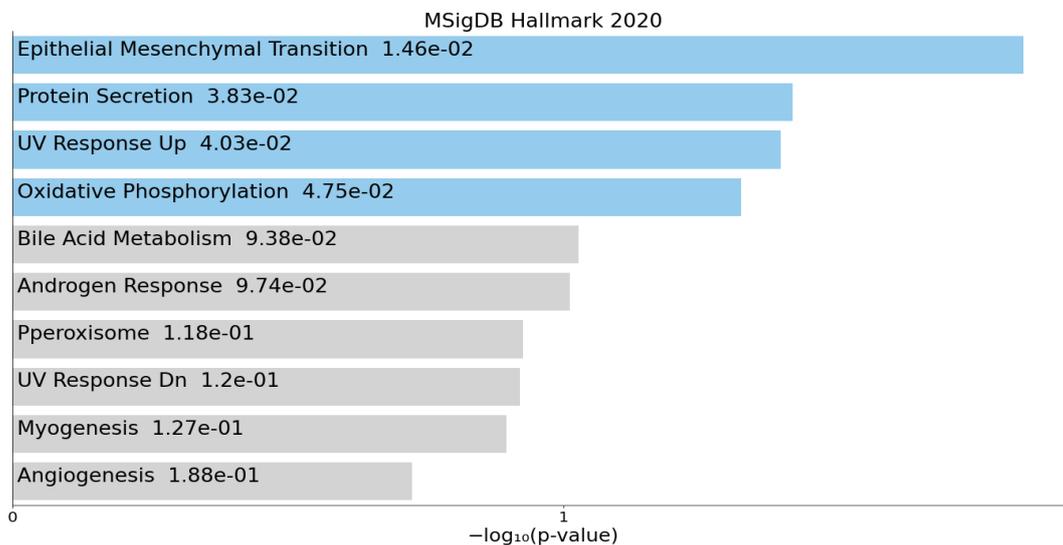


Figura 4.95: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes MSigDB_Hallmark_2020. Los 10 términos enriquecidos principales para el conjunto de genes de entrada se muestran en función del $-\log_{10}$ (valor p), y el valor p real se muestra junto a cada término. El término en la parte superior tiene la superposición más significativa con el conjunto de genes de consulta de entrada.

En las AOIs GC- hay una sobreexpresión de 79 sondas con un valor de $p < 0.05$ en S100+; y con un valor de $p < 0.01$ encontramos 32 (Tabla 4.34). Entre ellas destaca la E-Cadherina, VGF así como TRIP6 y FN1 implicados en la adhesión celular y la melanogénesis. Así como otras moléculas como CAPN2 implicada en la senescencia celular (Fig. 4.96).

Tabla 4.34: Genes sobreexpresados en el grupo GC- comparado con el grupo GC+ en las AOIs S100+

CNOT6	ARID1B	ARHGDI1A	ETV4	MAFF	PKD2	WDR54
LMF2	TMCO3	CCN3	CDH1	ITPKB	ZBTB5	VEGF
CSTB	PPIAL4A	ACOT7	CAPN2	ARSB	CELF2	MDFIC
FN1	SLC50A1	NFIB	ENTPD6	PLXNC1	ANKRD10	YWHAH
TRIP6	LARP1	MRPS24	BAMBI			

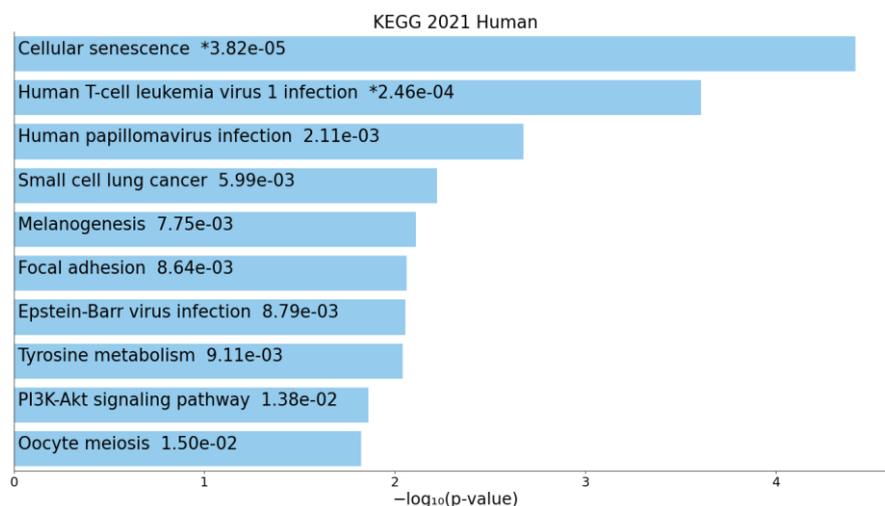


Figura 4.96: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes BioCarta_2016. Los 10 términos enriquecidos principales para el conjunto de genes de entrada se muestran en función del $-\log_{10}$ (valor p), y el valor p real se muestra junto a cada término. El término en la parte superior tiene la superposición más significativa con el conjunto de genes de consulta de entrada.

Encontramos diferencias significativas en $pN \neq 0$ con los $pN = 0$ en los marcadores de melanoma cuando se evalúan sólo las AOI S100+ con las sondas de IMP3, EML1 y CDH1 ($p=0.04$, $p=0.02$ y $p=0.01$, respectivamente) (Fig. 4.97), con respecto a los genes de la prueba 31-GEP no hubo diferencias significativas destacables (Fig. 4.98).

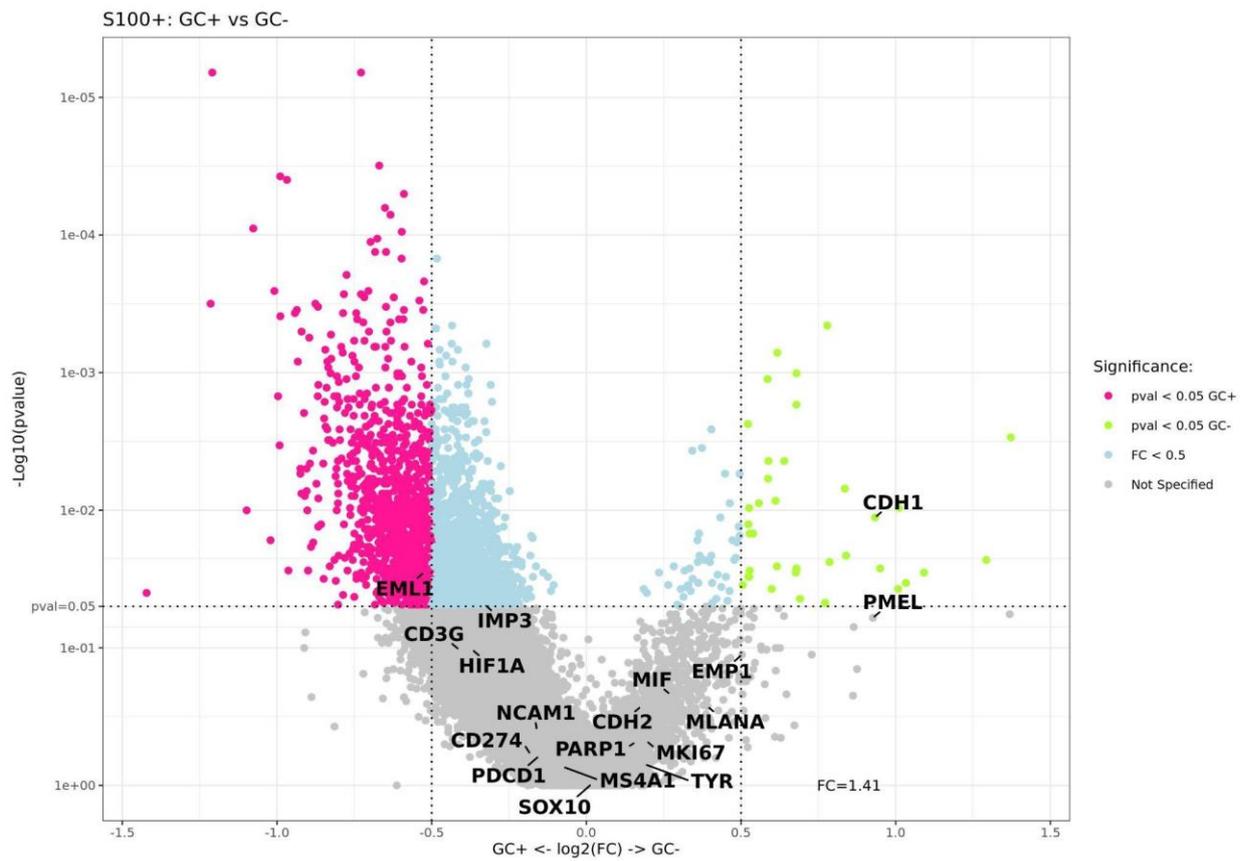


Figura 4.97: Gráfico de tipo volcán de los marcadores histogénéticos de melanocitos en los casos con y sin metástasis ganglionares en las AOI S100+. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. GC+ (rosa); GC- (verde). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

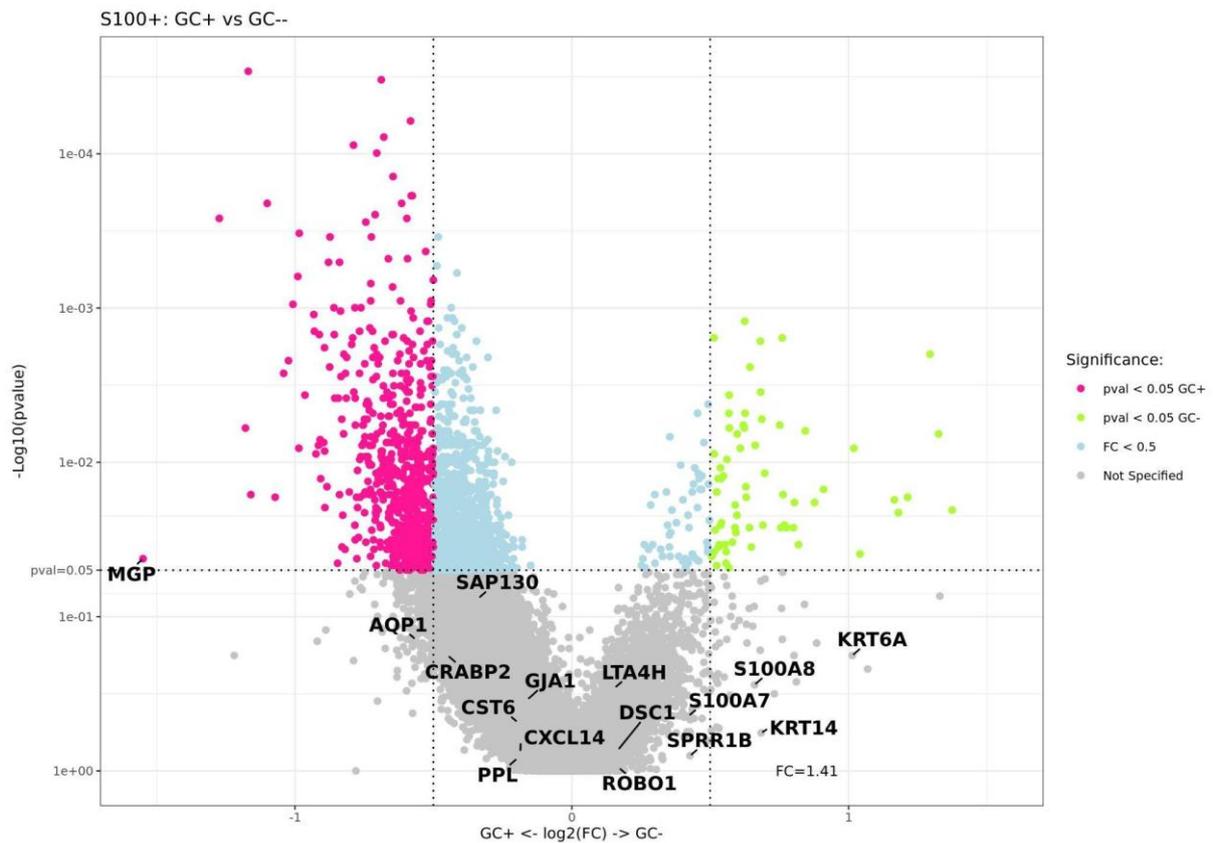


Figura 4.98: Gráfico de tipo volcán de los marcadores empleados en la prueba 31-GEP en los casos con y sin metástasis ganglionares en las AOI S100+. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. GC+ (rosa); GC- (verde). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

4.5.2.2.2 Comparación de la serie de melanomas cutáneos en función de la negatividad o positividad del ganglio centinela en ROIs (CD45+)

Comparando las áreas GC+ en CD45+ encontramos 5364 sondas sobreexpresadas comparadas con GC- con un valor de $p < 0.05$ y 1781 sondas sobreexpresadas con un valor de $p < 0.01$ (Fig. 4.99). De los cuales los siguientes tres tienen un $FC < 2$: FGFBP2, CLRN1 y MYH7.

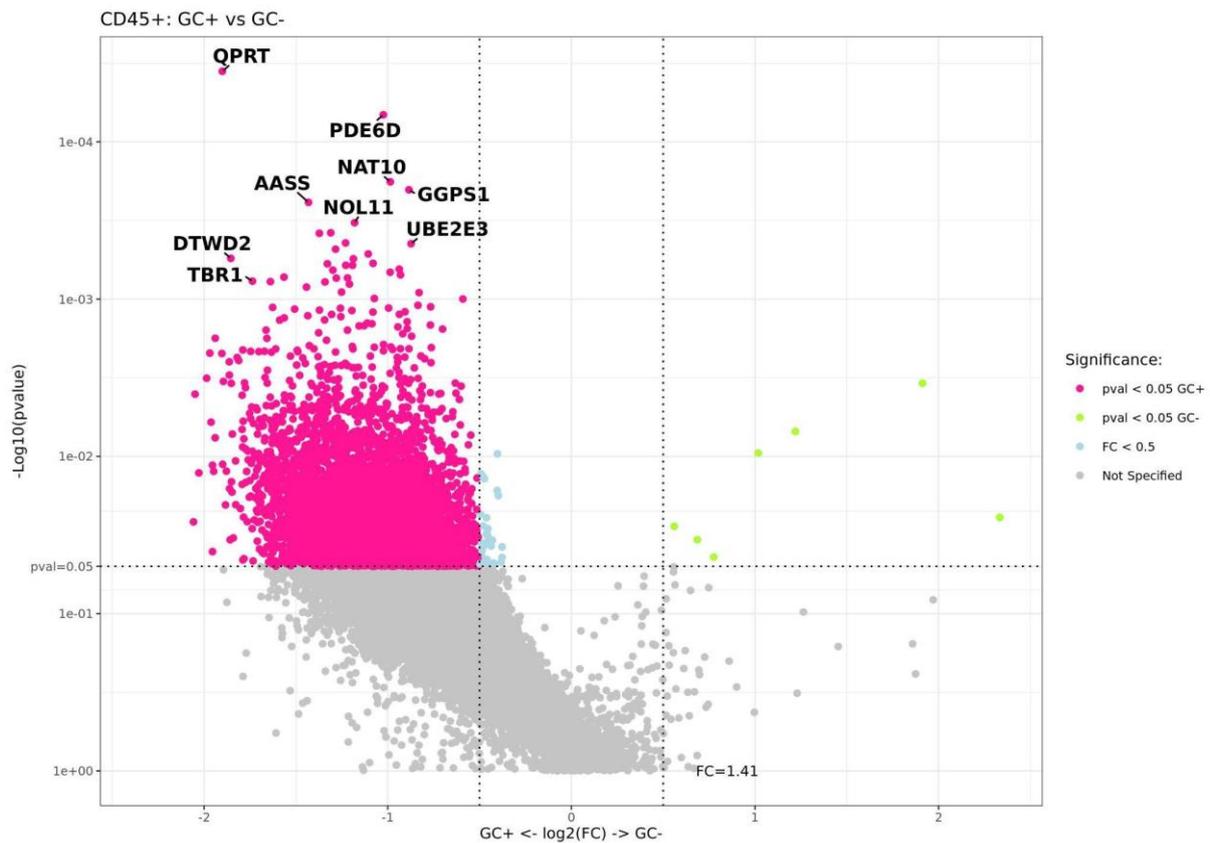


Figura 4.99: Gráfico de tipo volcán de la serie de melanomas con y sin metástasis ganglionares en las AOI CD45+. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. GC+ (rosa); GC- (verde). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

Encontramos entre las rutas significativamente expresadas en $pN \neq 0$ la ruta de señalización de regulación NODAL (Fig. 4.100). Nodal es un morfógeno embrionario que pertenece a la superfamilia TGF- β , es un importante regulador del destino de las células madre embrionarias. Recientemente han demostrado Strizzi y colaboradores que Nodal se expresa significativamente en melanoma agresivo. Está propuesto como nuevo marcador de diagnóstico y un objetivo terapéutico en el melanoma, ya que promueve procesos de agresión tumoral (393, 394).

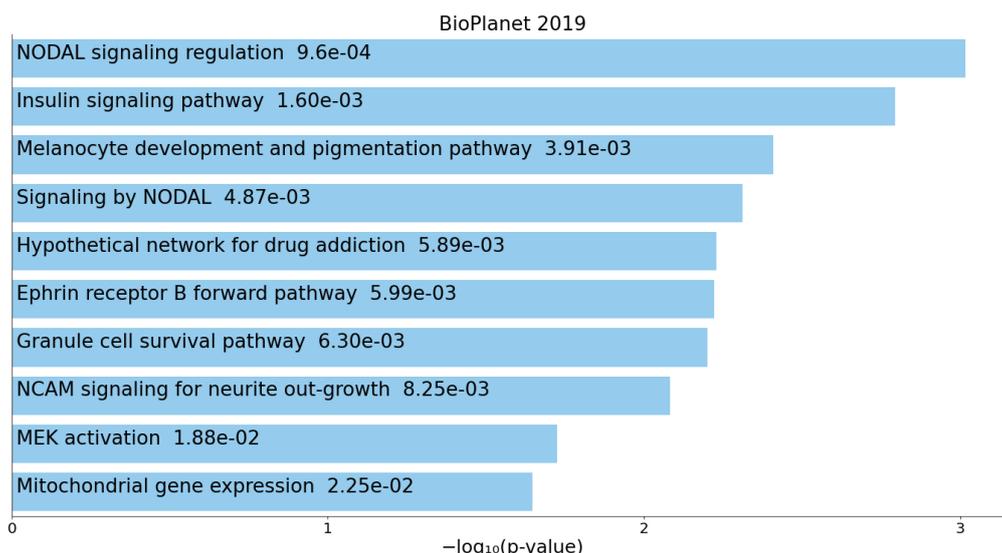


Figura 4.100: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes **BioPlanet_2019**. Los 10 términos enriquecidos principales para el conjunto de genes de entrada se muestran en función del $-\log_{10}$ (valor p), y el valor p real se muestra junto a cada término. El término en la parte superior tiene la superposición más significativa con el conjunto de genes de consulta de entrada.

En las AOIs GC- hay una sobreexpresión de 7 sondas con un valor de $p < 0.05$ en CD45+ (Tabla 4.35) y con un valor de $p < 0.01$ encontramos 3. Siendo sus rutas metabólicas destacadas y significativas las que se detallan en la Figura 4.101.

Tabla 4.35: Genes sobreexpresados en el grupo GC- comparado con el grupo GC+ en las AOIs CD45+

FCGR3A	LYZ	SERPINE1	JCHAIN	APOC1	IGHA1	H4C12
--------	-----	----------	--------	-------	-------	-------

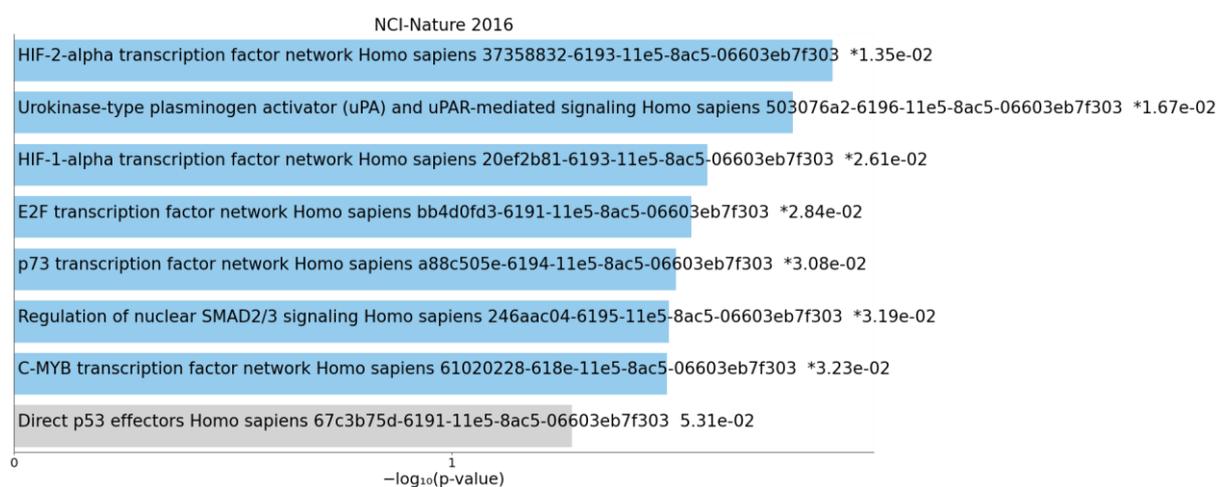


Figura 4.101: Gráfico de barras de los términos más enriquecidos de la biblioteca de conjuntos de genes NCI-Nature_2016. Los 10 términos enriquecidos principales para el conjunto de genes de entrada se muestran en función del $-\log_{10}$ (valor p), y el valor p real se muestra junto a cada término. El término en la parte superior tiene la superposición más significativa con el conjunto de genes de consulta de entrada.

Encontramos diferencias significativas en el grupo $pN \neq 0$ en los marcadores de melanoma CD3, SOX10, PD-L1 (CD274), EML1 y marginalmente IMP3 ($p=0.007$, $p=0.018$, $p=0.040$, $p=0.049$ y $p=0.055$) (Fig. 4.102). Con respecto a los genes de la prueba 31-GEP no muestran grandes diferencias significativas entre los melanomas con afectación ganglionar con los $pN=0$ cuando se evalúan sólo las AOI CD45+ (Fig. 4.103). Siendo el transcriptoma en las áreas CD45+ entre los casos GC+ y GC- diferentes según se extrae del análisis del *heatmap* (Fig. 4.104)

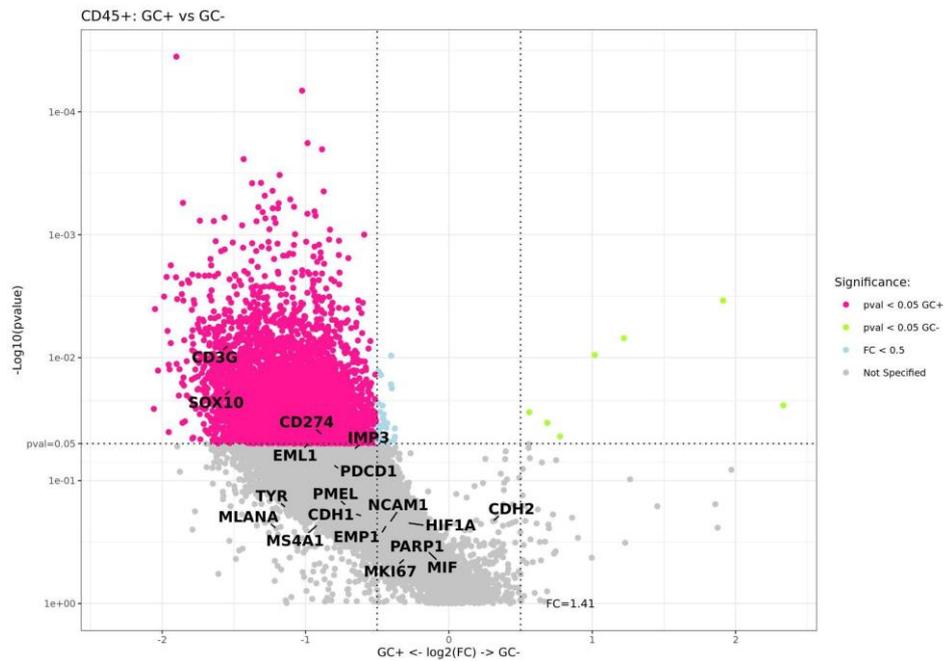


Figura 4.102: Gráfico de tipo volcán de los marcadores histogenéticos de melanocitos en los casos con y sin metástasis ganglionares en las AOI CD45+. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. GC+ (rosa); GC- (verde). T-test no pareado corrección Benjamin Hochberg.

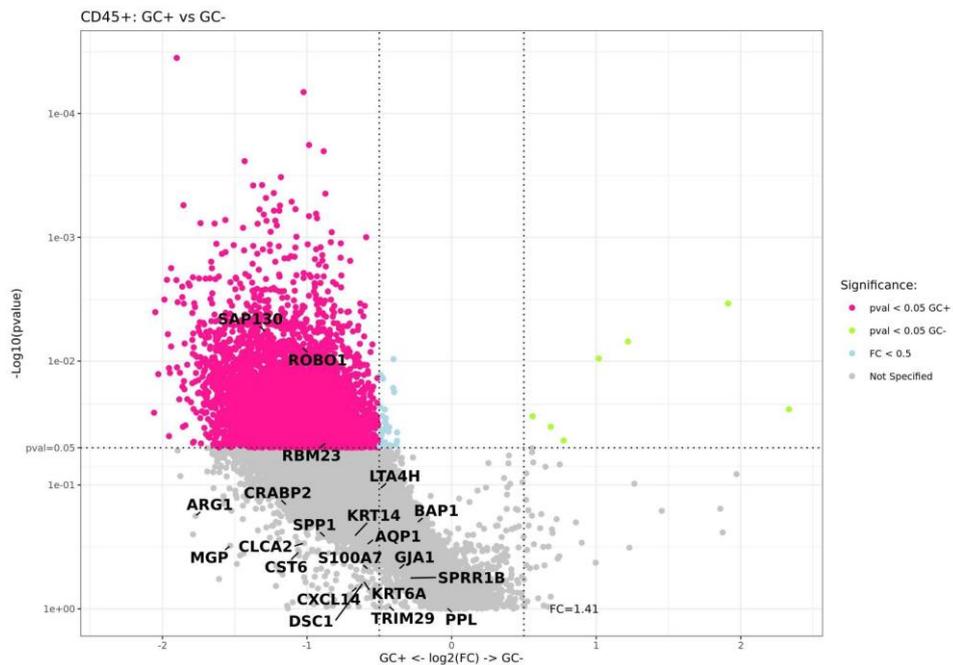


Figura 4.103: Gráfico de tipo volcán de los marcadores empleados en la prueba 31-GEP en los casos con y sin metástasis ganglionares en las AOI CD45+. El eje “x” muestra la expresión diferencial (DE

en escala logarítmica); el eje “y” indica el valor-p de cada sonda. La línea de puntos indica el umbral de p y de FC “fold change” a partir de los cuales se obtiene significación. GC+ (rosa); GC- (verde). Mann Whitney corrección Benjamin Hochberg.

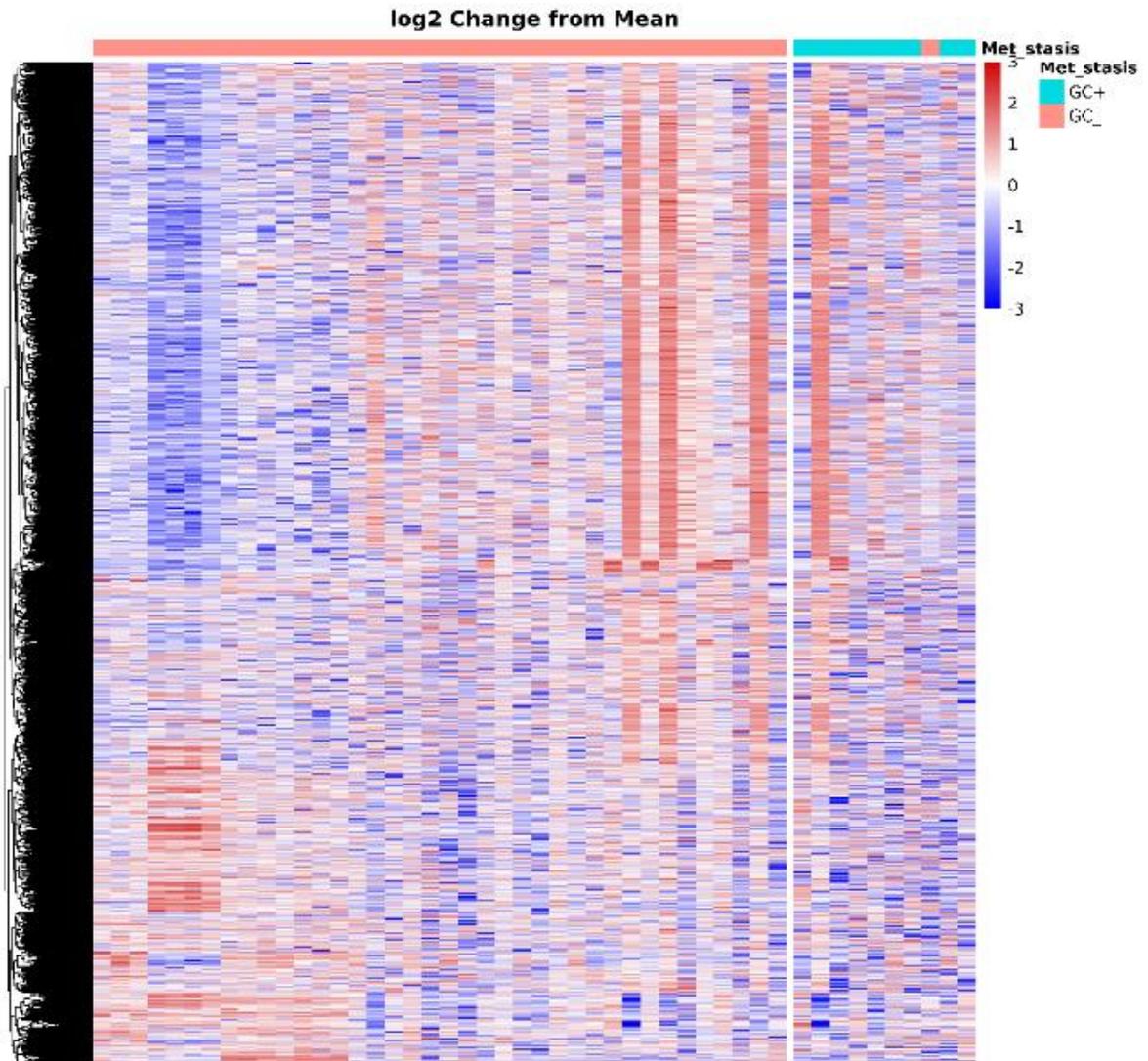


Figura 4.104: “Heatmap” supervisado comparando los casos de melanoma cutáneos GC+ vs GC- en las áreas CD45+.

CAPÍTULO 5

Discusión

Este trabajo de Tesis Doctoral ha tenido dos fases, la realización de un estudio experimental donde hemos comprobado el diferente comportamiento de dos líneas celulares de melanoma xenoinjertadas y su respuesta frente al tratamiento con RT y MSC de cordón umbilical, y donde hemos constatados las diferencias en el transcriptoma de cada una de estas condiciones. En segundo lugar, se ha llevado a cabo un estudio clínico-patológico con una cohorte de melanomas cutáneos donde hemos podido evidenciar diferencias en la expresión inmunohistoquímicas y moleculares entre los subtipos histopatológicos más frecuentes de melanoma y entre melanomas con o sin metástasis ganglionares. Por último, en la búsqueda de biomarcadores pronóstico candidatos para el melanoma hemos analizado el papel de diferentes moléculas entre las que la expresión de IMP3 ha resultado tener un valor pronóstico negativo.

5.1 Hallazgos del comportamiento de las dos líneas de melanoma xenoinjertadas

Encontramos evidencia de que los tumores generados por A375 y G631, líneas celulares xenoinjertadas de melanoma humano tienen distinta capacidad de proliferación y de inducir metástasis. Además el tratamiento combinado de MSC y RT modifica la expresión inmunohistoquímica de las moléculas relacionadas con la proliferación celular y la facilitación del proceso metastásico.

Las líneas celulares de melanoma humano A375 y G361 muestran mutación en los genes *BRAF* p.600VE y *CDKN2A*. Kim y cols. (395) demostraron que las líneas celulares A375 y G361 tienen menor capacidad migratoria e invasiva que otras líneas celulares de melanoma como la A2058 o la SK-MEL-28 y que la capacidad metastásica de la línea celular dependía del perfil lipídico de las células de melanoma humano. Además, la potencia de crecimiento y la invasividad de la línea celular G631 coincide con la de la línea celular A375 pero rara vez forma metástasis pulmonares (186).

5.2 Hallazgos del tratamiento de los xenotumores con MSC y RT

Las células madre/estromales mesenquimales (MSC) multipotentes tienen un fuerte tropismo hacia las células cancerosas, por lo que se están probando como herramientas para la administración dirigida de sustancias terapéuticas para el tratamiento del melanoma. Sin embargo, diferentes enfoques experimentales para la inducción del melanoma y el tratamiento de las MSC pueden tener un impacto directo en los resultados. Los ensayos de biodistribución realizados avalan la no inducción de tumores a no ser que las MSC estén previamente transformadas.

La radiación ionizante se aplica frecuente y eficazmente en oncología. Los datos publicados por nuestro grupo nos han llevado a diseñar un nuevo modelo biofísico para la interpretación de la respuesta tumoral a la radiación. Estudios *in vivo* que demostraron el efecto sinérgico de RT combinado con la terapia con células

mesenquimales en el tratamiento de tumores xenoinjertados indican que las MSC podrían usarse como tratamiento adyuvante para el cáncer. Esto se debe a que las MSC activadas aumentan el efecto terapéutico de la RT al secretar exosomas y proteínas en el tumor y en los focos metastásicos (390).

En estudios previos del grupo de Ruiz de Almódovar presentaron los principios teóricos y métodos experimentales que nos han permitido evaluar cuantitativamente el efecto de la radioterapia exclusiva (RT) y de las combinaciones de radioterapia con terapia con células mesenquimales (RT+MSC), *in vitro* cultivos de células cancerosas y xenotumores humanos *in vivo*. Nuestros estudios preclínicos indican que las células madre mesenquimales-estromales derivadas del cordón umbilical irradiadas con una dosis de radiación baja LET (MSC*) de 2Gy sobreexpresan genes supresores de tumores y reguladores de la inflamación que son inductores de la muerte de las células tumorales y producen efectos antitumorales locales y sistémicos con RT. Estos resultados sugieren efectos sinérgicos cuando ambos tratamientos se aplican juntos en modelos tumorales. A esto lo hemos denominado “Mesenchymal Enhancement Ratio” (MSC-ER) y sus valores nos permiten afirmar que el tratamiento combinado de RT con MSC o MSC*, es dos veces más eficiente sobre el volumen tumoral que el tratamiento con RT solo. Este factor es de magnitud similar cuando se comparan el efecto *bystander* de largo alcance de la radioterapia producidos por la RT sola en tumores no irradiados frente a los efectos producidos por el tratamiento combinado (RT+MSC) en tumores no irradiados. Además, la combinación de tratamientos produce una reducción importante (62%) en el potencial metastásico de un xenoinjerto de melanoma metastásico humano, lo que sugiere que un ensayo clínico, construido sobre los fundamentos de nuestro estudio preclínico, hipotéticamente, podría conducir a una importante mejora en los resultados de la RT en el tratamiento del cáncer humano. Estamos convencidos de que un ensayo clínico basado en estos principios merece ser intentado.

Los experimentos que hemos publicado en nuestros artículos anteriores, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado tener reproducibilidad y repetibilidad mediante la concordancia de resultados de al menos tres conjuntos diferentes de experimentos

realizados utilizando diferentes modelos de células para producir resultados de cultivos celulares de la evaluación de la cinética de crecimiento de células cancerosas humanas después de diferentes esquemas terapéuticos y para medir la cinética de crecimiento tumoral de xenotumores implantados en la pata trasera de ratones inmunodeficientes. En todos los experimentos realizados los tratamientos fueron: radioterapia, terapia celular con MSC de cordón umbilical, combinación de radioterapia y MSC o dejar sin tratamiento alguno. Hemos ajustado todos los resultados obtenidos a un modelo matemático de aumento exponencial. El modo de crecimiento es "exponencial" cuando las células aumentan su tamaño a un ritmo proporcional a su tamaño actual. Bajo el supuesto de crecimiento exponencial, el número de células al inicio del experimento (N_0), su número (N) después de un tiempo (t) y la tasa de crecimiento (k), están relacionados entre sí por:

$$\ln \frac{N}{N_0} = k \cdot t [V]$$

Usando la ecuación [V] hemos obtenido la inferencia de los resultados y los coeficientes de correlación han demostrado el ajuste correcto del resultado experimental al modelo aplicado.

Ruiz de Almódovar y colaboradores evaluando la regresión lineal de diez experimentos *in vitro* utilizando células de melanoma humano cultivadas en condiciones control y postratamientos con radioterapia (RT), terapia celular con células mesenquimales del estroma del cordón umbilical (MSC) y con una combinación de radioterapia y MSC (RT+MSC) y MSC activadas con dosis de radiación de 2Gy (RT+MSC*); analizando el número de células en cada disco de cultivo diariamente durante cinco días después del tratamiento, observaron que los puntos experimentales se ajustaron mediante regresión lineal simple a un modelo de cinética de crecimiento exponencial, con lo que poder estudiar las relaciones estadísticas entre el número de células y el tiempo y obtener la constante de crecimiento y el tiempo de duplicación correspondientes a cada línea. Las pendientes de estas rectas les permitieron afirmar que las diferencias globales entre ellas son claramente significativas $p=0.0191$ (Tovar y

cols., en prensa). Nuestro modelo matemático para calcular la pérdida celular se basa en la cinética de crecimiento exponencial de las células tumorales y está inspirado en la ecuación teórica propuesta por G.G. Steel en su trabajo "La pérdida celular como factor en la tasa de crecimiento de los tumores humanos" (217). La ecuación aplicada en nuestros trabajos (276, 390) fue la siguiente:

$$\varphi = 100 \cdot \left[1 - \frac{T_D (\text{control})}{T_D (\text{treatment})} \right] \text{ [VI]}$$

En el que φ es la pérdida celular, T_D (control) es el tiempo de duplicación del volumen de los tumores no tratados y T_D (tratamiento) es el tiempo de duplicación del volumen en cada uno de los grupos de tratamiento: MSC, MSC*, RT y RT+MSC.

Es importante entender que este factor de "pérdida celular" es biofísica y operativamente determinante del segundo término del producto incluido en nuestra ecuación para la supervivencia final y, en última instancia, es una estimación cuantitativa del aumento de la muerte celular que Las células mesenquimales se suman al efecto citorreductor de la radioterapia. En el factor de pérdida celular, tras la radioterapia, se incluyen los siguientes mecanismos: a) todas las formas de muerte celular (396), b) alargamiento de la duración media del ciclo celular producido por el tratamiento (397), c) células que tienen un ciclo celular nulo o potencial de crecimiento restringido debido a una mala reparación del daño o porque se han complicado en una progresión de diferenciación (398) y d) células cancerosas tumorales periféricas que se liberan en circulación diariamente (399).

Para estudiar *in vivo* el papel de las MSC como agente supresor de tumores hemos realizado ensayos previos utilizándolas solas o en combinación con radioterapia, implantamos células tumorales en ambos flancos de ratones NOD/SCID gamma para producir xenotumores bilaterales (276, 390). A los ratones tratados con MSC se les inyectaron por vía intraperitoneal 10^6 MSC de cordón umbilical una vez por semana durante cuatro semanas consecutivas. Los ratones tratados con RT (2Gy) recibieron radiación una vez por semana (RT) y los ratones tratados con el tratamiento combinado (RT+MSC) recibieron 10^6 MSC una vez por semana más 2Gy de radiación

siempre al día siguiente de la infusión de MSC (RT+MSC). En este grupo, un lado de los ratones con un tumor recibe irradiación (RT) y el otro permanece ingenuo a la radioterapia y solo se ve afectado por el efecto espectador sistémico (*bystander*) By(RT) y By(RT+MSC), respectivamente. Se realizó un control de la administración de dosis para excluir los efectos directos de la radiación en el lado contralateral no irradiado (276). El volumen del tumor se calculó mediante la fórmula:

$$V = \frac{\pi}{6} (a^2 \cdot b) \quad [\text{VII}]$$

Donde a y b son los valores para el diámetro menor y mayor, respectivamente. Los ratones con tumores mayores de 60 mm³ se distribuyeron aleatoriamente en 4 grupos diferentes: control, radioterapia, terapia con MSC y radioterapia más terapia con MSC. Los resultados fueron superponibles a los obtenidos en la presente Tesis Doctoral.

Al comparar todos los ensayos con las líneas entre ellas, encontramos que la comparación entre Control *versus* MSC tuvo diferencias significativas (p=0.0140). Además, las comparaciones entre: Control vs. RT (p=0.0188), Control vs. RT+MSC (p<0.0001) y Control vs. By(RT+MSC) (p=0.0212) mostraron diferencias claramente significativas. Es muy interesante que las diferencias entre los tumores Control y no irradiados en los ratones tratados con RT sola By(RT) y en el control versus los tratados con RT+MSC By(RT+MSC) son en ambos casos también significativas (p=0.0212 y 0.0215, respectivamente).

Nuestro grupo ha definido el "Mesenchymal Enhancement Ratio" (MSC-ER) como el ratio del efecto antitumoral producido por la combinación de radioterapia más terapia con MSC (RT+MSC) dividido por el efecto antitumoral producido por la radioterapia exclusiva (RT). Utilizando los valores de pérdida celular de los experimentos y tomando el valor promedio de pérdida celular producida por RT+MSC y RT+MSC*, el índice de mejora mesenquimal (MSC-ER) obtenido en nuestros experimentos previos *in vitro* fue:

$$MSC - ER = \frac{\varphi(RT + MSC)}{\varphi(RT)} = \frac{54.6}{28.4} \approx 1.92$$

Este valor cuantitativo de MSC-ER significa que el tratamiento combinado (RT+MSC) tiene un poder citorreductor casi dos veces mayor que el efecto de la RT utilizada sola. Este hallazgo sustenta fuertemente los tiempos de duplicación de los experimentos *in vivo* y coinciden con los resultados de la presente Tesis Doctoral.

Además, cabe destacar que la infusión de MSC en ratones tratados con RT representó una reducción en la cantidad de micrometástasis que es posible identificar en el hígado de los ratones con xenotumor de células A375 en comparación con el grupo tratado sólo con RT, lo que indica que la combinación RT+MSC produce una reducción importante en el potencial metastásico de los xenoinjertos de melanoma humano A375. Este resultado muestra que las proteínas o exosomas derivados de MSC irradiadas pueden ser un factor determinante en la mejora de los efectos de la radiación antitumoral que conducen a un mayor control de la metástasis. Después de eso, podríamos afirmar: “La radioterapia en sí misma puede no ser sistémica, aunque podría contribuir a un efecto sistémico cuando se usa en combinación con células madre mesenquimales”.

5.3 Hallazgos del efecto radiación sobre MSC

A la vista de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral nos preguntamos ¿Cuál podría ser el mediador de las acciones antitumorales de las MSC?. Cuando comparamos la actividad citotóxica de cada uno de los tratamientos evaluados en nuestros experimentos, los resultados muestran que existen diferencias significativas entre: Control y RT y RT+MSC, mostrando el efecto potenciador de la RT producida por las MSC independientemente de si estas células han sido activadas con radiación o se utilizan en su estado basal. Este resultado concuerda con otros resultados publicados que revelan que la activación de las MSC puede ocurrir después del

tratamiento con una molécula citotóxica como es el TNF- α , que potencia la actividad supresora de tumores en las MSC y también a través del ADN producido por células tumorales apoptóticas mediante el tratamiento de células tumorales con el agente citotóxico, que aumenta las interacciones de patrones moleculares adicionales asociados al daño, mejorando la expresión de TRAIL y DKK3 (277, 400) cuyas actividades antitumorales son bien conocidas. Partiendo de estos resultados hemos demostrado que los niveles de ARNm de TRAIL, DR5 y DKK3, y la expresión de sus correspondientes proteínas, aumentan significativamente (276, 390) en MSC tras el tratamiento con 2Gy, alcanzando niveles máximos de TRAIL a las 24 y 30 horas después de la irradiación, DR5 después de 4 horas y DKK3 a las 30 horas después de la irradiación (276). Estos resultados se confirmaron en un segundo experimento en el que se investigó la respuesta del ARNm de ANXA1 cuando las células MSC se estimulan con 2Gy. Los resultados de este experimento mostraron la sobreexpresión de TRAIL y DKK3 encontrados (390), lo cual fue consistente con los resultados de nuestro trabajo anterior (276), y la sobreexpresión del ARNm de ANXA1 encontrado se asoció con la abundante presencia de la proteína Anexina A1 en los exosomas separados del medio de cultivo de células MSC irradiadas (276); pero que otros muchos transcritos son modificados de manera significativa al valorar las muestras tumorales mediante GeoMx[®]DSP como hemos demostrado en los resultados preliminares en la presente memoria de Tesis Doctoral.

Además, previamente hemos demostrado que: a) los exosomas secretados por las MSC son cuantitativa, funcional y cualitativamente diferentes de los exosomas secretados por las MSC*; b) el medio condicionado de MSC* redujo la supervivencia en cultivos celulares de A375 y G361 en una fracción muy significativa cuando se compara esta actividad contra la actividad del medio condicionado obtenido del cultivo de MSC ($p < 0.001$); c) las microvesículas y exosomas de MSC y MSC* tienen efectos similares; d) las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas entre la actividad citotóxica medida en microvesículas ($p < 0.05$) y exosomas ($p < 0.0001$) obtenidos de MSC y MSC* (390).

Nuestro equipo de investigación ha demostrado que la presencia de anexina es abundante y muy significativa sólo en los exosomas liberados de las células activadas con una dosis de radiación de 2Gy (MSC*) (390) y ausente en las MSC en estado basal. El paradigma de esta familia, ANXA1, ha sido ampliamente reconocido como un mediador antiinflamatorio que influye en la migración y las respuestas celulares de varios tipos de células del sistema inmunológico innato (401). Además, nuestros datos demuestran que el ARNm de ANXA1 está regulado positivamente después de la irradiación de las MSC, lo que explica la enorme cantidad de la proteína Anexina A1 en los exosomas separados de las MSC*. Recientemente se han revisado algunos aspectos biológicos clave de ANXA1, el posible gen supresor de tumores, la capacidad de modular la apoptosis de las células tumorales inducida por la radiación y las actividades antitumorales, antiinflamatorias y anticoagulantes de ANXA1 (402). Estos resultados obtenidos por qPCR han sido refrendados mediante transcriptómica espacial en esta memoria.

En conjunto, estamos convencidos de que TRAIL, DKK3 y ANXA1 están fuertemente involucrados en los efectos espectadores y abscopales a corto y largo plazo producidos por MSC a través de las proteínas secretadas y los exosomas liberados cuando MSC se aplica junto con radioterapia en tratamientos experimentales contra el cáncer.

5.4 Hallazgos del estudio de transcriptómica espacial de los melanomas xenoinjertados

Al realizar el estudio transcriptómico espacial mediante GeoMx®DSP hemos podido comprobar que el tratamiento de RT+MSC en los melanomas xenoinjertados es mucho más profundo con la regulación de muchos genes. En particular en las Figuras 4.36 y 4.46 de tipo volcán se puede apreciar el importante número de sondas que se ven modificadas por efecto combinado de la RT+MSC y como en los *heatmap* podemos distinguir entre las líneas y entre los tratamientos realizados por su perfil transcriptómico.

Contrariamente a los resultados conseguidos en este trabajo en el metaanálisis con 11 artículos que realizaron Cordeiro y cols., en el que se seleccionaron aquellos que utilizaron células madre como intervención para modelos animales de melanoma utilizando la G de Hedges para el metaanálisis y la metarregresión de efectos aleatorios. Todos los estudios probaron los efectos de una única inyección de MSC (de médula ósea o tejido adiposo) mezcladas con células de melanoma de ratón B16 o con células de melanoma humano (A375 o M4Beu) en ratones favorecieron tanto la incidencia como el crecimiento tumoral del melanoma. Sus resultados muestran que las MSC son pro-tumorigénicas en modelos de ratones con coinyección de células de melanoma, lo que aumenta tanto la incidencia como el crecimiento del tumor (403).

No obstante, los 11 estudios seleccionados utilizaron la coinyección, modelos en los que se mezclan e inyectan células de melanoma y MSC simultáneamente. Aunque algunos estudios que utilizaron modelos de melanoma preestablecidos llegaron a la fase de cribado, desafortunadamente, no cumplían con todos los criterios de elegibilidad y no fueron analizados. Esta es una limitación importante, ya que se conoce la existencia de interacción entre células del melanoma y MSC antes de la inyección (255). De hecho, los efectos de MSC sobre el cáncer pueden cambiar drásticamente dependiendo del protocolo de administración lo que justifica en parte que los resultados en los diferentes laboratorios sean aparentemente contradictorios.

Entre las posibles desventajas de las MSC en la terapia contra el cáncer se encuentra el hecho de que los tumores sólidos en su microambiente están compuestos por una mezcla heterogénea de matriz extracelular, vasos sanguíneos, células inmunes e inflamatorias, tejido conectivo y MSC. En general, se cree que las MSC pueden estar involucradas en muchos aspectos de la regulación de la vigilancia inmune, la apoptosis y la angiogénesis durante el desarrollo del tumor como fuente de factores solubles contribuyen al desarrollo del tumor: (i) modulando la vigilancia inmune; (ii) promoviendo la metástasis; y (iii) mediando la transición epitelial-mesenquimatosa. En un estudio reciente sobre los efectos de las MSC sobre el cáncer de mama se informó que las MSC eran sólo protumorigénicas cuando se inyectan conjuntamente con las células cancerosas (404). En un modelo de osteosarcoma de ratón, las MSC humanas

promovieron el crecimiento tumoral y la metástasis, las MSC humanas promovieron el crecimiento tumoral y la metástasis en experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* (405). Una observación similar también se informó en otras líneas celulares cancerosas co-implantadas con MSC en carcinomas de colon (406), carcinomas de ovario (407) y cáncer gástrico (408).

Se ha prestado cada vez más atención a la terapia del cáncer con MSC y a la relación entre las células madre y las células tumorales. La creciente evidencia muestra que las hMSC albergan sitios de tumorigénesis, donde inhiben la función de las células tumorales. Un estudio reciente sugiere que las MSC tienen tropismo por los gliomas humanos después de la administración intravascular y local y aumentan significativamente la tasa de supervivencia de los ratones con tumores (409).

Está claro que las señales derivadas de tumores tienen una capacidad notable para atraer MSC. En casi todos los tipos de cáncer se ha observado una migración dirigida hacia los microambientes de tumores primarios y metastásicos y su incorporación a ellos. En general, se piensa que las MSC pueden estar involucradas en muchos aspectos del desarrollo tumoral como fuente de factores solubles para regular la vigilancia inmune, la apoptosis y la angiogénesis, y cuando entran en contacto con las células tumorales, las MSC modulan el crecimiento y la supervivencia del tumor.

Aunque no existe controversia científica sobre el tropismo de MSC para microambientes tumorales, la función de las MSC en los microambientes tumorales parece ambigua y complicada debido a resultados contradictorios de diferentes estudios en distintos tipos de cáncer. En la actualidad hay cada vez más evidencia de que las MSC ejercen efectos estimuladores (410) o inhibidores (411) sobre el crecimiento y la invasión del tumor a través de la interacción directa o indirecta con las células tumorales (412). Por lo tanto, las MSC hay quien las ha considerado “armas de doble filo” que pueden suprimir o promover el crecimiento y la invasión tumoral. Si sus propiedades se modifican adecuadamente mediante ingeniería genética con genes anticancerígenos con sustancias exógenas para la expresión/secreción de una sustancia terapéutica deseada o por la radioterapia, que hemos comprobado cómo estimula la producción de diferentes proteínas. Las MSC podrían emplearse como una nueva

herramienta para la terapia génica de tumores malignos. En los últimos años, las MSC diseñadas genéticamente han sido investigadas exhaustivamente como una novedad y utilizadas como vehículo para la terapia genética del cáncer.

5.5 Hallazgos sobre el papel de IMP3 como biomarcador

En melanoma sólo unos pocos estudios previos proponen que IMP3 desempeña un papel crucial, como biomarcador, en el establecimiento de la capacidad invasiva y metastásica del melanoma, por lo tanto lo que lleva a un peor pronóstico (294, 395, 413). El mecanismo por el cual IMP3 afecta la proliferación, progresión y metástasis de tumores ha sido investigado por diferentes grupos. Deforz et al. (414) demostró que IMP3 y otras proteínas relacionadas (ILF3/NF90 y PTBP1) se unen a los ARNm de ciclina 3'UTRS que activan las vías de las ciclinas D1, D3 y G1. Este mecanismo los protege de la traslación, represión inducida por el reclutamiento dependiente de miARN del complejo AGO2/GW182 en células cancerosas humanas. Además, Sheen et al. (415) confirma que IMP3 tiene un papel crítico en la invasión y metástasis del melanoma por regular la expresión del ARNm de HMGA2. IMP3 está directamente relacionado con la expresión de HMGA2 en tejido de melanoma y en células. Además, IMP3 interactúa en la migración celular e invasión mediante la activación de la vía NF-Kb. Algunas quimiocinas, específicamente la IL-8, parecen desempeñar un papel importante funciones que promueven la progresión de las células IMP3.

Se ha demostrado que IMP3 está sobreexpresado en una amplia variedad de cánceres humanos. Burdelski et al. (416) ha analizado la expresión de IMP3 en 76 muestras de tejidos normales y 3.889 muestras de cáncer de 95 tumores diferentes. Con ellos demostró que la alta expresión de IMP3 es común en la mayoría tipos sólidos de cáncer humano y a menudo está relacionado con efectos adversos en las propiedades tumorales como se muestra en un metaanálisis reciente que revela un índice de riesgo de 2.08 para la disminución supervivencia cuando IMP3 se expresa altamente en tumores sólidos (415). Además, estudios in vitro han demostrado la implicación de IMP3 en la promoción de células tumorales proliferación, adhesión e invasión (417).

También se ha demostrado que la sobreexpresión de células IMP3 está asociada con una mayor proliferación, mayor migración, tumorigénesis significativamente mejorada y aumento potencial metastásico en un modelo de ratones (187). Estos resultados son consistentes con los de esta Tesis Doctoral, dado que la línea celular de melanoma xenoinjertada con la mayor capacidad de proliferación y metástasis está asociada con una mayor expresión de IMP3.

La expresión de IMP3 se correlacionó significativamente con el antígeno de proliferación Ki-67, el número de metástasis, la expresión de PARP1 y expresión reducida de E-Cadherina.

Además, la reducción de la expresión inmunohistoquímica de IMP3 después del tratamiento con RT+MSC en nuestros resultados está relacionado con un tamaño tumoral más reducido (Fig. 4.13). La expresión IMP3 parece desempeñar un papel similar en neoplasias de diferentes orígenes histogénicos como el hepatocarcinoma y carcinoma renal de células claras.

La expresión de IMP3 se ha asociado con la formación del tumor, invasión, metástasis y proliferación celular (expresión Ki-67). La correlación entre la expresión IMP3 y el pronóstico ha sido establecida (418). En nuestro estudio se encontraron correlaciones originales en el modelo de ratón con xenoinjerto de melanoma que no han sido publicadas previamente. La transición epitelio mesénquima (EMT) es un proceso que resulta de la ganancia de movilidad celular con menor propiedad adhesiva para la organización del cuerpo, incluido el desarrollo embrionario y cicatrización de heridas. Este proceso se considera clave para las metástasis del cáncer (419). Algunos de los marcadores moleculares de la EMT son; la regulación negativa de la E-Cadherina (que provoca la pérdida de unión entre células) y la regulación positiva de las proteasas que degradan la matriz, proteínas relacionadas con el mesénquima (como vimentina y N-Cadherina). El reordenamiento del citoesqueleto de actina y la regulación positiva o translocación nuclear de los factores de transcripción subyacentes al programa genético específico del EMT (como la β -catenina y los individuos de la familia snail).

Nuestros resultados sobre el tratamiento combinado de RT y MSC en melanomas xenoinjertados constatan la reducción del tamaño del tumor, frecuencia de

metástasis y la metástasis de fenotipo EMT/PARP1. Este tratamiento también reduce la expresión de moléculas relacionadas con la proliferación celular (Ki-67), moléculas que facilitan la metástasis proceso (E-Cadherina), y moléculas relacionadas con pronóstico (IMP3).

Por lo tanto, IMP3 es una proteína clave para la invasión tumoral y metástasis, que también contribuye a la EMT (420). La sobreexpresión de IMP3 reduce la expresión de E-Cadherina y regula positivamente a slug (un objetivo funcional de IMP3 y vimentina en las células transfectadas). IMP3 podría promover la invasión y la migración a través de la EMT en células de cáncer de mama MDA-MB-231. A pesar de lo que se podría esperar, después de inhibir IMP3 da como resultado la expresión opuesta de las tres proteínas (420). La EMT es una transdiferenciación en la que los marcadores epiteliales, como la E-Cadherina, están disminuidos. Las moléculas de adhesión como E-Cadherina y N-Cadherina, que juegan un papel importante en la progresión del melanoma (35), están también relacionadas con la progresión de IMP3. Wu et al. (421) demostraron que la sobreexpresión de IMP3 regula a la baja la expresión de E-Cadherina, pero regula positivamente la expresión de N-Cadherina, vimentina, slug, snail, y MMP9. Cuando se inhibe IMP3, los efectos oncogénicos están disminuidos. También demostraron que el silenciamiento de IMP3 inhibió el crecimiento tumoral y mejoró la supervivencia del xenoinjerto portador de glioblastoma humano en ratones desnudos.

Con respecto a la expresión de IMP3 en nuestra serie clínica retrospectiva se ha demostrado que está significativamente relacionada con la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos ($p=0.034$) y a factores pronósticos relevantes como el espesor de Breslow y Nivel Clark. Realizando más estudios, IMP3 podría ser considerado como candidato a factor pronóstico en melanoma.

5.6 Hallazgos de otros biomarcadores

En el melanoma humano, la expresión de PARP1 y HIF-1 α están fuertemente asociados. HIF-1 α está post transcripcionalmente modificado y estabilizado por

PARilación en residuos específicos K/R ubicados en el extremo C-terminal. Utilizando un enfoque ChIP-seq imparcial, Martí y colaboradores (422) demostraron que PARP1 dicta el reclutamiento de HIF dependiente de la hipoxia en la cromatina en una variedad de genes regulados por HIF, mientras que el análisis de los motivos de unión de HIF (RCGTG) revela una restricción en el reconocimiento de elementos que responden a la hipoxia en ausencia de PARP-1. En consecuencia, las células están mal adaptadas a la hipoxia y muestran una aptitud reducida durante la inducción hipóxica... Estos datos caracterizan la regulación de ajuste por PARP1/PARilación de la activación de HIF y sugieren que los inhibidores de PARP podrían tener efectos terapéuticos potenciales contra los tipos de cáncer que muestran sobreactivación de HIF-1 α .

El silenciamiento de HIF-1 α utilizando tecnología de interferencia de ARN, ha demostrado tener un impacto significativo en el comportamiento de las células de melanoma uveal. Se ha observado una marcada disminución en la migración, invasión y adhesión de estas células. Además, mediante el análisis de microarrays GeneChip, se ha descubierto que varios genes implicados en la regulación de la invasión y el metabolismo del cáncer muestran una activación por hipoxia dependiente de HIF-1 en las células de melanoma uveal Mum2B. Entre estos genes se encuentran CXCR4, la proteína relacionada con la angiopoyetina y la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1) (423).

El estudio realizado por Oliver et al. ha proporcionado evidencia importante sobre el papel de PARP1 en la activación de factores inducibles por hipoxia, que son críticos en la neovascularización tumoral, así como en el mimetismo vasculogénico (MV) (424). En xenoinjertos de melanoma uveal, el inhibidor de PARP olaparib mejoró la cobertura de pericitos *in vivo* específicamente de los canales MV. La inhibición de PARP y la hipoxia modularon la formación de tubos de melanoma *in vitro*, induciendo una arquitectura tubular más escasa y regular. El perfil del transcriptoma completo puso de manifiesto que este tratamiento en condiciones hipóxicas modula la expresión

de genes implicados en la vasculogénesis durante la formación del tubo, mejorando el fenotipo de tipo endotelial de las células VM+ (424).

Un miembro de la familia GAS3 de proteínas transmembrana de 157 aa es la EMP1 que se ha relacionado con el crecimiento y la diferenciación celular (193). La sobreexpresión de EMP1 ha sido demostrada recientemente como un nuevo factor de mal pronóstico en leucemias (197). Por el contrario, en otras neoplasias, EMP1 se ha relacionado con la supresión de tumores. El ARNm de EMP1 se reduce en el carcinoma oral de células escamosas, el carcinoma nasofaríngeo y el cáncer de próstata (194, 198,199). Además, la disminución de la expresión de EMP1 se correlacionó significativamente con el estadio clínico ($p=0.002$) y la metástasis en los ganglios linfáticos ($p=0.044$). Los hallazgos sugieren que EMP1 puede funcionar como un supresor de tumores. En este sentido, la ablación genética de las células con alta expresión de EMP1 del cáncer colorrectal experimental previno la recurrencia metastásica y los ratones permanecieron libres de enfermedad después de la cirugía como han demostrado Cañellas-Socias et al. (425).

De manera similar la disminución de la expresión de EMP1 se correlacionó significativamente con los estadios T (sistema de estadificación TNM), la metástasis en los ganglios linfáticos, el estadio clínico y el grado histopatológico. Además, la supervivencia general deficiente se correlacionó significativamente con la pérdida de expresión de EMP1. En estudios *in vitro*, la transfección de la línea celular de cáncer de nasofaringe (CNE2) con sobreexpresión de EMP1 dio como resultado una disminución significativa en la proliferación celular pero un aumento en la apoptosis. Las células CNE2 que sobreexpresan EMP1 mostraron un aumento de caspasa-9 ($p<0.05$) pero niveles reducidos de proteína VEGF-C (152). De manera similar, Sun y colaboradores (426) investigaron la expresión de EMP1 en carcinoma colorrectal y cáncer de próstata. En ambos casos, la disminución de la expresión de EMP1 se correlacionó significativamente con los estadios T, la metástasis en los ganglios linfáticos, el estadio clínico y el grado histopatológico en pacientes con carcinoma colorrectal y cáncer de próstata. En cultivo, la transfección de líneas celulares de cáncer colorrectal humano (SW-480) o de cáncer de próstata humano PC-3 con un vector de sobreexpresión de

EMP1 resultó nuevamente en un aumento de la apoptosis ($p < 0.05$) y una disminución de la migración y la invasión ($p < 0.05$). Ambas líneas celulares que sobreexpresan EMP1 también mostraron niveles significativamente elevados de caspasa-9 pero niveles reducidos de VEGF-C. Estos hallazgos sugieren que EMP1 puede inducir la apoptosis a través de la vía dependiente de las mitocondrias y suprimir la metástasis tumoral a través de la angiogénesis mediada por VEGF-C en OSCC, carcinoma colorrectal y cáncer de próstata (199, 426).

En los leiomiomas uterinos y en los cánceres de cuello uterino la expresión del gen EMP1 se reguló significativamente (3.9 veces más) en muestras de leiomioma en comparación con el miometrio normal pareado. Estos hallazgos sugieren que EMP1 puede potencialmente alterar la diferenciación de las células del músculo liso en el leiomioma. En un estudio *in silico*, se analizaron muestras de micromatrices de 24 biopsias normales y 102 de cáncer de cuello uterino de cuatro bases de datos independientes de acceso público para el perfil de expresión génica. Una vez más, la expresión del gen EMP1 se reguló significativamente en las biopsias de cáncer de cuello uterino en comparación con los controles sanos emparejados (427).

Finalmente, los estudios que investigan el papel de EMP1 en el cáncer de mama son limitados pero sugieren similitud con las observaciones en otros tipos de cáncer. Sun et al. examinaron los niveles de proteína EMP1 en el tejido mamario. Mediante inmunohistoquímica y Western blotting analizaron los niveles de proteína EMP1 en 67 casos de cáncer de mama y 35 tejidos normales. Los niveles de proteína EMP1 fueron significativamente más bajos ($p < 0.05$) en las muestras de cáncer de mama en relación con los controles normales. Además, los niveles de proteína EMP1 se correlacionaron significativamente con los estadios T (clasificación TNM), la metástasis en los ganglios linfáticos, el estadio clínico y el grado histopatológico. La supervivencia global deficiente se correlacionó ($p < 0.05$) con niveles bajos de proteína EMP1. La transfección de líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 para aumentar los niveles de expresión de EMP1 dio como resultado una apoptosis elevada y una disminución significativa de la migración y la invasión. EMP1 aumentó significativamente la caspasa-9 y disminuyó los niveles de proteína VEGF-C ($p < 0.05$). Estos hallazgos sugieren que

EMP1 puede regular negativamente el cáncer de mama *in vitro* a través de la modulación de caspasa-9 (428). Por el contrario, no se han publicado descripciones de su expresión en melanomas.

En este trabajo de Tesis Doctoral mediante estudio de transcriptómica espacial hemos demostrado la expresión incrementada de EMP1 en los xenoinjertos de A375 que han tenido peor comportamiento y diseminación metastásica. En el estudio del transcriptoma de muestras clínicas EMP1 aparece significativamente más elevado en Melanoma Nodular y en las zonas del tumor (S100+) comparado con el microambiente tumoral (CD45+). Se requieren más estudios para poder proponer como biomarcador pronóstico a EMP1 en melanomas cutáneos.

5.7 Hallazgos de Transcriptómica espacial

Hasta lo que conocemos solo seis trabajos han sido publicados en relación con el uso de GeoMx[®]DSP en el estudio de melanomas y solo uno en relación con la comprensión de la formación y desarrollo de metástasis (429).

Dentro de un tumor individual, la heterogeneidad se produce a nivel del genoma, transcriptoma y proteoma, lo que conduce a la diversidad de poblaciones celulares y morfología tisular (430). Como ejemplo, estudios recientes han demostrado que los linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) en el tumor primario desempeñan un papel importante en la respuesta al tratamiento y el pronóstico del cáncer (431). Sin embargo, la mejora de los resultados clínicos se asoció con la presencia de TIL en algunos, pero no en todos, los tipos de tumores y en algunos, pero no en todos, los pacientes (21). Las herramientas de diagnóstico convencionales, incluida la inmunohistoquímica (IHQ) o inmunofluorescencia (IF), la secuenciación masiva de ADN o el análisis de expresión de ARN, no miden la heterogeneidad intrapaciente e intratumoral en su totalidad, ya sea debido al multiplexado limitado (p. ej., IHQ, e IF) o a la falta de resolución espacial (p. ej., análisis masivo de ácidos nucleicos). Por lo tanto, es una oportunidad para mejorar las herramientas disponibles para caracterizar y cuantificar la heterogeneidad molecular de los tumores histológicos y asociar esas

firmas con los resultados clínicos para mejorar el rendimiento de los biomarcadores pronósticos y predictivos.

Los tumores no son masas uniformes de células malignas, sino más bien conjuntos de ecosistemas locales multifacéticos caracterizados por heterogeneidad, dinamismo y plasticidad celular, así como interacciones complejas entre células. Se pueden reconocer diferentes capas de heterogeneidad en el microambiente tumoral como (i) características genéticas y epigenéticas de las células cancerosas (p. ej., mutaciones somáticas, variaciones en el número de copias, diferencias en el epigenoma y el proteoma), (ii) células no malignas (p. ej., células inmunes, fibroblastos), (iii) diferente composición de la matriz extracelular (MEC) y grado de remodelación y (iv) interferencia celular como resultado de moléculas expresadas/secretadas, presentación antigénica y diversidad de receptores. La heterogeneidad puede surgir como resultado de la evolución del tumor o de la presión selectiva del tratamiento y la resistencia a los medicamentos dentro de un solo sitio o cuando el tumor hace metástasis por todo el cuerpo. Puede investigarse perfilando regiones dentro de un solo tumor, comparando muestras pareadas de tumores primarios con metástasis, comparando biopsias seriadas antes y después del tratamiento, comparando muestras pareadas de fármacos sensibles a tumores resistentes o investigando datos clínicos y clínicos de paciente a paciente (variabilidad biológica) (432). Las tecnologías convencionales, ya sea perfiles genéticos/transcripcionales de alto multiplexado (p. ej., genotipado, microarrays, RNA-seq, nCounter® o espectrometría de masas) o datos de perfiles de bajo plexado resueltos espacialmente (p. ej., hibridación in situ fluorescente o IHQ), están técnicamente limitados por la falta de asociación entre la capacidad de creación de perfiles moleculares de alta complejidad y la resolución espacial. Estas limitaciones impiden una comprensión holística e integrada de la biología tumoral que desempeña un papel en el crecimiento, la diseminación, la respuesta y/o la adaptación emergente a las terapias del tumor. Los avances tecnológicos recientes en una plataforma de perfiles espaciales de alta complejidad (359) abren la puerta para permitir la caracterización de las diferentes capas de heterogeneidad en el microambiente tumoral, por ejemplo, características de células neoplásicas, células

inmunes, fibroblastos estromales y comunicación cruzada celular. Por lo tanto, el perfil espacial molecular puede capturar de forma única instantáneas de la heterogeneidad celular, así como la evolución fenotípica o funcional que ocurre dentro de diferentes áreas del tumor y microambiente tumoral, lo que podría ser muy relevante desde un punto de vista pronóstico/predictivo.

El GeoMx[®]DSP se desarrolló para permitir la elaboración de perfiles moleculares de alto plexado y resolución espacial de tejidos con cuantificación digital de analitos objetivo (356,433). Los investigadores pueden cuantificar proteínas o transcripciones de ARN utilizando oligos de ADN con código de barras unidos a anticuerpos primarios (para proteínas) o sondas de hibridación in situ (para ARN) a través de un conector fotoescindible ultravioleta (UV) (Figura 3.5). Estos reactivos de detección se aplican a la superficie del tejido en paralelo con hasta cuatro marcadores de morfología fluorescentes personalizables para visualizar la arquitectura del tejido (359). Se toman imágenes de la muestra y las regiones de interés (ROI) se exponen a luz ultravioleta que escinde el conector y libera los oligos con código de barras para su captura mediante microfluidos y cuantificación fuera del instrumento mediante nCounter o secuenciación de próxima generación (NGS). Hasta la fecha, se han validado más de 300 anticuerpos para la plataforma GeoMx[®]DSP y se han desarrollado perfiles de ARN a nivel de transcriptoma completo para muestras humanas y de ratón y perfiles de proteínas de 100 plex para muestras humanas. Tanto el contenido de proteínas como de ARN se pueden personalizar con objetivos adicionales según sea necesario.

La plataforma permite un alto grado de personalización para perfilar ROI de cualquier forma dentro del área de visualización, desde el tamaño mínimo de región de $5\mu\text{m}\times 5\mu\text{m}$ hasta un tamaño máximo de $660\mu\text{m}\times 785\mu\text{m}$. Además, la luz ultravioleta se puede enmascarar para centrarse en la señal fluorescente de un marcador de morfología individual en una región de interés determinada, subdividiendo esa región de interés en distintos compartimentos celulares llamados áreas de iluminación (AOI) que se pueden perfilar y leer por separado. Por ejemplo, el uso del marcador proteína

S100 característico de células melánicas (pS100) ayuda a la identificación patológica del tejido tumoral melánico dentro de una muestra. Cada compartimento pS100 positivo o pS100 negativo se puede perfilar iluminando por separado el compartimento de interés con luz ultravioleta para liberar los oligo con códigos de barras. De manera similar, se pueden usar marcadores específicos de tipo celular (por ejemplo, CD45 en la población leucocitaria total) para perfilar esas poblaciones de células específicas dentro de una ROI, sin la necesidad de que estas células sean contiguas. Se puede generar una máscara compleja para compartimentos celulares definidos por la presencia o ausencia de múltiples marcadores de morfología (p. ej., macrófagos CD68 positivos y CD11b positivos).

La plataforma GeoMx[®]DSP tiene una serie de ventajas para la creación de perfiles espaciales. En primer lugar, es compatible tanto con tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina (FFPE) como congelados (357). Además, es adecuado para una variedad de tamaños de muestras, desde biopsias con aguja gruesa (CNB) y microarrays de tejido (TMA), como hemos utilizado en nuestro estudio, hasta secciones de tejido de tumores. Además, solo requiere una única sección de tejido de ~5 μm y la misma sección se puede perfilar repetidamente debido al proceso relativamente no destructivo de GeoMx[®]DSP. Como se describe, es capaz de realizar perfiles espaciales de alta complejidad basados en recuentos digitales altamente reproducibles de ARN y proteínas (356). Se han desarrollado múltiples configuraciones de reactivos prediseñados y validados previamente y se pueden utilizar reactivos personalizados basados en anticuerpos o sondas de ARN para objetivos, como proteínas endógenas o exógenas, especies de ARN no codificantes y perfiles a nivel de exón de transcritos de ARN que pueden incluirse con los paneles de reactivos GeoMx. Además, los marcadores de morfología personalizados basados en proteínas o ARN (por ejemplo, hibridación in situ de ARNm mediante RNAscope) para la selección y segmentación de ROI se pueden adaptar al enfoque experimental del investigador. Las estrategias de creación de perfiles de ROI se pueden personalizar para los compartimentos espaciales específicos para la creación de perfiles. Con estas

ventajas clave, GeoMx permite a los investigadores lograr un amplio espectro de caracterizaciones transcriptómicas y proteómicas resueltas espacialmente de muestras de melanoma (377). Además, el perfil espacial GeoMx es aplicable a otros tipos de tumores, como cáncer de mama, cáncer de pulmón, próstata o hígado, caracterizados por una alta heterogeneidad clínica e histológica (434).

En referencia a las líneas de melanoma xenoinjertadas A375 principalmente, las rutas metabólicas activadas son WNT y TGF β que se encuentran relacionadas con la transición epitelio mesénquima; proteínas con expresión alterada en metástasis; senescencia y resolución de inflamación como se comentó en resultados. En particular, la caveolina-1 (CAV1) es una proteína unida a la membrana que suprime el desarrollo de tumores pero también promueve las metástasis. La E-Cadherina es importante en la supresión de tumores dependientes de CAV1 y previene la metástasis pulmonar potenciada por CAV1. Lobos-González et al. utilizaron células de melanoma murino B16F10 y humano A375 con niveles bajos de CAV1 endógeno y E-Cadherina para desentrañar cómo la coexpresión de E-Cadherina modula la función de CAV1 *in vitro* e *in vivo* en ratones WT C57BL/6 o inmunodeficientes Rag $^{-/-}$, y cómo un ambiente proinflamatorio generado al tratar células con prostaglandina E2 (PGE2) altera la función de CAV1 en presencia de E-Cadherina. La expresión de CAV1 aumentó la migración, la invasión y la metástasis de las células de melanoma, y estos efectos se eliminaron mediante la coexpresión transitoria de E-Cadherina (209).

En nuestro estudio la E-Cadherina está menos expresada de manera estadísticamente significativa en la línea de melanoma humano A375 con respecto a G361, cuando es la línea que ha metastatizado en nuestro estudio. Peres et al. en sus resultados revelaron que la migración del melanoma se promueve a través de un eje TBX3-ID1-MITF-E-Cadherina y que la represión de la actividad MITF mediada por ID1 puede reforzar el mantenimiento de un fenotipo MITF low asociado con la progresión de la enfermedad y la resistencia a la terapia (210).

El alto nivel extracelular de S100A4 demuestra una característica específica de algunos casos de cáncer, incluido el melanoma. Con respecto a este último, se demostró que el S100A4 extracelular de manera autocrina promueve la activación prometastásica de las células A375 mediante la interacción con el receptor de productos finales de glicación avanzada (RAGE). La interacción del S100A4 extracelular con RAGE de manera paracrina afectará la integridad de las células endoteliales (CE), promoviendo así aún más la metástasis del melanoma. Herwig et al. investigaron la influencia del S100A4 recombinante y derivado de células (A375) en la expresión de la proteína de unión y la integridad de las CE (hCMEC/D3) midiendo la resistencia eléctrica transendotelial (TEER). La disminución de TEER y la disminución de la expresión tanto de ocludina como de VE-Cadherina revelaron la pérdida de integridad de la CE. La trans migración de células A375 transgénicas (A375-hS100A4/A375-hRAGE) a través de la monocapa de CE fue significativamente mayor en comparación con las células A375 de tipo salvaje y disminuyó sustancialmente con sRAGE. Un estudio piloto en ratones, a los que se les inyectaron intracardialmente células A375-hS100A4 o A375-hRAGE, mostró tasas de supervivencia más bajas y una mayor incidencia de metástasis en comparación con las células A375 de tipo salvaje. El desarrollo de tumores se localizó principalmente en el cerebro, los huesos y los ovarios. Estos hallazgos proporcionan evidencia adicional sobre el S100A4 extracelular como mediador paracrino de la disfunción endotelial prometastásica que involucra su interacción con RAGE (211).

Con respecto a la queratina 18 (KRT18) se ha visto que su expresión es mayor en los tejidos de melanoma en comparación con los tejidos de la piel normal. Además, la sobreexpresión de KRT18 promovió significativamente la proliferación y el crecimiento de las células de melanoma (212).

Con referencia a la línea de melanoma xenoinjertadas G631 presenta activación de las vías metabólicas de maduración (MLANA, S100A1, PMEL, MIFT), senescencia y apoptosis melanocítica, La regulación al alza de la semaforina-5A (SEMA5A) se

asocia con una menor migración y capacidad de invasión de células de melanoma BRAF positivas bajo el tratamiento con vemurafenib en melanomas. La regulación al alza de transcritos, principalmente de proteínas enzimáticas, proteínas estructurales (TUBB2B, TUBB2A) e inhibidores de la progresión tumoral estaría en concordancia con la menor capacidad de diseminación de este tumor en nuestras condiciones experimentales.

5.8 Hallazgos del estudio de inmunohistoquímica y transcriptómica espacial en el estudio clínico-patológico retrospectivo

Cuando analizamos el transcriptoma de los melanomas MES se definen una serie de rutas con expresión significativa destacando las rutas “Pathways en cáncer” ($p=0.000141$), la vía “Rap1 signaling pathway” (0.00298) y Melanogénesis ($p=0.00374$). Rap1 es un miembro de la subfamilia ras de pequeñas GTPasas que son actores críticos en las vías de señalización que controlan el crecimiento y la diferenciación celular. Rap1 exhibe una estrecha homología con ras en los dominios de transformación, que incluyen la región de unión a GTP, el dominio efector y el sitio de unión a la membrana. La activación de Rap1 puede ser inducida por citocinas, incluida la galanina, que facilitan la progresión del tumor (326). Zhou y col. estudiaron conjuntos genes expresados diferencialmente por las líneas celulares A375 y A2058 utilizando la base de datos KEGG. Observaron que la vía de señalización Rap1 está altamente representada en ambos resultados de KEGG. Utilizando la herramienta de mapeo de vías KEGG, se encontró a Rap1 en la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos, lo que bien puede explicar por qué SHARPIN transfiere señales a través de Rap1 a la vía de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos, imponiendo el fenotipo maligno. También identificaron los genes centrales de Rap1 y las vías de la proteína quinasa activada por mitógenos, que incluyen las moléculas de señalización p38, JNK y c-Jun confirmando su expresión diferencial (327). Rodriguez y cols. postulan que el eje de señalización EPAC-RAP1 promueve el desarrollo del melanoma y media cambio de fenotipo así como la respuesta

antiproliferativa del melanoma metastásico a la señalización de AMPc. La inhibición farmacológica EPAC y caída de RAP1, inhibe la proliferación de células primarias de melanoma y estimula las células de melanoma metastásico (328).

La utilización tanto en melanoma experimental como en la serie retrospectiva de melanomas cutáneos estudiados en esta Tesis Doctoral de la plataforma GeoMx®DSP nos ha permitido reconocer las modificaciones transcriptómicas presentes en cada línea de melanoma y en cada variante histológica de melanoma cutáneo analizado, así como a identificar las modificaciones inducidas por los diferentes tratamientos y el perfil transcriptómico en los casos de melanomas que han inducido el desarrollo de metástasis ganglionares de los que no. No obstante, hemos realizado un estudio muy preliminar y se necesitaría la contribución de la bioinformática para identificar posibles biomarcadores o un particular *finger print* como han conseguido con el kit 31-GEP y que en este trabajo y por la tecnología empleada no hemos podido reproducir ya que la plataforma utilizada no produce amplificación y el test 31-GEP está basado por el contrario en una técnica de amplificación como es la PCR.

Los inhibidores de puntos de control inmunológico (ICI) han cambiado la práctica en el tratamiento del melanoma avanzado o metastásico, logrando una respuesta del 60% con una combinación de anti-PD-1 (muerte celular programada 1) y anti-CTLA4 (proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos). Fármacos nivolumab e ipilimumab, respectivamente (435). Sin embargo, no existe un método ampliamente aceptado para la selección de pacientes que se beneficien de esta terapia. De hecho, muchos pacientes no se benefician y algunos sufren eventos adversos (436). En el entorno avanzado, estos eventos se pueden controlar en gran medida, pero los ICI también se han aprobado en el entorno adyuvante, donde muchos pacientes se curan sólo con cirugía. Sugerimos que los biomarcadores de resistencia sean especialmente importantes en el entorno adyuvante para ayudar a los médicos a decidir qué pacientes pueden evitar la terapia con ICI. Con el objetivo de encontrar biomarcadores

de resistencia a las ICI, el nuevo método de descubrimiento espacialmente informado es una alternativa muy adecuada. El perfil espacial digital (DSP) que utiliza el sistema GeoMx® (NanoString Technologies) permite mediciones cuantitativas resueltas espacialmente de múltiples proteínas en una única sección de tejido FFPE (356). Recientemente Toki y colaboradores publicaron un estudio en el que exploraban el valor predictivo de un panel de 44 marcadores inmunes en una cohorte de pacientes con melanoma metastásico tratados con inmunoterapia mediante DSP (377). Nuestra intención en este trabajo ha sido utilizar esta herramienta GeoMx® DSP para evidenciar las diferencias que acontecen por los diferentes tratamientos o en las diferentes variantes histológicas de los melanomas a nivel experimental y en una serie clínico-patológica demostrando en este preliminar estudio que se producen modificaciones significativas en el transcriptoma y que este puede ser monitorizado.

CAPÍTULO 6

Limitaciones

Nuestro estudio presenta una serie de limitaciones. En primer lugar, todos los experimentos con proteínas se realizaron en TMA en lugar de secciones de tejido completo (437). A pesar de sus ventajas como herramienta de descubrimiento de biomarcadores, el TMA no se utiliza en el ámbito clínico y no es el formato óptimo para la evaluación de células inmunitarias. Para compensar esta debilidad, utilizamos varios núcleos de TMA no adyacentes para cada paciente. Además, sostenemos que si un biomarcador puede validarse en un área pequeña de un área de TMA, entonces es probable que se valide en secciones de tejido completo. Claramente la limitación que hemos tenido ha sido la económica, conseguimos la dotación instrumental en el año 2023 y acondicionamos el laboratorio, pero al tratarse de una metodología costosa cuando son muchas muestras hay que emplear TMA para reducir los costes. Otra limitación es la resolución de la tecnología GeoMx[®]DSP (10 μ m) en comparación con la técnica QIF bien caracterizada que utiliza microscopios de fluorescencia (≤ 0.2 μ m) y otras metodologías de alta complejidad (438, 439), lo que podría explicar una precisión de medición reducida en células en proximidad en nuestro estudio, como S100 expresado en el compartimento CD45+. No obstante, la combinación de técnicas de bajo y alto multiplexado para el reconocimiento de marcadores es una fortaleza destacable de este trabajo.

CAPÍTULO 7

Conclusiones

1. La línea celular de melanoma A357 xenoinjertada en ratones NOD/SCID gamma muestra un comportamiento más agresivo con la inducción de metástasis, mientras que la G631 no las produce en nuestras condiciones de ensayo.
2. La aplicación de radioterapia y células MSC reduce de manera significativa el crecimiento tumoral in vivo en los melanomas xenoinjertados.
3. El tratamiento con Radioterapia y radioterapia con células MSC reduce la expresión de IMP3, hecho constatado por inmunohistoquímica, western-blotting y transcriptómica espacial en el modelo de melanoma xenoinjertado. La expresión de IMP3 se correlacionó significativamente con el antígeno de proliferación Ki-67, el número de metástasis, la expresión de PARP1 y expresión reducida de E-Cadherina por lo que interpretamos esta reducción como un efecto beneficioso inducido por el tratamiento.

4. Los tratamientos aplicados en el modelo experimental de melanoma xenoinjertado inducen múltiples cambios en la expresión de sondas en las células neoplásicas como se evidencia en los estudios realizados de transcriptómica espacial mediante la plataforma GeoMx DSP sobre los melanomas.
5. El perfil de expresión de los dos melanomas xenoinjertados difieren en su expresión transcriptómica como también ocurre entre los Melanomas Nodulares y los Melanomas de Extensión Superficial en la serie clínico-patológica.
6. La expresión de IMP3 en nuestra serie clínica retrospectiva ha demostrado que está significativamente relacionada con la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos y con factores pronósticos relevantes como el espesor de Breslow y Nivel Clark. Consideramos por ello que IMP3 podría ser considerado como posible candidato a factor pronóstico en melanomas; aunque se requieren de nuevos estudios para corroborarlo.
7. A pesar que mediante inmunohistoquímica no hemos podido demostrar modificación en la expresión de EMP1, en el estudio de transcriptómica espacial hemos demostrado la expresión incrementada de EMP1 en los xenoinjertos de A375 que han tenido peor comportamiento y diseminación metastásica, y en los Melanomas Nodulares. Estos resultados no nos permiten proponer EMP1 en melanoma como un candidato a biomarcador pronóstico.
8. La tecnología de Transcriptómica espacial nos ha permitido identificar en áreas de melanoma y en áreas de microambiente tumoral los genes que se encuentran regulados al alza y establecer una primera aproximación sobre las rutas metabólicas que ocurren tanto a nivel experimental como en los melanomas cutáneos más frecuentes.

CAPÍTULO 8

Perspectivas Futuras

A raíz de los resultados de la presente Tesis Doctoral, nos proponemos como perspectivas futuras solicitar un proyecto de investigación y completar más el estudio transcriptómico espacial con el empleo de técnicas de bioinformática para encontrar patrones de expresión diferenciales entre melanomas cutáneos que muestran peor pronóstico o que hayan desarrollado resistencia tras el uso de inhibidores de puntos de control inmunológico. Igualmente participamos en la solicitud de un ensayo clínico piloto en cáncer colorrectal donde se aplicará tratamiento con radioterapia y MSC y aplicaremos la tecnología desarrollada en esta Tesis Doctoral.

CAPÍTULO 9

Referencias

1. McGuire S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Adv Nutr.* 2016;7(2):418-419.
2. SEOM. LA INCIDENCIA DEL MELANOMA AUMENTA EN ESPAÑA Y LLEGARÁ A 7.474 CASOS NUEVOS EN 2022. 2022. Disponible en: https://seom.org/images/14_07_2022_NP_Melanoma_cutaneo_infografia.pdf
3. Roy D Dorak MT. Environmental Factors Genes and the Development of Human Cancers. Springer; 2010.
4. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(12):924-935.
5. Hemminki K, Lorenzo Bermejo J, Försti A. The balance between heritable and environmental aetiology of human disease. *Nat Rev Genet.* 2006;7(12):958-965.
6. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646-674.
7. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell.* 2008;13(6):472-482.
8. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(3):220-228.
9. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer.* Published online April 5, 2021.
10. Peters JM, Gonzalez FJ. The Evolution of Carcinogenesis. *Toxicol Sci.* 2018;165(2):272-276.
11. Palacios Ferrer J. Determination of exosomal

- cancer stem cell biomarkers with cancer diagnostic utility. Universidad de Granada; 2021.
12. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell*. 2011;147(2):275-292.
 13. Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res*. 2010;70(14):5649-5669.
 14. Kruger S, Ilmer M, Kobold S, Cadilha BL, Endres S, Ormanns S, et al. Advances in cancer immunotherapy 2019 latest trends. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):268.
 15. Yanumula A, Cusick JK. Biochemistry, Extrinsic Pathway of Apoptosis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; July 31, 2023.
 16. Plati J, Bucur O, Khosravi-Far R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. *Integr Biol (Camb)*. 2011;3(4):279-296.
 17. Marie-Egyptienne DT, Lohse I, Hill RP. Cancer stem cells, the epithelial to mesenchymal transition (EMT) and radioresistance: potential role of hypoxia. *Cancer Lett*. 2013;341(1):63-72.
 18. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2001;19(16):3635-3648.
 19. Fundación SC. Skin cancer facts and statistics. *Ski Cancer Inf* 2019.
 20. Long GV, Swetter SM, Menzies AM, Gershenwald JE, Scolyer RA. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2023;402(10400):485-502.
 21. Alvarez-Breckenridge C, Markson SC, Stocking JH, et al. Microenvironmental landscape of human melanoma brain metastases in response to immune checkpoint inhibition. *Cancer Immunol Res*. 2022;10(8):996-1012.
 22. Welch HG, Mazer BL, Adamson AS. The Rapid Rise in Cutaneous Melanoma Diagnoses. *N Engl J Med*. 2021;384(1):72-79.
 23. Garbe C, Amaral T, Peris K, et al. European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics: Update 2022. *Eur J Cancer*. 2022;170:236-255.
 24. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019;69(1):7-34.
 25. Rizzetto G, Lucarini G, De Simoni E, et al. Tissue biomarkers predicting lymph node status in cutaneous melanoma. *Int J Mol Sci*. 2022;24(1):144.
 26. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249.
 27. Sneyd MJ, Cox B. A comparison of trends in melanoma mortality in New Zealand and Australia: the two countries with the highest melanoma incidence and mortality in the world. *BMC Cancer*. 2013;13:372.

28. Stang A, Pukkala E, Sankila R, Söderman B, Hakulinen T. Time trend analysis of the skin melanoma incidence of Finland from 1953 through 2003 including 16,414 cases. *Int J Cancer*. 2006;119(2):380-384.
29. Watson M, Geller AC, Tucker MA, Guy GP Jr, Weinstock MA. Melanoma burden and recent trends among non-Hispanic whites aged 15-49 years, United States. *Prev Med*. 2016;91:294-298.
30. Brenner M, Hearing VJ. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol*. 2008;84(3):539-549.
31. Stratigos AJ, Forsea AM, van der Leest RJ, et al. Euromelanoma: a dermatology-led European campaign against nonmelanoma skin cancer and cutaneous melanoma. Past, present and future. *Br J Dermatol*. 2012;167 Suppl 2:99-104.
32. Khazaei Z, Ghorat F, Jarrahi AM, Adineh HA, Sohrabivafa M, Goodarzi E. Global incidence and mortality of skin cancer by histological subtype and its relationship with the Human Development Index (HDI) - an ecology study in 2018.
33. Cho E, Rosner BA, Colditz GA. Risk factors for melanoma by body site. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(5):1241-1244.
34. Pérez-Gómez B, Aragonés N, Gustavsson P, Lope V, López-Abente G, Pollán M. Do sex and site matter? Different age distribution in melanoma of the trunk among Swedish men and women. *Br J Dermatol*. 2008;158(4):766-772.
35. Bosserhoff A-K. *Melanoma Development: Molecular Biology Genetics and Clinical Application*. Springer; 2011.
36. Pickering CR, Zhou JH, Lee JJ, et al. Mutational landscape of aggressive cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2014;20(24):6582-6592.
37. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2019*. Am Cancer Soc 2019.
38. Bobos M. Histopathologic classification and prognostic factors of melanoma: a 2021 update. *Ital J Dermatol Venerol*. 2021;156(3):300-321.
39. Zheng Q, Capell BC, Parekh V, et al. Whole-Exome and Transcriptome Analysis of UV-Exposed Epidermis and Carcinoma In Situ Reveals Early Drivers of Carcinogenesis. *J Invest Dermatol*. 2021;141(2):295-307.e13.
40. Durinck S, Ho C, Wang NJ, et al. Temporal dissection of tumorigenesis in primary cancers. *Cancer Discov*. 2011;1(2):137-143.
41. Jones J, Wetzel M, Brown T, Jung J. Molecular profile of advanced cutaneous squamous cell carcinoma. *JCAD*. 2021;14:32-8.
42. Goldblum JR, Lamps LW, McKenney JK. *Rosai and Ackerman's surgical pathology E-Book*. Elsevier sci. 2017; 78-86 p.
43. Elder DE, Board WCTE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R. *Who Classification of Skin Tumours, Volume 11*. WORLD HEALTH ORGANIZATION; 2018.

44. Fizazi K, Greco FA, Pavlidis N, et al. Cancers of unknown primary site: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26 Suppl 5:v133-v138.
45. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature.* 2005;436(7047):117-122.
46. Müller J, Krijgsman O, Tsoi J, et al. Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun.* 2014;5:5712.
47. Zilberg C, Lee MW, Yu B, et al. Analysis of clinically relevant somatic mutations in high-risk head and neck cutaneous squamous cell carcinoma. *Mod Pathol.* 2018;31(2):275-287.
48. Li L, Li F, Xia Y, et al. UVB induces cutaneous squamous cell carcinoma progression by de novo ID4 methylation via methylation regulating enzymes. *EBioMedicine.* 2020;57:102835.
49. Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 2002;417(6892):949-954.
50. Gutiérrez-Castañeda LD, Nova JA, Tovar-Parra JD. Frequency of mutations in BRAF, NRAS, and KIT in different populations and histological subtypes of melanoma: a systemic review. *Melanoma Res.* 2020;30(1):62-70.
51. Krauthammer M, Kong Y, Bacchiocchi A, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas. *Nat Genet.* 2015;47(9):996-1002.
52. de Unamuno Bustos B, Murria Estal R, Pérez Simó G, et al. Towards Personalized Medicine in Melanoma: Implementation of a Clinical Next-Generation Sequencing Panel. *Sci Rep.* 2017;7(1):495.
53. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature.* 2014;505(7484):495-501.
54. Indini A, Fiorilla I, Ponzzone L, Calautti E, Audrito V. NAD/NAMPT and mTOR Pathways in Melanoma: Drivers of Drug Resistance and Prospective Therapeutic Targets. *Int J Mol Sci.* 2022;23(17):9985.
55. Faktor J, Grasso G, Zavadil Kokas F, et al. The effects of p53 gene inactivation on mutant proteome expression in a human melanoma cell model. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2020;1864(12):129722.
56. Marchetti P, Trinh A, Khamari R, Kluza J. Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2018;1862(4):999-1005.
57. Zhou YX, Wang X, Pang DQ, et al. Nomogram Incorporating the WNT/ β -Catenin Signaling Pathway for Predicting the Survival of Cutaneous Melanoma. *Int J Gen Med.* 2021;14:2751-2761.
58. Paluncic J, Kovacevic Z, Jansson PJ, et al. Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression

- and oncogenic signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(4):770-784.
59. Fernandez-Flores A. Conceptos modernos en tumores melanocíticos. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 2023;114(5):402-12.
 60. Joselow A, Lynn D, Terzian T, Box NF. Senescence-like phenotypes in human nevi. *Methods Mol Biol*. 2017;1534:175-184.
 61. Leclerc J, Ballotti R, Bertolotto C. Pathways from senescence to melanoma: focus on MITF sumoylation. *Oncogene*. 2017;36(48):6659-6667.
 62. Yeh I. Update on classification of melanocytic tumors and the role of immunohistochemistry and molecular techniques. *Semin Diagn Pathol*. 2022;39(4):248-256.
 63. Wiesner T, Kutzner H, Cerroni L, Mihm MC Jr, Busam KJ, Murali R. Genomic aberrations in spitzoid melanocytic tumours and their implications for diagnosis, prognosis and therapy. *Pathology*. 2016;48(2):113-131.
 64. Carr J, Mackie RM. Point mutations in the N-ras oncogene in malignant melanoma and congenital nevi. *Br J Dermatol*. 1994;131(1):72-77.
 65. Foulkes WD, Flanders TY, Pollock PM, Hayward NK. The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Mol Med*. 1997;3(1):5-20.
 66. Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, et al. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16?. *Br J Cancer*. 2006;95(4):496-505.
 67. Sviderskaya EV, Hill SP, Evans-Whipp TJ, et al. p16(Ink4a) in melanocyte senescence and differentiation. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(6):446-454.
 68. Yeh I, Busam KJ. Spitz melanocytic tumours - a review. *Histopathology*. 2022;80(1):122-134.
 69. Cheng TW, Ahern MC, Giubellino A. The spectrum of spitz melanocytic lesions: from morphologic diagnosis to molecular classification. *Front Oncol*. 2022;12:889223.
 70. Harms PW, Hocker TL, Zhao L, et al. Loss of p16 expression and copy number changes of CDKN2A in a spectrum of spitzoid melanocytic lesions. *Hum Pathol*. 2016;58:152-160.
 71. Raghavan SS, Peternel S, Mully TW, et al. Spitz melanoma is a distinct subset of spitzoid melanoma. *Mod Pathol*. 2020;33(6):1122-1134.
 72. Dal Pozzo CA, Cappelleso R. The morpho-molecular landscape of spitz neoplasms. *Int J Mol Sci*. 2022;23(8):4211.
 73. Hingorani AD, Windt DA, Riley RD, et al. Prognosis research strategy (PROGRESS) 4: stratified medicine research. *BMJ*. 2013;346:e5793.
 74. Ding L, Gosh A, Lee DJ, et al. Prognostic biomarkers of cutaneous melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2022;38(5):418-434.
 75. Hocker TL, Singh MK, Tsao H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: moving from the benchside to the bedside. *J Invest Dermatol*. 2008;128(11):2575-

- 2595.
76. Smalley KS. Understanding melanoma signaling networks as the basis for molecular targeted therapy. *J Invest Dermatol.* 2010;130(1):28-37.
77. Garbe C, Leiter U, Ellwanger U, et al. Diagnostic value and prognostic significance of protein S-100beta, melanoma-inhibitory activity, and tyrosinase/MART-1 reverse transcription-polymerase chain reaction in the follow-up of high-risk melanoma patients. *Cancer.* 2003;97(7):1737-1745.
78. Hügel R, Muendlein A, Volbeding L, et al. Serum levels of hepatocyte growth factor as a potential tumor marker in patients with malignant melanoma. *Melanoma Res.* 2016;26(4):354-360.
79. Hauschild A, Engel G, Brenner W, et al. S100B protein detection in serum is a significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology.* 1999;56(4):338-344.
80. Krähn G, Kaskel P, Sander S, et al. S100 beta is a more reliable tumor marker in peripheral blood for patients with newly occurred melanoma metastases compared with MIA, albumin and lactate-dehydrogenase. *Anticancer Res.* 2001;21(2B):1311-1316.
81. Krückel A, Moreira A, Fröhlich W, Schuler G, Heinzerling L. Eosinophil-cationic protein - a novel liquid prognostic biomarker in melanoma. *BMC Cancer.* 2019;19(1):207.
82. de Lecea MV, Palomares T, Al Kassam D, et al. Indoleamine 2,3 dioxygenase as a prognostic and follow-up marker in melanoma. A comparative study with LDH and S100B. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2017;31(4):636-642.
83. Gracia-Darder I, Carrera C, Alamon-Reig F, Puig S, Malveyh J, Podlipnik S. Vitamin D deficiency in melanoma patients is associated with worse overall survival: a retrospective cohort study. *Melanoma Res.* 2022;32(5):384-387.
84. Hardie CM, Elliott F, Chan M, Rogers Z, Bishop DT, Newton-Bishop JA. Environmental exposures such as smoking and low vitamin d are predictive of poor outcome in cutaneous melanoma rather than other deprivation measures. *J Invest Dermatol.* 2020;140(2):327-337.e2.
85. Ding H, Yuan M, Yang Y, Gupta M, Xu XS. Evaluating Prognostic Value of Dynamics of Circulating Lactate Dehydrogenase in Colorectal Cancer Using Modeling and Machine Learning. *Clin Pharmacol Ther.* Published online September 19, 2023.
86. O'Brien CM, Rood K, Sengupta S, et al. Detection and isolation of circulating melanoma cells using photoacoustic flowmetry. *J Vis Exp.* 2011;(57):e3559.
87. Khoja L, Lorigan P, Zhou C, et al. Biomarker utility of circulating tumor cells in metastatic cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2013;133(6):1582-1590.
88. Gray ES, Reid AL, Bowyer S, et al. Circulating melanoma cell subpopulations: their heterogeneity and differential responses to treatment. *J Invest Dermatol.* 2015;135(8):2040-2048.

89. Galanzha EI, Menyaev YA, Yadem AC, et al. In vivo liquid biopsy using Cytophone platform for photoacoustic detection of circulating tumor cells in patients with melanoma. *Sci Transl Med.* 2019;11(496):eaat5857.
90. Lee JH, Saw RP, Thompson JF, et al. Pre-operative ctDNA predicts survival in high-risk stage III cutaneous melanoma patients. *Ann Oncol.* 2019;30(5):815-822.
91. Thomas NE, Edmiston SN, Alexander A, et al. Association Between NRAS and BRAF Mutational Status and Melanoma-Specific Survival Among Patients With Higher-Risk Primary Melanoma. *JAMA Oncol.* 2015;1(3):359-368.
92. Lee RJ, Gremel G, Marshall A, et al. Circulating tumor DNA predicts survival in patients with resected high-risk stage II/III melanoma. *Ann Oncol.* 2018;29(2):490-496.
93. Valpione S, Gremel G, Mundra P, et al. Plasma total cell-free DNA (cfDNA) is a surrogate biomarker for tumour burden and a prognostic biomarker for survival in metastatic melanoma patients. *Eur J Cancer.* 2018;88:1-9.
94. Koyanagi K, O'Day SJ, Gonzalez R, et al. Serial monitoring of circulating melanoma cells during neoadjuvant biochemotherapy for stage III melanoma: outcome prediction in a multicenter trial. *J Clin Oncol.* 2005;23(31):8057-8064.
95. Jiang C, Chen X, Alattar M, Wei J, Liu H. MicroRNAs in tumorigenesis, metastasis, diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Cancer Gene Ther.* 2015;22(6):291-301.
96. Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol.* 2007;171(3):728-738.
97. Hoon DS, Spugnardi M, Kuo C, Huang SK, Morton DL, Taback B. Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients. *Oncogene.* 2004;23(22):4014-4022.
98. Guo S, Guo W, Li S, et al. Serum miR-16: A Potential Biomarker for Predicting Melanoma Prognosis. *J Invest Dermatol.* 2016;136(5):985-993.
99. Kanemaru H, Fukushima S, Yamashita J, et al. The circulating microRNA-221 level in patients with malignant melanoma as a new tumor marker. *J Dermatol Sci.* 2011;61(3):187-193.
100. Friedman EB, Shang S, de Miera EV, et al. Serum microRNAs as biomarkers for recurrence in melanoma. *J Transl Med.* 2012;10:155.
101. Zhou B, Xu K, Zheng X, et al. Application of exosomes as liquid biopsy in clinical diagnosis. *Signal Transduct Target Ther.* 2020;5(1):144.
102. Alegre E, Zubiri L, Perez-Gracia JL, et al. Circulating melanoma exosomes as diagnostic and prognosis biomarkers. *Clin Chim Acta.* 2016;454:28-32.
103. Tengda L, Shuping L, Mingli G, et al. Serum exosomal microRNAs as potent circulating biomarkers for melanoma. *Melanoma Res.*

- 2018;28(4):295-303.
104. Wouters J, Vizoso M, Martinez-Cardus A, et al. Comprehensive DNA methylation study identifies novel progression-related and prognostic markers for cutaneous melanoma. *BMC Med.* 2017;15(1):101.
105. Thomas NE, Slater NA, Edmiston SN, et al. DNA methylation profiles in primary cutaneous melanomas are associated with clinically significant pathologic features. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27(6):1097-1105.
106. Sigalotti L, Covre A, Fratta E, et al. Whole genome methylation profiles as independent markers of survival in stage IIIC melanoma patients. *J Transl Med.* 2012;10:185.
107. Lian CG, Xu Y, Ceol C, et al. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell.* 2012;150(6):1135-1146.
108. Kong YW, Ferland-McCollough D, Jackson TJ, Bushell M. microRNAs in cancer management. *Lancet Oncol.* 2012;13(6):e249-e258.
109. Segura MF, Hanniford D, Menendez S, et al. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(6):1814-1819.
110. Li R, Zhang L, Jia L, et al. Long non-coding RNA BANCR promotes proliferation in malignant melanoma by regulating MAPK pathway activation. *PLoS One.* 2014;9(6):e100893.
111. Wilmott JS, Colebatch AJ, Kakavand H, et al. Expression of the class 1 histone deacetylases HDAC8 and 3 are associated with improved survival of patients with metastatic melanoma. *Mod Pathol.* 2015;28(7):884-894.
112. Heppt MV, Siepmann T, Engel J, et al. Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care. *BMC Cancer.* 2017;17(1):536.
113. Jakob JA, Bassett RL Jr, Ng CS, et al. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer.* 2012;118(16):4014-4023.
114. Eliseeva IA, Kim ER, Guryanov SG, Ovchinnikov LP, Lyabin DN. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions. *Biochemistry (Mosc).* 2011;76(13):1402-1433.
115. Kosnopfel C, Sinnberg T, Sauer B, et al. YB-1 expression and phosphorylation regulate tumorigenicity and invasiveness in melanoma by influencing EMT. *Mol Cancer Res.* 2018;16(7):1149-1160.
116. Bagati A, Bianchi-Smiraglia A, Moparthy S, et al. FOXQ1 controls the induced differentiation of melanocytic cells. *Cell Death Differ.* 2018;25(6):1040-1049.
117. Duncan LM, Deeds J, Cronin FE, et al. Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol.* 2001;19(2):568-576.
118. Guo H, Carlson JA, Slominski A. Role of TRPM in melanocytes and melanoma. *Exp*

- Dermatol. 2012;21(9):650-654.
119. Erickson LA, Letts GA, Shah SM, Shackelton JB, Duncan LM. TRPM1 (Melastatin-1/MLSN1) mRNA expression in Spitz nevi and nodular melanomas. *Mod Pathol.* 2009;22(7):969-976.
120. Levy C, Khaled M, Iliopoulos D, et al. Intronic miR-211 assumes the tumor suppressive function of its host gene in melanoma. *Mol Cell.* 2010;40(5):841-849.
121. Bagati A, Bianchi-Smiraglia A, Moparthy S, et al. Melanoma suppressor functions of the carcinoma oncogene FOXQ1. *Cell Rep.* 2017;20(12):2820-2832.
122. Vinagre J, Almeida A, Pópulo H, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun.* 2013;4:2185.
123. Griewank KG, Murali R, Puig-Butille JA, et al. TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(9):dju246.
124. Hugdahl E, Kalvenes MB, Mannelqvist M, Ladstein RG, Akslen LA. Prognostic impact and concordance of TERT promoter mutation and protein expression in matched primary and metastatic cutaneous melanoma. *Br J Cancer.* 2018;118(1):98-105.
125. Kilvaer TK, Valkov A, Sorbye S, et al. Profiling of VEGFs and VEGFRs as prognostic factors in soft tissue sarcoma: VEGFR-3 is an independent predictor of poor prognosis. *PLoS One.* 2010;5(12):e15368.
126. Ladstein RG, Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Ki-67 expression is superior to mitotic count and novel proliferation markers PHH3, MCM4 and mitotin as a prognostic factor in thick cutaneous melanoma. *BMC Cancer.* 2010;10:140.
127. Nodin B, Fridberg M, Jonsson L, Bergman J, Uhlén M, Jirström K. High MCM3 expression is an independent biomarker of poor prognosis and correlates with reduced RBM3 expression in a prospective cohort of malignant melanoma. *Diagn Pathol.* 2012;7:82.
128. Ellis RA, Horswell S, Ness T, et al. Prognostic impact of p62 expression in cutaneous malignant melanoma. *J Invest Dermatol.* 2014;134(5):1476-1478.
129. Ellis R, Tang D, Nasr B, et al. Epidermal autophagy and beclin 1 regulator 1 and loricrin: a paradigm shift in the prognostication and stratification of the American Joint Committee on Cancer stage I melanomas. *Br J Dermatol.* 2020;182(1):156-165.
130. Kuźbicki Ł, Lange D, Stanek-Widera A, Chwirut BW. Intratumoral expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) is a negative prognostic marker for patients with cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 2016;26(5):448-456.
131. Ekmekcioglu S, Davies MA, Tanese K, et al. Inflammatory marker testing identifies cd74 expression in melanoma tumor cells, and its expression associates with favorable survival for stage III melanoma. *Clin Cancer Res.* 2016;22(12):3016-3024.
132. Harcharik S, Bernardo S, Moskalenko M, et al.

- Defining the role of CD2 in disease progression and overall survival among patients with completely resected stage-II to -III cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2014;70(6):1036-1044.
133. Sivendran S, Chang R, Pham L, et al. Dissection of immune gene networks in primary melanoma tumors critical for antitumor surveillance of patients with stage II-III resectable disease. *J Invest Dermatol*. 2014;134(8):2202-2211.
134. Oba J, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, et al. CD10-Equipped melanoma cells acquire highly potent tumorigenic activity: a plausible explanation of their significance for a poor prognosis. *PLoS One*. 2016;11(2):e0149285.
135. Thomas-Pfaab M, Annereau JP, Munsch C, et al. CD10 expression by melanoma cells is associated with aggressive behavior in vitro and predicts rapid metastatic progression in humans. *J Dermatol Sci*. 2013;69(2):105-113.
136. Oba J, Nakahara T, Hayashida S, et al. Expression of CD10 predicts tumor progression and unfavorable prognosis in malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(6):1152-1160.
137. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-1964.
138. Fu Q, Chen N, Ge C, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology*. 2019;8(7):1593806.
139. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science*. 2015;348(6230):124-128.
140. Edwards J, Ferguson PM, Lo SN, et al. Tumor mutation burden and structural chromosomal aberrations are not associated with T-cell density or patient survival in acral, mucosal, and cutaneous melanomas. *Cancer Immunol Res*. 2020;8(11):1346-1353.
141. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, et al. Genomic and transcriptomic features of response to Anti-PD-1 Therapy in metastatic melanoma. *Cell*. 2016;165(1):35-44.
142. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2014;371(23):2189-2199.
143. Soares CD, Morais TML, Carlos R, et al. Prognostic importance of mitochondrial markers in mucosal and cutaneous head and neck melanomas. *Hum Pathol*. 2019;85:279-289.
144. Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, et al. Prospective multi-institutional study of reverse transcriptase polymerase chain reaction for molecular staging of melanoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(18):2849-2857.
145. Xu X, Gimotty PA, Guerry D, et al. Lymphatic invasion revealed by multispectral imaging is common in primary melanomas and associates with prognosis. *Hum Pathol*. 2008;39(6):901-909.
146. Petersson F, Diwan AH, Ivan D, et al.

- Immunohistochemical detection of lymphovascular invasion with D2-40 in melanoma correlates with sentinel lymph node status, metastasis and survival. *J Cutan Pathol.* 2009;36(11):1157-1163.
147. Pettitt M, Allison A, Shimoni T, Uchida T, Raimer S, Kelly B. Lymphatic invasion detected by D2-40/S-100 dual immunohistochemistry does not predict sentinel lymph node status in melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2009;61(5):819-828.
148. Rose AE, Christos PJ, Lackaye D, et al. Clinical relevance of detection of lymphovascular invasion in primary melanoma using endothelial markers D2-40 and CD34. *Am J Surg Pathol.* 2011;35(10):1441-1449.
149. Liu B, Ma J, Wang X, et al. Lymphangiogenesis and its relationship with lymphatic metastasis and prognosis in malignant melanoma. *Anat Rec (Hoboken).* 2008;291(10):1227-1235.
150. Buzrla P, Dvorackova J, Motyka O. Lymphangiogenesis and its correlation with the VEGF expression and the sentinel lymph node in cutaneous melanomas. *Biomed Res Int.* 2014;2014:372979.
151. Gallego E, Vicioso L, Alvarez M, et al. Stromal expression of vascular endothelial growth factor C is relevant to predict sentinel lymph node status in melanomas. *Virchows Arch.* 2011;458(5):621-630.
152. Boone B, Blokx W, De Bacquer D, Lambert J, Ruitter D, Brochez L. The role of VEGF-C staining in predicting regional metastasis in melanoma. *Virchows Arch.* 2008;453(3):257-265.
153. Brychtova S, Bezdekova M, Brychta T, Tichy M. The role of vascular endothelial growth factors and their receptors in malignant melanomas. *Neoplasma.* 2008;55(4):273-279.
154. Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, et al. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. *Mod Pathol.* 2005;18(9):1232-1242.
155. Toberer F, Haenssle HA, Laimer M, et al. Vascular endothelial growth factor Receptor-3 expression predicts sentinel node status in primary cutaneous melanoma. *Acta Derm Venereol.* 2020;100(15):adv00235.
156. Hemler ME. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(1):49-60.
157. Fan J, Zhu GZ, Niles RM. Expression and function of CD9 in melanoma cells. *Mol Carcinog.* 2010;49(1):85-93.
158. Powner D, Kopp PM, Monkley SJ, Critchley DR, Berditchevski F. Tetraspanin CD9 in cell migration. *Biochem Soc Trans.* 2011;39(2):563-567.
159. Lucarini G, Molinelli E, Licini C, et al. Tetraspanin CD9 Expression Predicts Sentinel Node Status in Patients with Cutaneous Melanoma. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9):4775.
160. Liang P, Miao M, Liu Z, et al. CD9 expression indicates a poor outcome in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Biomark.* 2018;21(4):781-786.
161. Tasdemir A, Soyuer I, Unal D, Artis T.

- Prognostic value of NF- κ B, CD9, and VEGF in gastrointestinal stromal tumors. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2013;17(6):493-498.
162. Miki Y, Yashiro M, Okuno T, et al. CD9-positive exosomes from cancer-associated fibroblasts stimulate the migration ability of scirrhous-type gastric cancer cells. *Br J Cancer*. 2018;118(6):867-877.
163. Nagare RP, Sneha S, Krishnapriya S, et al. ALDH1A1+ ovarian cancer stem cells co-expressing surface markers CD24, EPHA1 and CD9 form tumours in vivo. *Exp Cell Res*. 2020;392(1):112009.
164. Logozzi M, Di Raimo R, Mizzoni D, Fais S. Immunocapture-based ELISA to characterize and quantify exosomes in both cell culture supernatants and body fluids. *Methods Enzymol*. 2020;645:155-180.
165. Longo N, Yáñez-Mó M, Mittelbrunn M, et al. Regulatory role of tetraspanin CD9 in tumor-endothelial cell interaction during transendothelial invasion of melanoma cells. *Blood*. 2001;98(13):3717-3726.
166. Erovic BM, Neuchrist C, Kandutsch S, Woegerbauer M, Pammer J. CD9 expression on lymphatic vessels in head and neck mucosa. *Mod Pathol*. 2003;16(10):1028-1034.
167. Doeden K, Ma Z, Narasimhan B, Swetter SM, Detmar M, Dadras SS. Lymphatic invasion in cutaneous melanoma is associated with sentinel lymph node metastasis. *J Cutan Pathol*. 2009;36(7):772-780.
168. Fohn LE, Rodriguez A, Kelley MC, et al. D2-40 lymphatic marker for detecting lymphatic invasion in thin to intermediate thickness melanomas: association with sentinel lymph node status and prognostic value—a retrospective case study. *J Am Acad Dermatol*. 2011;64(2):336-345.
169. Gerami P, Cook RW, Russell MC, et al. Gene expression profiling for molecular staging of cutaneous melanoma in patients undergoing sentinel lymph node biopsy. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(5):780-5.e3.
170. Cook RW, Middlebrook B, Wilkinson J, et al. Analytic validity of decision Dx-Melanoma, a gene expression profile test for determining metastatic risk in melanoma patients. *Diagn Pathol*. 2018;13(1):13.
171. Keller J, Schwartz TL, Lizalek JM, et al. Prospective validation of the prognostic 31-gene expression profiling test in primary cutaneous melanoma. *Cancer Med*. 2019;8(5):2205-2212.
172. Podlipnik S, Carrera C, Boada A, et al. Early outcome of a 31-gene expression profile test in 86 AJCC stage IB-II melanoma patients. A prospective multicentre cohort study. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2019;33(5):857-862.
173. Greenhaw BN, Zitelli JA, Brodland DG. Estimation of prognosis in invasive cutaneous melanoma: an independent study of the accuracy of a gene expression profile test. *Dermatol Surg*. 2018;44(12):1494-1500.
174. Hsueh EC, DeBloom JR, Lee J, et al. Interim analysis of survival in a prospective, multi-center registry cohort of cutaneous melanoma tested with a prognostic 31-gene expression profile test. *J Hematol Oncol*. 2017;10(1):152.

175. Vetto JT, Hsueh EC, Gastman BR, et al. Guidance of sentinel lymph node biopsy decisions in patients with T1-T2 melanoma using gene expression profiling. *Future Oncol.* 2019;15(11):1207-1217.
176. Carr MJ, Monzon FA, Zager JS. Sentinel lymph node biopsy in melanoma: beyond histologic factors. *Clin Exp Metastasis.* 2022;39(1):29-38.
177. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther.* 2019;20(11):1366-1379.
178. Vereecken P, Cornelis F, Van Baren N, Vandersleyen V, Baurain JF. A synopsis of serum biomarkers in cutaneous melanoma patients. *Dermatol Res Pract.* 2012;2012:260643.
179. Pantel K, Alix-Panabières C. Real-time liquid biopsy in cancer patients: fact or fiction?. *Cancer Res.* 2013;73(21):6384-6388.
180. Jing SW, Wang YD, Chen LQ, et al. Hypoxia suppresses E-cadherin and enhances matrix metalloproteinase-2 expression favoring esophageal carcinoma migration and invasion via hypoxia inducible factor-1 alpha activation. *Dis Esophagus.* 2013;26(1):75-83
181. Lade-Keller J, Riber-Hansen R, Guldborg P, Schmidt H, Hamilton-Dutoit SJ, Steiniche T. E- to N-cadherin switch in melanoma is associated with decreased expression of phosphatase and tensin homolog and cancer progression. *Br J Dermatol.* 2013;169(3):618-628.
182. Haass NK, Smalley KS, Herlyn M. The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol.* 2004;35(3):309-318.
183. Kuphal S, Haass K. Cell-cell contacts in melanoma and the tumor microenvironment. *Melanoma Development: Molecular Biology, Genetics and Clinical Application (2017):* 227-269.
184. Nielsen J, Christiansen J, Lykke-Andersen J, Johnsen AH, Wewer UM, Nielsen FC. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol.* 1999;19(2):1262-1270.
185. Müller-Pillasch F, Lacher U, Wallrapp C, et al. Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. *Oncogene.* 1997;14(22):2729-2733.
186. Pryor JG, Bourne PA, Yang Q, Spaulding BO, Scott GA, Xu H. IMP-3 is a novel progression marker in malignant melanoma. *Mod Pathol.* 2008;21(4):431-437.
187. Chen L, Xie Y, Li X, et al. Prognostic value of high IMP3 expression in solid tumors: a meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2017;10:2849-2863.
188. Horton JK, Watson M, Stefanick DF, Shaughnessy DT, Taylor JA, Wilson SH. XRCC1 and DNA polymerase beta in cellular protection against cytotoxic DNA single-strand breaks. *Cell Res.* 2008;18(1):48-63.
189. Macgregor S, Montgomery GW, Liu JZ, et al. Genome-wide association study identifies a new melanoma susceptibility locus at 1q21.3.

- Nat Genet. 2011;43(11):1114-1118.
190. Law MH, Rowe CJ, Montgomery GW, Hayward NK, MacGregor S, Khosrotehrani K. PARP1 polymorphisms play opposing roles in melanoma occurrence and survival. *Int J Cancer*. 2015;136(10):2488-2489.
191. Davies JR, Jewell R, Affleck P, et al. Inherited variation in the PARP1 gene and survival from melanoma. *Int J Cancer*. 2014;135(7):1625-1633.
192. Rodríguez MI, Peralta-Leal A, O'Valle F, et al. PARP-1 regulates metastatic melanoma through modulation of vimentin-induced malignant transformation. *PLoS Genet*. 2013;9(6):e1003531.
193. Liehr T, Kuhlenbäumer G, Wulf P, et al. Regional localization of the human epithelial membrane protein genes 1, 2, and 3 (EMP1, EMP2, EMP3) to 12p12.3, 16p13.2, and 19q13.3. *Genomics*. 1999;58(1):106-108.
194. Taylor V, Welcher AA, Program AE, Suter U. Epithelial membrane protein-1, peripheral myelin protein 22, and lens membrane protein 20 define a novel gene family. *J Biol Chem*. 1995;270(48):28824-28833.
195. Bredel M, Bredel C, Juric D, et al. Functional network analysis reveals extended gliomagenesis pathway maps and three novel MYC-interacting genes in human gliomas. *Cancer Res*. 2005;65(19):8679-8689.
196. Mackay A, Jones C, Dexter T, et al. cDNA microarray analysis of genes associated with ERBB2 (HER2/neu) overexpression in human mammary luminal epithelial cells. *Oncogene*. 2003;22(17):2680-2688.
197. Ariès IM, Jerchel IS, van den Dungen RE, et al. EMP1, a novel poor prognostic factor in pediatric leukemia regulates prednisolone resistance, cell proliferation, migration and adhesion. *Leukemia*. 2014;28(9):1828-1837.
198. Sun GG, Wang YD, Lu YF, Hu WN. EMP1, a member of a new family of antiproliferative genes in breast carcinoma. *Tumour Biol*. 2014;35(4):3347-3354.
199. Sun GG, Wang YD, Cui DW, Cheng YJ, Hu WN. EMP1 regulates caspase-9 and VEGFC expression and suppresses prostate cancer cell proliferation and invasion. *Tumour Biol*. 2014;35(4):3455-3462.
200. Atun R, Jaffray DA, Barton MB, et al. Expanding global access to radiotherapy. *Lancet Oncol*. 2015;16(10):1153-1186.
201. Barton MB, Jacob S, Shafiq J, et al. Estimating the demand for radiotherapy from the evidence: a review of changes from 2003 to 2012. *Radiother Oncol*. 2014;112(1):140-144.
202. Scaife JE, Barnett GC, Noble DJ, et al. Exploiting biological and physical determinants of radiotherapy toxicity to individualize treatment. *Br J Radiol*. 2015;88(1051):20150172.
203. López E, Guerrero R, Núñez MI, et al. Early and late skin reactions to radiotherapy for breast cancer and their correlation with radiation-induced DNA damage in lymphocytes. *Breast Cancer Res*. 2005;7(5):R690-R698.
204. Dietrich A, Koi L, Zöphel K, et al. Improving

- external beam radiotherapy by combination with internal irradiation. *Br J Radiol.* 2015;88(1051):20150042.
205. Burnet NG, Williams G, Howard N. Phosphorus-32 for intractable bony pain from carcinoma of the prostate. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 1990;2(4):220-223.
206. López E, Núñez MI, Guerrero MR, et al. Breast cancer acute radiotherapy morbidity evaluated by different scoring systems. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;73(2):127-134.
207. Ree AH, Redalen KR. Personalized radiotherapy: concepts, biomarkers and trial design. *Br J Radiol.* 2015;88(1051):20150009.
208. Lambin P, van Stiphout RG, Starmans MH, et al. Predicting outcomes in radiation oncology multifactorial decision support systems. *Nat Rev Clin Oncol.* 2013;10(1):27-40.
209. Barker HE, Paget JT, Khan AA, Harrington KJ. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(7):409-425.
210. Begg AC, Stewart FA, Vens C. Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(4):239-253.
211. Ruiz de Almodóvar JM, Núñez MI, McMillan TJ, et al. Initial radiation-induced DNA damage in human tumour cell lines: a correlation with intrinsic cellular radiosensitivity. *Br J Cancer.* 1994;69(3):457-462.
212. Gómez-Millán J, Katz IS, Farias Vde A, et al. The importance of bystander effects in radiation therapy in melanoma skin-cancer cells and umbilical-cord stromal stem cells. *Radiother Oncol.* 2012;102(3):450-458.
213. Lara PC, López-Peñalver JJ, Farias Vde A, Ruiz-Ruiz MC, Oliver FJ, Ruiz de Almodóvar JM. Direct and bystander radiation effects: a biophysical model and clinical perspectives. *Cancer Lett.* 2015;356(1):5-16.
214. Klammer H, Mladenov E, Li F, Iliakis G. Bystander effects as manifestation of intercellular communication of DNA damage and of the cellular oxidative status. *Cancer Lett.* 2015;356(1):58-71.
215. Prise KM, O'Sullivan JM. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(5):351-360.
216. Pinar B, Lara PC, Lloret M, et al. Radiation-induced DNA damage as a predictor of long-term toxicity in locally advanced breast cancer patients treated with high-dose hyperfractionated radical radiotherapy. *Radiat Res.* 2007;168(4):415-422.
217. Steel GG. Cell loss as a factor in the growth rate of human tumours. *Eur J Cancer.* 1967;3(4):381-387.
218. Peacock JH, de Almodóvar MR, McMillan TJ, Steel GG. The nature of the initial slope of radiation cell survival curves. *BJR Suppl.* 1992;24:57-60.
219. Ruiz de Almodóvar JM, Steel GG, Whitaker SJ, McMillan TJ. A comparison of methods for calculating DNA double-strand break induction frequency in mammalian cells by

- pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Radiat Biol.* 1994;65(6):641-649.
220. Smith ZD, Sindhu C, Meissner A. Molecular features of cellular reprogramming and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2016;17(3):139-154.
221. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292(5819):154-156.
222. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-1147.
223. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78(12):7634-7638.
224. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation.* 1974;17(4):331-340.
225. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000;2(6):477-488.
226. Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells.* 2008;26(3):591-599.
227. North TE, de Bruijn MF, Stacy T, et al. Runx1 expression marks long-term repopulating hematopoietic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Immunity.* 2002;16(5):661-672.
228. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284(5411):143-147.
229. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001;44(8):1928-1942.
230. Miura M, Gronthos S, Zhao M, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):5807-5812.
231. Jankowski RJ, Deasy BM, Huard J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther.* 2002;9(10):642-647.
232. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood.* 2003;102(4):1548-1549.
233. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):568-584.
234. Van Damme A, Thorrez L, Ma L, et al. Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells. *Stem Cells.* 2006;24(4):896-907.
235. Horowitz MM. Current status of allogeneic bone marrow transplantation in acquired aplastic anemia. *Semin Hematol.*

- 2000;37(1):30-42.
236. Appelbaum FR, Herzig GP, Ziegler JL, Graw RG, Levine AS, Deisseroth AB. Successful engraftment of cryopreserved autologous bone marrow in patients with malignant lymphoma. *Blood*. 1978;52(1):85-95.
237. Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev*. 2001;122(7):713-734.
238. Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature*. 2006;441(7097):1080-1086.
239. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006;119(Pt 11):2204-2213.
240. Farias VA, Linares-Fernández JL, Peñalver JL, et al. Human umbilical cord stromal stem cell express CD10 and exert contractile properties. *Placenta*. 2011;32(1):86-95.
241. Hoang DM, Pham PT, Bach TQ, et al. Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 2022;7(1):272.
242. Vezzani B, Pierantozzi E, Sorrentino V. Mesenchymal stem cells: from the perivascular environment to clinical applications. *Histol Histopathol*. 2018;33(12):1235-1246.
243. Chen MY, Lie PC, Li ZL, Wei X. Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2009;37(5):629-640.
244. Fong CY, Chak LL, Biswas A, et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2011;7(1):1-16.
245. Bateman ME, Strong AL, Gimble JM, Bunnell BA. Concise review: Using fat to fight disease: A systematic review of nonhomologous adipose-derived stromal/stem cell therapies. *Stem Cells*. 2018;36(9):1311-1328.
246. Hoogduijn MJ. Are mesenchymal stromal cells immune cells?. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):88.
247. Walling A, Shapiro J, Ast T. What makes a good reflective paper?. *Fam Med*. 2013;45(1):7-12.
248. Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*. 1995;16(4):557-564.
249. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med*. 1999;5(3):309-313.
250. Sasportas LS, Kasmieh R, Wakimoto H, et al. Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(12):4822-4827.

251. Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, Corcoran KE, Bryan M, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol.* 2010;184(10):5885-5894.
252. Menon LG, Picinich S, Koneru R, et al. Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. *Stem Cells.* 2007;25(2):520-528.
253. Zischek C, Niess H, Ischenko I, et al. Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma. *Ann Surg.* 2009;250(5):747-753.
254. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, et al. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells.* 2009;27(10):2614-2623.
255. Hong IS, Lee HY, Kang KS. Mesenchymal stem cells and cancer: friends or enemies?. *Mutat Res.* 2014;768:98-106.
256. Prockop DJ. The exciting prospects of new therapies with mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2017;19(1):1-8.
257. Iglesias-López C, Agustí A, Obach M, Vallano A. Regulatory Framework for Advanced Therapy Medicinal Products in Europe and United States. *Front Pharmacol.* 2019;10:921.
258. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *cytotherapy.* 2006;8(4):315-317.
259. Wagner W, Wein F, Seckinger A, et al. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33(11):1402-1416.
260. Sousa BR, Parreira RC, Fonseca EA, et al. Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytometry A.* 2014;85(1):43-77.
261. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal.* 2011;9:12.
262. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol.* 2012;3:297.
263. González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology.* 2009;136(3):978-989.
264. Kanazawa H, Fujimoto Y, Teratani T, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model. *PLoS One.* 2011;6(4):e19195.
265. Sensebé L, Fleury-Cappellesso S. Biodistribution of mesenchymal stem/stromal cells in a preclinical setting. *Stem Cells Int.*

- 2013;2013:678063.
266. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009;5(1):54-63.
267. Toupet K, Maumus M, Peyrafitte JA, et al. Long-term detection of human adipose-derived mesenchymal stem cells after intraarticular injection in SCID mice. *Arthritis Rheum*. 2013;65(7):1786-1794.
268. Ramot Y, Meiron M, Toren A, Steiner M, Nyska A. Safety and biodistribution profile of placental-derived mesenchymal stromal cells (PLX-PAD) following intramuscular delivery. *Toxicol Pathol*. 2009;37(5):606-616.
269. Gholamrezanezhad A, Mirpour S, Bagheri M, et al. In vivo tracking of ¹¹¹In-oxine labeled mesenchymal stem cells following infusion in patients with advanced cirrhosis. *Nucl Med Biol*. 2011;38(7):961-967.
270. François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther*. 2012;2
271. Sémont A, Mouseddine M, François A, et al. Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. *Cell Death Differ*. 2010;17(6):952-961.
272. Reyes B, Coca MI, Codinach M, et al. Assessment of biodistribution using mesenchymal stromal cells: Algorithm for study design and challenges in detection methodologies. *Cytotherapy*. 2017;19(9):1060-1069.
273. Marquina M, Collado JA, Pérez-Cruz M, et al. Biodistribution and Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells in a rat model of intraarticular chondrocyte xenotransplantation. *Front Immunol*. 2017;8:1465.
274. Chulpanova DS, Kitaeva KV, Tazetdinova LG, James V, Rizvanov AA, Solovyeva VV. Application of mesenchymal stem cells for therapeutic agent delivery in anti-tumor treatment. *Front Pharmacol*. 2018;9:259.
275. Stefani FR, Eberstål S, Vergani S, Kristiansen TA, Bengzon J. Low-dose irradiated mesenchymal stromal cells break tumor defensive properties in vivo. *Int J Cancer*. 2018;143(9):2200-2212.
276. de Araújo Farias V, O'Valle F, Lerma BA, et al. Human mesenchymal stem cells enhance the systemic effects of radiotherapy. *Oncotarget*. 2015;6(31):31164-31180.
277. Mohammadpour H, Pourfathollah AA, Nikougoftar Zarif M, Shahbazfar AA. Irradiation enhances susceptibility of tumor cells to the antitumor effects of TNF- α activated adipose derived mesenchymal stem cells in breast cancer model. *Sci Rep*. 2016;6:28433.
278. Klopp AH, Spaeth EL, Dembinski JL, et al. Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer Res*. 2007;67(24):11687-11695.

279. Pan Q, Fouraschen SM, de Ruitter PE, et al. Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014;239(1):105-115.
280. Li H, Fan X, Kovi RC, et al. Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice. *Cancer Res*. 2007;67(22):10889-10898.
281. Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*. 2006;24(4):1095-1103.
282. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, et al. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res*. 2007;67(19):9142-9149.
283. Meza-Zepeda LA, Noer A, Dahl JA, Micci F, Myklebost O, Collas P. High-resolution analysis of genetic stability of human adipose tissue stem cells cultured to senescence. *J Cell Mol Med*. 2008;12(2):553-563.
284. Røsland GV, Svendsen A, Torsvik A, et al. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res*. 2009;69(13):5331-5339.
285. Wang Y, Huso DL, Harrington J, et al. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy*. 2005;7(6):509-519.
286. Chen G, Yue A, Ruan Z, et al. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells do not undergo malignant transformation during long-term culturing in serum-free medium. *PLoS One*. 2014;9(6):e98565.
287. Cekanova M, Rathore K. Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:1911-1921.
288. Khaled WT, Liu P. Cancer mouse models: past, present and future. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;27:54-60.
289. Cho SY, Kang W, Han JY, et al. An Integrative Approach to Precision Cancer Medicine Using Patient-Derived Xenografts. *Mol Cells*. 2016;39(2):77-86.
290. Ruggeri BA, Camp F, Miknyoczki S. Animal models of disease: pre-clinical animal models of cancer and their applications and utility in drug discovery. *Biochem Pharmacol*. 2014;87(1):150-161.
291. Becker JC, Houben R, Schrama D, Voigt H, Ugurel S, Reisfeld RA. Mouse models for melanoma: a personal perspective. *Exp Dermatol*. 2010;19(2):157-164.
292. Benga G. Basic studies on gene therapy of human malignant melanoma by use of the human interferon beta gene entrapped in cationic multilamellar liposomes. 1. Morphology and growth rate of six melanoma

- cell lines used in transfection experiments with the human interferon beta gene. *J Cell Mol Med.* 2001;5(4):402-408.
293. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1417-1423.
294. Thies A, Mauer S, Fodstad O, Schumacher U. Clinically proven markers of metastasis predict metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice. *Br J Cancer.* 2007;96(4):609-616.
295. Chandrasekaran S, Giang UB, Xu L, DeLouise LA. In vitro assays for determining the metastatic potential of melanoma cell lines with characterized in vivo invasiveness. *Biomed Microdevices.* 2016;18(5):89.
296. Damjanov I MacCue PA. *Histopathology : A Color Atlas and Textbook.* Williams & Wilkins; 1996.
297. Lehmann R, Tautz D. In situ hybridization to RNA. *Methods Cell Biol.* 1994;44:575-598.
298. Swanson PE. Foundations of immunohistochemistry. A practical review. *Am J Clin Pathol.* 1988;90(3):333-339.
299. Mincarelli L, Lister A, Lipscombe J, Macaulay IC. Defining Cell Identity with Single-Cell Omics. *Proteomics.* 2018;18(18):e1700312.
300. Macaulay IC, Ponting CP, Voet T. Single-cell multiomics: multiple measurements from single cells. *Trends Genet.* 2017;33(2):155-168.
301. Xia B, Yanai I. A periodic table of cell types. *Development.* 2019;146(12):dev169854.
302. Papalexi E, Satija R. Single-cell RNA sequencing to explore immune cell heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(1):35-45.
303. Lawson DA, Kessenbrock K, Davis RT, Pervolarakis N, Werb Z. Tumour heterogeneity and metastasis at single-cell resolution. *Nat Cell Biol.* 2018;20(12):1349-1360.
304. Zheng G, Xie ZY, Wang P, Wu YF, Shen HY. Recent advances of single-cell RNA sequencing technology in mesenchymal stem cell research. *World J Stem Cells.* 2020;12(6):438-447.
305. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1417-1423.
306. Nichterwitz S, Chen G, Aguila Benitez J, et al. Laser capture microscopy coupled with Smart-seq2 for precise spatial transcriptomic profiling. *Nat Commun.* 2016;7:12139.
307. Nichterwitz S, Benitez JA, Hoogstraaten R, Deng Q, Hedlund E. LCM-Seq: A method for spatial transcriptomic profiling using laser capture microdissection coupled with poly-a-based rna sequencing. *Methods Mol Biol.* 2018;1649:95-110.
308. Chen J, Suo S, Tam PP, Han JJ, Peng G, Jing N. Spatial transcriptomic analysis of cryosectioned tissue samples with Geo-seq.

- Nat Protoc. 2017;12(3):566-580.
309. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science*. 2016;352(6282):189-196.
310. Peng G, Suo S, Cui G, et al. Molecular architecture of lineage allocation and tissue organization in early mouse embryo. *Nature*. 2019;572(7770):528-532.
311. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol*. 2008;26(3):317-325.
312. Halpern KB, Shenhav R, Massalha H, et al. Paired-cell sequencing enables spatial gene expression mapping of liver endothelial cells. *Nat Biotechnol*. 2018;36(10):962-970.
313. Boisset JC, Vivié J, Grün D, Muraro MJ, Lyubimova A, van Oudenaarden A. Mapping the physical network of cellular interactions. *Nat Methods*. 2018;15(7):547-553.
314. Giladi A, Cohen M, Medaglia C, et al. Dissecting cellular crosstalk by sequencing physically interacting cells. *Nat Biotechnol*. 2020;38(5):629-637.
315. Satija R, Farrell JA, Gennert D, Schier AF, Regev A. Spatial reconstruction of single-cell gene expression data. *Nat Biotechnol*. 2015;33(5):495-502.
316. Achim K, Pettit JB, Saraiva LR, et al. High-throughput spatial mapping of single-cell RNA-seq data to tissue of origin. *Nat Biotechnol*. 2015;33(5):503-509.
317. Rao A, Barkley D, França GS, Yanai I. Exploring tissue architecture using spatial transcriptomics. *Nature*. 2021;596(7871):211-220.
318. Zhuang X. Spatially resolved single-cell genomics and transcriptomics by imaging. *Nat Methods*. 2021;18(1):18-22.
319. Larsson L, Frisén J, Lundeberg J. Spatially resolved transcriptomics adds a new dimension to genomics. *Nat Methods*. 2021;18(1):15-18.
320. Crosetto N, Bienko M, van Oudenaarden A. Spatially resolved transcriptomics and beyond. *Nat Rev Genet*. 2015;16(1):57-66.
321. Moor AE, Itzkovitz S. Spatial transcriptomics: paving the way for tissue-level systems biology. *Curr Opin Biotechnol*. 2017;46:126-133.
322. Asp M, Bergenstråhle J, Lundeberg J. Spatially resolved transcriptomes-next generation tools for tissue exploration. *Bioessays*. 2020;42(10):e1900221.
323. Waylen LN, Nim HT, Martelotto LG, Ramialison M. From whole-mount to single-cell spatial assessment of gene expression in 3D. *Commun Biol*. 2020;3(1):602.
324. Ståhl PL, Salmén F, Vickovic S, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*. 2016;353(6294):78-82.
325. Jemt A, Salmén F, Lundmark A, et al. An automated approach to prepare tissue-derived

- spatially barcoded RNA-sequencing libraries. *Sci Rep.* 2016;6:37137.
326. Salmén F, Ståhl PL, Mollbrink A, et al. Barcoded solid-phase RNA capture for Spatial Transcriptomics profiling in mammalian tissue sections. *Nat Protoc.* 2018;13(11):2501-2534.
327. Baron M, Tagore M, Hunter MV, et al. The Stress-Like Cancer Cell State Is a Consistent Component of Tumorigenesis. *Cell Syst.* 2020;11(5):536-546.e7.
328. Moncada R, Barkley D, Wagner F, et al. Integrating microarray-based spatial transcriptomics and single-cell RNA-seq reveals tissue architecture in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Nat Biotechnol.* 2020;38(3):333-342.
329. Thrane K, Eriksson H, Maaskola J, Hansson J, Lundeberg J. Spatially Resolved Transcriptomics enables dissection of genetic heterogeneity in stage III cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res.* 2018;78(20):5970-5979.
330. Codeluppi S, Borm LE, Zeisel A, et al. Spatial organization of the somatosensory cortex revealed by osmFISH. *Nat Methods.* 2018;15(11):932-935.
331. Moffitt JR, Hao J, Wang G, Chen KH, Babcock HP, Zhuang X. High-throughput single-cell gene-expression profiling with multiplexed error-robust fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(39):11046-11051.
332. Xia C, Babcock HP, Moffitt JR, Zhuang X. Multiplexed detection of RNA using MERFISH and branched DNA amplification. *Sci Rep.* 2019;9(1):7721.
333. Laurent Najman, Michel Schmitt. Watershed of a Continuous Function. *Signal Processing*, 1994, 38 (1), pp.99-112.
334. Park J, Choi W, Tiesmeyer S, et al. Cell segmentation-free inference of cell types from in situ transcriptomics data. *Nat Commun.* 2021;12(1):3545.
335. Qian X, Harris KD, Hauling T, et al. Probabilistic cell typing enables fine mapping of closely related cell types in situ. *Nat Methods.* 2020;17(1):101-106.
336. Ortiz C, Navarro JF, Jurek A, Märtin A, Lundeberg J, Meletis K. Molecular atlas of the adult mouse brain. *Sci Adv.* 2020;6(26):eabb3446.
337. Maynard KR, Collado-Torres L, Weber LM, et al. Transcriptome-scale spatial gene expression in the human dorsolateral prefrontal cortex. *Nat Neurosci.* 2021;24(3):425-436.
338. Chen H, Murray E, Sinha A, et al. Dissecting mammalian spermatogenesis using spatial transcriptomics. *Cell Rep.* 2021;37(5):109915.
339. Fawcner-Corbett D, Antanaviciute A, Parikh K, et al. Spatiotemporal analysis of human intestinal development at single-cell resolution. *Cell.* 2021;184(3):810-826.e23.
340. Rozenblatt-Rosen O, Regev A, Oberdoerffer P, et al. The Human Tumor Atlas Network: Charting Tumor Transitions across Space and Time at Single-Cell Resolution. *Cell.*

- 2020;181(2):236-249.
341. Lein ES, Hawrylycz MJ, Ao N, et al. Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*. 2007;445(7124):168-176.
342. Berglund E, Maaskola J, Schultz N, et al. Spatial maps of prostate cancer transcriptomes reveal an unexplored landscape of heterogeneity. *Nat Commun*. 2018;9(1):2419.
343. Wang Y, Ma S, Ruzzo WL. Spatial modeling of prostate cancer metabolic gene expression reveals extensive heterogeneity and selective vulnerabilities. *Sci Rep*. 2020;10(1):3490.
344. Smith EA, Hodges HC. The Spatial and Genomic Hierarchy of Tumor Ecosystems Revealed by Single-Cell Technologies. *Trends Cancer*. 2019;5(7):411-425.
345. Charmsaz S, Collins DM, Perry AS, Prencipe M. Novel Strategies for Cancer Treatment: Highlights from the 55th IACR Annual Conference. *Cancers (Basel)*. 2019;11(8):1125.
346. Lee JK, Priceman SJ. Precision Medicine-Enabled Cancer Immunotherapy. *Cancer Treat Res*. 2019;178:189-205.
347. Murciano-Goroff YR, Warner AB, Wolchok JD. The future of cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations. *Cell Res*. 2020;30(6):507-519.
348. Tan X, Sivakumar S, Bednarsch J, et al. Nerve fibers in the tumor microenvironment in neurotropic cancer-pancreatic cancer and cholangiocarcinoma. *Oncogene*. 2021;40(5):899-908.
349. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(4):239-252.
350. Baghban R, Roshangar L, Jahanban-Esfahlan R, et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal*. 2020;18(1):59.
351. Lazcano R, Rojas F, Laberiano C, Hernandez S, Parra ER. Pathology Quality Control for Multiplex Immunofluorescence and Image Analysis Assessment in Longitudinal Studies. *Front Mol Biosci*. 2021;8:661222.
352. Francisco-Cruz A, Rocha P, Reuben A, et al. Analysis of Immune Intratumor Heterogeneity Highlights Immunoregulatory and Coinhibitory Lymphocytes as Hallmarks of Recurrence in Stage I Non-Small Cell Lung Cancer. *Mod Pathol*. 2023;36(1):100028.
353. Hofman P, Badoual C, Henderson F, et al. Multiplexed Immunohistochemistry for Molecular and Immune Profiling in Lung Cancer-Just About Ready for Prime-Time?. *Cancers (Basel)*. 2019;11(3):283.
354. Lee WC, Diao L, Wang J, et al. Multiregion gene expression profiling reveals heterogeneity in molecular subtypes and immunotherapy response signatures in lung cancer. *Mod Pathol*. 2018;31(6):947-955.
355. McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell*. 2015;27(1):15-26.
356. Merritt CR, Ong GT, Church SE, et al. Multiplex digital spatial profiling of proteins

- and RNA in fixed tissue. *Nat Biotechnol.* 2020;38(5):586-599.
357. GeoMx® Data Center . (2022) Seattle, Washington. Available at: <https://nanosting.com/products/geomx-digital-spatial-profiler/geomx-data-center/>
358. Van TM, Blank CU. A user's perspective on GeoMx™ digital spatial profiling. *Immunooncol Technol.* 2019;1:11-18.
359. Zollinger DR, Lingle SE, Sorg K, Beechem JM, Merritt CR. GeoMx™ RNA assay: High multiplex, digital, spatial analysis of RNA in FFPE tissue. *Methods Mol Biol.* 2020;2148:331-345.
360. GeoMx DSP Manual Slide Preparation . (2022). Seattle, Washington. Available at: <https://nanosting.com/wp-content/uploads/2022/06/MAN-10150-01-GeoMx-DSP-Manual-Slide-Preparation-User-Manual.pdf>
361. Turashvili G, Brogi E. Tumor Heterogeneity in Breast Cancer. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:227.
362. Cyll K, Ersv er E, Vlatkovic L, et al. Tumour heterogeneity poses a significant challenge to cancer biomarker research. *Br J Cancer.* 2017;117(3):367-375.
363. Fisher R, Pusztai L, Swanton C. Cancer heterogeneity: implications for targeted therapeutics. *Br J Cancer.* 2013;108(3):479-485.
364. Khan MAW, Ologun G, Arora R, McQuade JL, Wargo JA. Gut Microbiome Modulates Response to Cancer Immunotherapy. *Dig Dis Sci.* 2020;65(3):885-896.
365. Silverman DA, Martinez VK, Dougherty PM, Myers JN, Calin GA, Amit M. Cancer-Associated Neurogenesis and Nerve-Cancer Cross-talk. *Cancer Res.* 2021;81(6):1431-1440.
366. Shklovskaya E, Rizos H. Spatial and temporal changes in PD-L1 expression in cancer: the role of genetic drivers, tumor microenvironment and resistance to therapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19):7139.
367. Cho J. Basic immunohistochemistry for lymphoma diagnosis. *Blood Res.* 2022;57(S1):55-61.
368. Widodo SS, Hutchinson RA, Fang Y, et al. Toward precision immunotherapy using multiplex immunohistochemistry and in silico methods to define the tumor immune microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2021;70(7):1811-1820.
369. Hernandez S, Rojas F, Laberiano C, Lazcano R, Wistuba I, Parra ER. Multiplex Immunofluorescence tyramide signal amplification for immune cell profiling of paraffin-embedded tumor tissues. *Front Mol Biosci.* 2021;8:667067.
370. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, et al. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. *Nat Med.* 2018;24(5):541-550.
371. Kather JN, Suarez-Carmona M, Charoentong P, et al. Topography of cancer-associated immune cells in human solid tumors. *Elife.* 2018;7:e36967

372. Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L. Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. *Neoplasma*. 2016;63(4):510-517.
373. Tímár J, Udvarhelyi N, Bánfalvi T, Gilde K, Orosz Z. Accuracy of the determination of S100B protein expression in malignant melanoma using polyclonal or monoclonal antibodies. *Histopathology*. 2004;44(2):180-184.
374. Gleason BC, Nascimento AF. HMB-45 and Melan-A are useful in the differential diagnosis between granular cell tumor and malignant melanoma. *Am J Dermatopathol*. 2007;29(1):22-27.
375. Hessler M, Jalilian E, Xu Q, et al. Melanoma Biomarkers and Their Potential Application for In Vivo Diagnostic Imaging Modalities. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9583.
376. Vathiotis IA, Yang Z, Reeves J, et al. Models that combine transcriptomic with spatial protein information exceed the predictive value for either single modality. *NPJ Precis Oncol*. 2021;5(1):45.
377. Toki MI, Merritt CR, Wong PF, et al. High-plex predictive marker discovery for melanoma immunotherapy-treated patients using Digital Spatial Profiling. *Clin Cancer Res*. 2019;25(18):5503-5512.
378. Cabrita R, Lauss M, Sanna A, et al. Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma. *Nature*. 2020;577(7791):561-565.
379. Helmink BA, Reddy SM, Gao J, et al. B cells and tertiary lymphoid structures promote immunotherapy response. *Nature*. 2020;577(7791):549-555.
380. Hernandez S, Lazcano R, Serrano A, et al. Challenges and opportunities for immunoprofiling using a Spatial High-Plex Technology: The NanoString GeoMx® Digital Spatial Profiler. *Front Oncol*. 2022;12:890410.
381. Funes JM, Quintero M, Henderson S, et al. Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(15):6223-6228.
382. Preston Campbell J, Mulcrone P, Masood SK, et al. TRIzol and Alu qPCR-based quantification of metastatic seeding within the skeleton. *Sci Rep*. 2015;5:12635.
383. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.
384. van Hijfte L, Geurts M, Vallentgoed WR, et al. Alternative normalization and analysis pipeline to address systematic bias in NanoString GeoMx Digital Spatial Profiling data. *iScience*. 2022;26(1):105760.
385. Gupta S, Chen T, Destenaves B. Quantitative RNA assessment and long-term stability in the FFPE tumor samples using Digital Spatial Profiler. *Immuno-oncol Technol*. 2021;13:100069.
386. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide

- expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(43):15545-15550.
387. Xie Z, Kropiwnicki E, Wojciechowicz ML, et al. Getting Started with LINCS Datasets and Tools. *Curr Protoc*. 2022;2(7):e487.
388. Xie Z, Bailey A, Kuleshov MV, et al. Gene Set Knowledge Discovery with Enrichr. *Curr Protoc*. 2021;1(3):e90.
389. Liao Y, Wang J, Jaehnig EJ, Shi Z, Zhang B. WebGestalt 2019: gene set analysis toolkit with revamped UIs and APIs. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(W1):W199-W205.
390. de Araujo Farias V, O'Valle F, Serrano-Saenz S, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells enhance radiotherapy-induced cell death in tumor and metastatic tumor foci. *Mol Cancer*. 2018;17(1):122.
391. Beckner ME, Gobbel GT, Abounader R, et al. Glycolytic glioma cells with active glycogen synthase are sensitive to PTEN and inhibitors of PI3K and gluconeogenesis. *Lab Invest*. 2005;85(12):1457-1470.
392. Schmit K, Michiels C. TMEM Proteins in Cancer: A Review. *Front Pharmacol*. 2018;9:1345.
393. Strizzi L, Postovit LM, Margaryan NV, et al. Nodal as a biomarker for melanoma progression and a new therapeutic target for clinical intervention. *Expert Rev Dermatol*. 2009;4(1):67-78.
394. Kirsammer G, Strizzi L, Margaryan NV, et al. Nodal signaling promotes a tumorigenic phenotype in human breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2014;29:40-50.
395. Kim HY, Lee H, Kim SH, Jin H, Bae J, Choi HK. Discovery of potential biomarkers in human melanoma cells with different metastatic potential by metabolic and lipidomic profiling. *Sci Rep*. 2017;7(1):8864.
396. Farias VA, Tovar I, Del Moral R, et al. Enhancing the Bystander and Abscopal Effects to Improve Radiotherapy Outcomes. *Front Oncol*. 2020;9:1381.
397. Liu L, Michowski W, Kolodziejczyk A, Sicinski P. The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nat Cell Biol*. 2019;21(9):1060-1067.
398. Soufi A, Dalton S. Cycling through developmental decisions: how cell cycle dynamics control pluripotency, differentiation and reprogramming. *Development*. 2016;143(23):4301-4311.
399. Fares J, Fares MY, Khachfe HH, Salhab HA, Fares Y. Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduct Target Ther*. 2020;5(1):28.
400. Lee RH, Yoon N, Reneau JC, Prockop DJ. Preactivation of human MSCs with TNF- α enhances tumor-suppressive activity. *Cell Stem Cell*. 2012;11(6):825-835.
401. Weyd H. More than just innate affairs - on the role of annexins in adaptive immunity. *Biol Chem*. 2016;397(10):1017-1029.
402. Tovar I, Guerrero R, López-Peñalver JJ, Expósito J, Ruiz de Almodóvar JM. Rationale for the use of radiation-activated

- mesenchymal stromal/stem cells in acute respiratory distress syndrome. *Cells*. 2020;9(9):2015.
403. Cordeiro MF, Marmitt LP, Horn AP. Subcutaneous injection of multipotent mesenchymal stromal cells admixed with melanoma cells in mice favors tumor incidence and growth: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dermatol Res*. 2018;310(3):231-240.
404. Jazedje T, Ribeiro AL, Pellati M, et al. Human mesenchymal stromal cells transplantation may enhance or inhibit 4T1 murine breast adenocarcinoma through different approaches. *Stem Cells Int*. 2015;2015:796215.
405. Xu WT, Bian ZY, Fan QM, Li G, Tang TT. Human mesenchymal stem cells (hMSCs) target osteosarcoma and promote its growth and pulmonary metastasis. *Cancer Lett*. 2009;281(1):32-41.
406. Zhu W, Xu W, Jiang R, et al. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol*. 2006;80(3):267-274.
407. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, et al. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*. 2009;4(4):e4992.
408. Okumura T, Wang SS, Takaishi S, et al. Identification of a bone marrow-derived mesenchymal progenitor cell subset that can contribute to the gastric epithelium. *Lab Invest*. 2009;89(12):1410-1422.
409. Nakamizo A, Marini F, Amano T, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*. 2005;65(8):3307-3318.
410. Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, et al. VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer*. 2008;99(4):622-631.
411. Block GJ, Ohkouchi S, Fung F, et al. Multipotent stromal cells are activated to reduce apoptosis in part by upregulation and secretion of stanniocalcin-1. *Stem Cells*. 2009;27(3):670-681.
412. Nomoto-Kojima N, Aoki S, Uchihashi K, et al. Interaction between adipose tissue stromal cells and gastric cancer cells in vitro. *Cell Tissue Res*. 2011;344(2):287-298.
413. Yu L, Xu H, Wasco MJ, Bourne PA, Ma L. IMP-3 expression in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol*. 2010;37(3):316-322.
414. Deforz E, Vargas TR, Kropp J, Vandamme M, Pinna G, Poleskaya A. IMP-3 protects the mRNAs of cyclins D1 and D3 from GW182/AGO2-dependent translational repression. *Int J Oncol*. 2016;49(6):2578-2588.
415. Sheen YS, Liao YH, Lin MH, et al. IMP-3 promotes migration and invasion of melanoma cells by modulating the expression of HMGA2 and predicts poor prognosis in melanoma. *J Invest Dermatol*. 2015;135(4):1065-1073.
416. Burdelski C, Jakani-Karimi N, Jacobsen F, et al. IMP3 overexpression occurs in various important cancer types and is linked to

- aggressive tumor features: A tissue microarray study on 8,877 human cancers and normal tissues. *Oncol Rep.* 2018;39(1):3-12.
417. Gong Y, Woda BA, Jiang Z. Oncofetal protein IMP3, a new cancer biomarker. *Adv Anat Pathol.* 2014;21(3):191-200.
418. Park JY, Choe M, Kang Y, Lee SS. IMP3, a promising prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. *Korean J Pathol.* 2014;48(2):108-116.
419. Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):131-142.
420. Su P, Hu J, Zhang H, et al. IMP3 expression is associated with epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014;7(6):3008-3017.
421. Wu C, Ma H, Qi G, Chen F, Chu J. Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 3 promotes cell proliferation, migration and invasion in human glioblastoma. *Onco Targets Ther.* 2019;12:3661-3670.
422. Martí JM, Garcia-Diaz A, Delgado-Bellido D, et al. Selective modulation by PARP-1 of HIF-1 α -recruitment to chromatin during hypoxia is required for tumor adaptation to hypoxic conditions. *Redox Biol.* 2021;41:101885.
423. Victor N, Ivy A, Jiang BH, Agani FH. Involvement of HIF-1 in invasion of Mum2B uveal melanoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 2006;23(1):87-96.
424. Fernández-Cortés M, Delgado-Bellido D, Bermúdez-Jiménez E, et al. PARP inhibition promotes endothelial-like traits in melanoma cells and modulates pericyte coverage dynamics during vasculogenic mimicry. *J Pathol.* 2023;259(3):318-330.
425. Cañellas-Socias A, Cortina C, Hernando-Momblona X, et al. Metastatic recurrence in colorectal cancer arises from residual EMP1+ cells. *Nature.* 2022;611(7936):603-613.
426. Sun GG, Wang YD, Cui DW, Cheng YJ, Hu WN. Epithelial membrane protein 1 negatively regulates cell growth and metastasis in colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2014;20(14):4001-4010.
427. Koch M, Wiese M. Gene expression signatures of angiocidin and darapladib treatment connect to therapy options in cervical cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013;139(2):259-267.
428. Ashki N, Gordon L, Wadehra M. Review of the GAS3 family of proteins and their relevance to cancer. *Crit Rev Oncog.* 2015;20(5-6):435-447.
429. Hoefsmit EP, Rozeman EA, Van TM, et al. Comprehensive analysis of cutaneous and uveal melanoma liver metastases. *J Immunother Cancer.* 2020;8(2):e001501.
430. Tasdogan A, Faubert B, Ramesh V, et al. Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma metastatic potential. *Nature.* 2020;577(7788):115-120.
431. Marzagalli M, Ebelst ND, Manuel ER. Unraveling the crosstalk between melanoma and immune cells in the tumor microenvironment. *Semin Cancer Biol.* 2019;59:236-250.

-
432. Shannan B, Perego M, Somasundaram R, Herlyn M. Heterogeneity in Melanoma. *Cancer Treat Res.* 2016;167:1-15.
433. Beechem JM. High-Plex Spatially Resolved RNA and Protein Detection Using Digital Spatial Profiling: A Technology Designed for Immuno-oncology Biomarker Discovery and Translational Research. *Methods Mol Biol.* 2020;2055:563-583.
434. McCart Reed AE, Bennett J, Kutasovic JR, et al. Digital spatial profiling application in breast cancer: a user's perspective. *Virchows Arch.* 2020;477(6):885-890.
435. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2006-2017.
436. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373(1):23-34.
437. Ogino S, Galon J, Fuchs CS, Dranoff G. Cancer immunology analysis of host and tumor factors for personalized medicine. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011;8(12):711-719.
438. Giesen C, Wang HA, Schapiro D, et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods.* 2014;11(4):417-422.
439. Angelo M, Bendall SC, Finck R, et al. Multiplexed ion beam imaging of human breast tumors. *Nat Med.* 2014;20(4):436-442.

APÉNDICE A

Publicación

Natividad Martin-Morales, Miguel Padial-Molina, Isabel Tovar, Virginea De Araujo Farias, Pedro Hernández-Cortés, Esperanza Ramirez-Moreno, Mercedes Caba-Molina, Justin Davis, Alejandro Carrero Castaño, Jose Mariano Ruiz de Almodovar, Pablo Galindo-Moreno, Javier Oliver-Pozo, Francisco Javier O'Valle Ravassa; IMP3 Immunohistochemical Expression Is Related with Progression and Metastases in Xenografted and Cutaneous Melanomas. *Pathobiology* 2023; <https://doi.org/10.1159/000533916>

Pathobiology

Research Article

Pathobiology
DOI: 10.1159/000533916

Received: April 21, 2023
Accepted: August 19, 2023
Published online: October 5, 2023

IMP3 Immunohistochemical Expression Is Related with Progression and Metastases in Xenografted and Cutaneous Melanomas

Natividad Martín-Morales^{a,b} Miguel Padial-Molina^{b,c} Isabel Tovar^d
Virginea De Araujo Farias^e Pedro Hernandez-Cortes^{c,f}
Esperanza Ramirez-Moreno^g Mercedes Caba-Molina^{a,c,h} Justin G. Davisⁱ
Alejandro Carrero Castaño^h Jose Mariano Ruiz de Almodovar^e
Pablo Galindo-Moreno^{b,c} Javier Oliver-Pozo^j
Francisco Javier O'Valle Ravassa^{a,c,e}

^aDepartment of Pathology, University of Granada, Granada, Spain; ^bDepartment of Oral Surgery and Implant Dentistry, School of Dentistry, University of Granada, Granada, Spain; ^cBiosanitary Institute (Ibs.GRANADA), Granada, Spain; ^dDepartment of Oncology and Radiotherapy, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain; ^eInstitute of Biopathology and Medicine Regenerative (IBIMER, CIBM), University of Granada, Granada, Spain; ^fDepartment of Orthopedic Surgery, Clinic San Cecilio University Hospital, Granada, Spain; ^gDepartment of Ophthalmology, Hospital Universitario Virgen de la Victoria, Malaga, Spain; ^hIntercentre Provincial Pathological Anatomy Unit of the San Cecilio Clinical University Hospital, Granada, Spain; ⁱDepartment of Business Administration, Washington and Lee University, Lexington, VA, USA; ^jInstitute of Parasitology and Biomedicine López Neyra, CSIC, Granada, Spain

Keywords

Insulin-like growth factor-II messenger RNA-binding protein-3 · Melanoma · Mesenchymal stromal cells · Immunohistochemical · Radiotherapy

Abstract

Introduction: Insulin-like growth factor-II messenger RNA-binding protein-3 (IMP3) over-expression is a predictor of tumor recurrence and metastases in some types of human melanoma. Our objective was to evaluate the immunohistochemical expression of IMP3 and other molecules related to tumor prognosis in melanoma-xeno-tumors undergoing treatment. We test the effect of radiotherapy (RT) and mesenchymal stromal cells (MSCs) treatment, analyzing the

tumorigenic and metastasizing capacity in a mice melanoma xenograft model. **Materials and Methods:** We inoculated A375 and G361 human melanoma cell lines into NOD/SCID gamma mice ($n = 64$). We established a control group, a group treated with MSCs, a group treated with MSCs plus RT, and a group treated with RT. We assessed the immunohistochemical expression of IMP3, E-cadherin, N-cadherin, PARP1, HIF-1 α , and the proliferation marker Ki-67. Additionally, we performed a retrospective study including 114 histological samples of patients diagnosed with malignant cutaneous superficial spreading melanoma ($n = 104$) and nodular melanoma ($n = 10$) with at least 5 years of follow-up. **Results:** Most morphological and immunohistochemical features show statistically significant differences between the 2 cell lines. The A375 cell line induced the

karger@karger.com
www.karger.com/pat

© 2023 S. Karger AG, Basel

Correspondence to:
Francisco Javier O'Valle Ravassa, fovalle@ugr.es

Karger

Downloaded from http://karger.com/pathobiology/pdf/doi/10.1159/000533916 by University of Michigan user on 02 December 2023

Presentaciones a congresos

- Martín Morales, N. y col. “Sobreexpresión de la oncoproteína imp3 en neoplasias como biomarcador de mal pronóstico”. Ponencia. En: II Congreso Investigación PTS. Fundación PTS. Granada. Febrero 2022.
- Morata Tarifa, C. y col. “Non-clinical toxicology assays to demonstrate the safety of a cell medicinal product before first clinical use”. Póster. En: 2º Simposio de terapias avanzadas y tecnologías biomédicas. ibs.Granada. Diciembre 2021.
- Martín Morales, N. y col. “Test de bioseguridad para el empleo de células madre mesenquimales de cordón umbilical humano radiadas para el tratamiento de neoplasias”. Póster. En: I Simposio de terapias avanzadas y tecnologías biomédicas. ibs.Granada. Septiembre 2019.
- Martín Morales, N. y col. “Biodistribution study of irradiated umbilical cord mesenchymal stromal cells in a mouse model as a preliminary phase study of a new strategy in adjuvant colon cancer therapy”. Ponencia. En: I Congreso de Investigadores PTS. Fundación PTS. Granada. Febrero 2019.

- Ibáñez Aljarilla, A. y col. "Relationship between imp-3 immunohistochemical expression with progression and metastasis in xenografted melanomas treated with radiotherapy and mesenchymal stem cells". Ponencia. En: I Congreso de Investigadores PTS. Fundación PTS. Granada. Febrero 2019.



CERTIFICADO

Por su **PARTICIPACIÓN** en el
II CONGRESO INVESTIGACIÓN PTS

**Con la comunicación
en formato (Ponencia) titulada:**

**SOBREEXPRESIÓN DE LA ONCOPROTEÍNA IMP3 EN
NEOPLASIAS COMO BIOMARCADOR DE MAL PRONÓSTICO.**

Autores:
MARTIN-MORALES N., RAMÍREZ C., RAMÍREZ-MORENO E.,
CABA-MOLINA M., PADIAL MOLINA M., TOVAR I., DAVIS J
G., PADIAL MOLINA M., TOVAR I., RUIZ DE ALMODOVAR J.,
GALINDO MORENO P., OLIVER FJ., VALLE F.,

**ACTIVIDAD RECONOCIDA
EXPEDIENTE
35/22**

FECHA 9 al 11 / febrero / 2022

ANA AGUDO MARTÍNEZ
Gerente Fundación PTS

Ana Agudo

Interés científico-sanitario por la
Junta de Andalucía



II SIMPOSIO DE
**TERAPIAS AVANZADAS
TECNOLOGÍAS BIOMÉDICAS**

El Comité Organizador del

**2º SIMPOSIO DE TERAPIAS AVANZADAS Y
TECNOLOGÍAS BIOMÉDICAS**
2nd SYMPOSIUM ON ADVANCED THERAPIES AND BIOMEDICAL
TECHNOLOGIES

CERTIFICA que la Comunicación en PÓSTER:

***NON-CLINICAL TOXICOLOGY ASSAYS TO DEMONSTRATE THE SAFETY OF A
CELL MEDICINAL PRODUCT BEFORE FIRST CLINICAL USE***

de la que son Autores:

Cynthia Morata Tarifa, Cristina Antúnez Rodríguez, Natividad Martín Morales, Francisco O'Valle, Rosario Sánchez Pernaute

Ha sido **presentada** en este Simposio celebrado en Granada el día 17 de diciembre de 2021
Y para que conste, se expide y firma el presente certificado en
Granada, a 20 de diciembre de 2021

María del Mar Pérez Gómez
Coordinadora de la actividad

María José Sánchez Pérez
Directora Científica del ibs.GRANADA

Miguel Alaminos Mingorance
Coordinadora de la actividad





I SIMPOSIO DE
TERAPIAS AVANZADAS  **TECNOLOGÍAS**
 BIO SANITARIAS

El Comité Organizador del

**1^{ER} SIMPOSIO DE TERAPIAS AVANZADAS Y
 TECNOLOGÍAS BIOMÉDICAS**
 1ST SYMPOSIUM ON ADVANCED THERAPIES AND BIOMEDICAL

CERTIFICA que la Comunicación en PÓSTER:

**TEST DE BIOSEGURIDAD PARA EL EMPLEO DE CÉLULAS MADRE
 MESENQUIMALES DE CORDÓN UMBILICAL HUMANO RADIADAS PARA EL
 TRATAMIENTO DE NEOPLASIAS**

de la que son Autores:

**Martín-Morales N, de Araujo Farias V, Morata-Tarifa C, Antúnez C, Segovia C, Gonzalez L, Garcia-Gemar G,
 Lopez-Navas L, Arribas-Arribas B, Tovar I, Expósito J, Ruiz de Almodovar JM, O'Valle F, Sanchez-Pernaute R**

Ha sido **presentada** en este Simposio celebrado en Granada el día 10 de Septiembre de 2019

Y para que conste, se expide y firma el presente certificado en

Granada, a 10 de Septiembre de 2019

Cristina L
Hospital I

Jardón
Cecilio

Miguel
Univ

J. Antonio López Escámez
Director del ibs.GRANADA



I Congreso de Investigadores del PTS. Granada 13-15 Feb. 2019

**BIODISTRIBUTION STUDY OF
IRRADIATED UMBILICAL CORD
MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN A
MOUSE MODEL AS A PRELIMINARY
PHASE STUDY OF A NEW STRATEGY IN
ADYUVANT COLON CANCER THERAPY.**

**Natividad Martín-Morales^{1,4}, Isabel Tovar⁷, Miguel Padial
Molina^{2,4}, Raquel Sainz-Urruela², Antonio Ibañez Aljarilla^{1,2},
Mariano Aguilar Peña¹, Virginea de Araújo Farias², Cynthia
Morata tarifa⁶, Rosario Sánchez Pernaute⁶, Cristina Antúnez⁹,
Mariano Ruiz de Almodovar², Javier Oliver Pozo⁸, F. O'Valle
Ravassa^{1,2,3}.**

¹Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Granada

²IBIMER, CIBM.

³Ibs.GRANADA

⁴Departamento de Cirugía Oral, Facultad de Odontología, Granada

⁵Servicio de Ortopedia y Traumatología HUSC, Departamento de Cirugía y sus
Especialidades, Facultad de Medicina, Granada

⁶Iniciativa Andaluza en Terapias Avanzadas, Sevilla

⁷Servicio de Oncología y Radioterapia HUVN, Granada

⁸Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra

⁹Red andaluza de instalaciones GMP, Málaga y Sevilla, España.

Correspondencia: nati@ugr.es

Modalidad: Póster

ONCOLOGÍA

71

I Congreso de Investigadores del PTS. Granada 13-15 Feb. 2019

**RELATIONSHIP BETWEEN IMP-3
IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION
WITH PROGRESSION AND METASTASIS IN
XENOGRAFTED MELANOMAS TREATED
WITH RADIOTHERAPY AND
MESENCHYMAL STEM CELLS.**

**Ibáñez Aljarilla A (1,2), Martín-Morales N(1,4), Padial Molina
M (2,4), Sainz-Urruela R (2), Aguilar Peña M (2), Abril D (4),
de Araujo Farias V (3), Hernández Cortés P (5), Galindo
Moreno P (4), O'Valle Ravassa F (1,2,3).**

(1) Departamento de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina (2) IBIMER,
CIBM. (3) Ibs.GRANADA (4) Departamento de Cirugía Oral, Facultad de
Odontología (5) Servicio de Ortopedia y Traumatología HUSC, Departamento
de Cirugía y sus Especialidades, Facultad de Medicina.

Correspondencia: antonibanez93@gmail.com

Modalidad: Póster