

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la mutación del promotor del gen TERT en
tumores sebáceos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Teresa Muñoz Jiménez

Directores

José Luis Rodríguez Peralto
Yolanda Ruano Domínguez
María Concepción Garrido Ruiz

Madrid

© María Teresa Muñoz Jiménez, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA MUTACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN TERT
EN TUMORES SEBÁCEOS**

María Teresa Muñoz Jiménez

Directores

José Luis Rodríguez Peralto

Yolanda Ruano Domínguez

María Concepción Garrido Ruiz

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. María Teresa Muñoz Jiménez

estudiante en el Programa de Doctorado Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas,
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

ESTUDIO DE LA MUTACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN TERT EN TUMORES
SEBÁCEOS

y dirigida por: Dr. José Luis Rodríguez Peralto, Dra. Yolanda Ruano Domínguez y
Dra. María Concepción Garrido Ruiz

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 8 de mayo de 2019

Fdo.: María Teresa Muñoz Jiménez

A Gumer y Pili

A Manu

A Alejandro

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, el Dr. José Luis Rodríguez Peralto, la Dra. Yolanda Ruano Domínguez y la Dra. María Concepción Garrido Ruiz, por su inestimable ayuda durante la realización de este trabajo.

A los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal, Fundación Jiménez Díaz y Hospital de Salamanca y al Centro de Dermatopatología Friedichshafen, por su colaboración.

A los compañeros del Laboratorio de Biología Molecular y de la Sección de Inmunohistoquímica del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre, cuya participación ha sido fundamental para la elaboración de la tesis.

A la Unidad de Investigación y Soporte Científico del Instituto i+12 del Hospital 12 de Octubre, por facilitarme el análisis estadístico.

A mis compañeros del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre, por su apoyo durante todos estos años.

Especialmente, quiero agradecer a mi familia su cariño y apoyo incondicional. A mis padres, Gumer y Pili, verdaderos merecedores de este libro, por su esfuerzo y sacrificio a lo largo de su vida. Gracias por vuestro amor y confianza en mí.

A mi hermano, Manu, por su complicidad y sus consejos. Gracias por estar siempre ahí, en los en momentos buenos y no tan buenos.

A Alejandro, por su inagotable optimismo y buen humor. Gracias por hacer que cada día sea especial.

A Pepe y Noelia, por su acogida y afecto. Gracias por ser ejemplo del valor de la enseñanza.

ÍNDICE

Índice de figuras	xi
Índice de tablas	xiii
Abreviaturas	xv
Resumen	1
Summary	7
I. INTRODUCCIÓN	11
1. LA GLÁNDULA SEBÁCEA NORMAL	11
2. PERSPECTIVA HISTÓRICA Y CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DE LA GLÁNDULA SEBÁCEA	14
3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LAS NEOPLASIAS SEBÁCEAS	16
3.1. Adenoma sebáceo	16
3.2. Sebaceoma	18
3.3. Carcinoma sebáceo	20
4. CRITERIOS DE DIFERENCIACIÓN SEBÁCEA	25
5. ALTERACIONES MOLECULARES DE LOS TUMORES SEBÁCEOS	28
5.1. Tumores sebáceos cutáneos en el síndrome de Muir-Torre	28
5.2. Otras alteraciones moleculares	32
6. PROMOTOR DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA DE LA TELOMERASA	35
6.1. Telómeros y telomerasa	35
6.2. Telomerasa y <i>TERT</i>	36
6.3. Promotor de <i>TERT</i> y cáncer	38
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
1. HIPÓTESIS	41
2. OBJETIVOS	41
III. MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. SELECCIÓN DE CASOS	43
2. MUESTRAS TISULARES	43
3. VARIABLES A ESTUDIO	43
3.1. Variables clínicas	43
3.2. Variables histopatológicas	44
4. INMUNOHISTOQUÍMICA	44

5. TÉCNICAS MOLECULARES	45
5.1. Extracción de ADN	45
5.2. Pirosecuenciación	46
5.3. Secuenciación Sanger	46
5.4. Secuenciación masiva o <i>Next Generation Sequencing</i> (NGS)	47
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
IV. RESULTADOS	49
1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON NEOPLASIAS SEBÁCEAS	49
1.1. Sexo	49
1.2. Edad	50
1.3. Localización	50
1.4. Inmunosupresión	51
1.5. Neoplasias viscerales	51
1.6. Recidiva, metástasis y supervivencia	52
2. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LAS NEOPLASIAS SEBÁCEAS	53
2.1. Adenomas sebáceos	53
2.2. Sebaceomas	53
2.3. Carcinomas sebáceos	54
3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE PROTEÍNAS REPARADORAS DE APAREAMIENTOS INCORRECTOS DEL ADN	58
4. MUTACIÓN DEL PROMOTOR DE <i>TERT</i> EN NEOPLASIAS SEBÁCEAS	59
4.1. Mutación del promotor de <i>TERT</i> en neoplasias sebáceas benignas y malignas	59
4.2. Técnicas de secuenciación	60
4.3. Mutación del promotor de <i>TERT</i> en carcinomas sebáceos	61
4.4. Características clínicas de los pacientes con carcinomas sebáceos mutados y no mutados	64
4.5. Expresión inmunohistoquímica de proteínas reparadoras de apareamientos incorrectos del ADN en los carcinomas sebáceos mutados y no mutados	65
4.6. Características histopatológicas de los carcinomas sebáceos mutados y no mutados	65
4.7. Mutación del promotor de <i>TERT</i> y estadio TNM	68
4.8. Presencia de otras mutaciones en carcinomas sebáceos	69

V. DISCUSIÓN	73
1. CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE DE NEOPLASIAS SEBÁCEAS	73
2. MUTACIÓN DEL PROMOTOR DE <i>TERT</i> EN NEOPLASIAS SEBÁCEAS	74
3. MUTACIÓN DEL PROMOTOR DE <i>TERT</i> EN CARCINOMAS SEBÁCEOS	75
4. DIFERENCIAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS ENTRE CARCINOMAS SEBÁCEOS MUTADOS Y NO MUTADOS	78
5. OTRAS MUTACIONES DETECTADAS EN CARCINOMAS SEBÁCEOS	81
VI. CONCLUSIONES	85
VII. BIBLIOGRAFÍA	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1	Glándula sebácea	12
Figura I.2	Adenoma sebáceo	17
Figura I.3	Sebaceoma	19
Figura I.4	Carcinoma sebáceo	21
Figura I.5	Sebocitos en distinto grado de maduración y células germinativas	26
Figura I.6	Expresión inmunohistoquímica de las proteínas MMR en un adenoma sebáceo	31
Figura I.7	Elementos reguladores del promotor de <i>TERT</i>	37
Figura. IV.1	Distribución de los adenomas sebáceos, sebaceomas y carcinomas sebáceos por sexo	49
Figura IV.2	Frecuencia de las neoplasias viscerales	52
Figura IV.3	Adenoma sebáceo	53
Figura IV.4	Sebaceoma	54
Figura IV.5	Carcinoma sebáceo	55
Figura IV.6	Patrón de crecimiento en carcinomas sebáceos	55
Figura IV.7	Elastosis solar	56
Figura IV.8	Extensión pagetoide	56
Figura IV.9	Invasión vascular	57
Figura IV.10	Expresión de proteínas MMR en el estudio inmunohistoquímico	58
Figura IV.11	Frecuencia de la mutación en el promotor de <i>TERT</i> en neoplasias sebáceas	60
Figura IV.12	Frecuencia de detección de la mutación por las tres técnicas moleculares	60
Figura IV.13	Frecuencias por tipo de mutación	61
Figura IV.14	Mutación C228T	62
Figura IV.15	Mutación C250T	62
Figura IV.16	Mutación C242T	63
Figura IV.17	Mutación CC242_243TT	63
Figura IV.18	Tamaño en carcinomas sebáceos mutados y no mutados	66
Figura IV.19	Grado de diferenciación en carcinomas sebáceos mutados y no mutados	66
Figura IV.20	Patrón de crecimiento en carcinomas sebáceos mutados y no mutados	67

Figura IV.21	Elastosis solar en carcinomas sebáceos mutados y no mutados	68
Figura IV.22	Extensión pagetoide en carcinomas sebáceos mutados y no mutados	68
Figura IV.23	Frecuencia de mutación de los genes estudiados por NGS en carcinomas sebáceos	71
Figura IV.24	Frecuencia de mutación de los genes estudiados por NGS en carcinomas sebáceos perioculares y extraoculares	71
Figura IV.25	Frecuencia de mutación de los genes estudiados por NGS en los carcinomas sebáceos que conservan las proteínas MMR y los que no las expresan.	72
Figura V.1	Frecuencia de mutaciones en el promotor de <i>TERT</i> en tumores cutáneos	77
Figura V.2	Frecuencia de las mutaciones C228T y C250T en tumores cutáneos	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.1	Clasificación TNM para el carcinoma cutáneo de la piel del párpado	23
Tabla I.2	Clasificación TNM para el carcinoma cutáneo de cabeza y cuello (excluye el párpado)	23
Tabla I.3	Clasificación TNM para el carcinoma cutáneo (excluye párpado, cabeza y cuello, perianal, vulva y pene)	24
Tabla III.1	Características de los anticuerpos empleados en el estudio inmunohistoquímico	45
Tabla IV.1	Distribución de las neoplasias sebáceas benignas y malignas por sexo	49
Tabla IV.2	Edad en el momento del diagnóstico	50
Tabla IV.3	Localización de las neoplasias sebáceas	50
Tabla IV.4	Localización desglosada de las neoplasias sebáceas	51
Tabla IV.5	Neoplasias viscerales	51
Tabla IV.6	Clasificación TNM de los carcinomas sebáceos de la serie	57
Tabla IV.7	Localización de las neoplasias con pérdida de proteínas MMR	58
Tabla IV.8	Distribución de los carcinomas sebáceos según el estudio inmunohistoquímico	59
Tabla IV.9	Patrones de pérdida de tinción de proteínas MMR	59
Tabla IV.10	Frecuencia de detección de las distintas mutaciones por las tres técnicas moleculares	61
Tabla IV.11	Características clínicas de los pacientes con carcinomas sebáceos mutados y no mutados	64
Tabla IV.12	Expresión de proteínas MMR en carcinomas sebáceos mutados y no mutados	65
Tabla IV.13	Características histopatológicas de los carcinomas sebáceos mutados y no mutados	65
Tabla IV.14	Estadio TNM de los carcinomas sebáceos perioculares	69
Tabla IV.15	Estadio TNM de los carcinomas sebáceos extraoculares de cabeza y cuello	69
Tabla IV.16	Estadio TNM de los carcinomas sebáceos de otra localización	69
Tabla IV.17	Mutaciones detectadas por NGS en los carcinomas sebáceos de nuestra serie	70

ABREVIATURAS

ABHD5	<i>Abhydrolase Domain-Containing 5</i>
ABL1	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ABL2	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene 2</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 AKT8 virus oncogene cellular homolog</i>
ALK	Quinasa del linfoma anaplásico
ALT	Alargamiento alternativo de los telómeros
AP-1	Proteína activadora-1
AP-2	Proteína activadora-2
AP-4	Proteína activadora-4
ARID2	<i>AT-rich interactive domain-containing protein 2</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAT25	<i>Big Adenine Tract 25</i>
BAT26	<i>Big Adenine Tract 26</i>
BRAF	<i>v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
BTK	Tirosina quinasa de Bruton
CD15	<i>Cluster of differentiation 15</i>
CDKN2A	Inhibidor de la quinasa dependiente de la ciclina 2A
CHEK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
c-Myc	<i>Avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog</i>
CpG	Pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos
E2F	<i>Transcription factor family including E2F- and DP-like subunits</i>
E-box	<i>Enhancer box</i>
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMA	Antígeno de membrana epitelial
ERBB2	<i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
ER	Receptor de estrógenos
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
ETS	<i>E-twenty-six</i>

FANCA	<i>Fanconi anaemia, complementation group A</i>
FGFR2	Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR3	Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos
GATA3	<i>GATA-binding protein 3 to DNA sequence [A/T]GATA[A/G]</i>
GAR1	<i>Nucleolar protein family A, member 1</i>
GIST	Tumor del estroma gastrointestinal
HE	Hematoxilina-eosina
HER2	Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2
HF-1	Factor 1 inducible por hipoxia
HRAS	<i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IHQ	Inmunohistoquímica
JAK/STAT	Quinasas Jano/Transductor de señales y activadores de transcripción
kb	kilobase
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LEF-1	<i>Lymphoid Enhancer Binding Factor 1</i>
Lrig1	<i>Leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1</i>
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MET	Gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento hepatocitario
MLH1	<i>Mutator L Homologue 1</i>
MLL3	Histona-lisina N-metiltransferasa
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MSH2	<i>Mutator S Homologue 2</i>
MSH6	<i>Mutator S Homologue 6</i>
mTOR	Diana de rapamicina en mamíferos
MYH	<i>MutY homolog</i>
MZF-2	<i>Myeloid zinc finger protein 2</i>
NF1	Factor nuclear de transcripción 1
NFκB	Factor nuclear kappa B
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NHP2	<i>Nucleolar protein family A, member 2</i>
NOP10	<i>Nucleolar protein family A, member 3</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

PDGFRB	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas beta
PGRMC1	Componente 1 del receptor de progesterona
PIK3CA	Subunidad catalítica fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-kinasa
PMS2	<i>Postmeiotic Segregation Increased 2</i>
POT1	Protección de telómeros 1
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina
pTERT	Promotor del gen transcriptasa reversa de la telomerasa
RAF	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
Rap1	Proteína represora/activadora 1
RAS	<i>Retrovirus associated sequences</i>
RB1	Retinoblastoma
Smad3	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 3</i>
SMARCB1	<i>SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily B member 1</i>
SMARCA4	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 4</i>
SMT	Síndrome de Muir-Torre
Sp1	Proteína de especificidad 1
STAT3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
SQS	Escualeno sintetasa
TCF	Factor del complejo ternario
TERC	Componente telomérico de ARN
TERT	Transcriptasa reversa de la telomerasa
TET2	<i>Tet methylcytosine dioxygenase 2</i>
TGF β	Factor de crecimiento transformante beta
TIN2	<i>TERF1 and TERF2 interacting nuclear factor 2</i>
TIP47	<i>Tail-interacting protein of 47kD</i>
TNM	<i>Tumor, nodes, metastasis</i>
TP53	Proteína tumoral 53
TPP1	Tripeptidil peptidasa 1
TRF1	Factor de unión a repeticiones teloméricas 1
TRF2	Factor de unión a repeticiones teloméricas 2
TSC	<i>Tuberous Sclerosis Complex</i>
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Wnt	Vía de señalización Wingless

WRN	<i>Werner syndrome ATP-dependent helicase</i>
WT1	Proteína del tumor de Wilms

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

Las neoplasias sebáceas son tumores cutáneos anexiales que aparecen predominantemente en áreas de la cabeza y el cuello de pacientes mayores. El adenoma sebáceo y el sebaceoma son neoplasias benignas que no recidivan tras su extirpación completa. El carcinoma sebáceo, por el contrario, puede presentar un comportamiento agresivo, con tasas de recidiva del 4-28%, de metástasis ganglionar del 1,3-12% y a distancia del 2-10%. Su mortalidad ha disminuido en los últimos años gracias a un diagnóstico y tratamiento más precoces, situándose en el 3-6,7%.

Se conocen poco las alteraciones moleculares de las neoplasias sebáceas. Se pueden asociar al síndrome de Muir-Torre, una variante del síndrome de cáncer colorrectal hereditario no polipósico o síndrome de Lynch. En este caso, los pacientes, además de tumores sebáceos, pueden desarrollar neoplasias viscerales, siendo la más frecuente el carcinoma colorrectal.

La mutación del promotor de *TERT* se ha detectado en un elevado porcentaje de neoplasias y se ha asociado a diferentes variables clínico-histológicas, pero hasta la fecha esta mutación no se ha identificado en tumores sebáceos.

OBJETIVOS

Nuestro estudio pretende determinar si existen mutaciones en el promotor de *TERT* en neoplasias sebáceas y si es útil para establecer el diagnóstico de malignidad, de forma que pueda constituir un criterio diagnóstico adicional a los criterios morfológicos. Además, queremos valorar si la presencia de la mutación se correlaciona con la clínica de los pacientes y las características histológicas de los tumores. Por otra parte, en los carcinomas sebáceos se estudiará también la presencia de otras mutaciones para profundizar en el conocimiento de sus alteraciones genéticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se reunieron un total de 91 neoplasias sebáceas (17 adenomas sebáceos, 45 sebaceomas y 29 carcinomas sebáceos) diagnosticadas entre los años 2006 y 2016. Las muestras procedían de los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre, del Hospital Universitario Ramón y Cajal, de la Fundación Jiménez Díaz, del Hospital Universitario de Salamanca (IBSAL) y del Centro de Dermatopatología Friedichshafen (Alemania).

Tras la extracción del ADN de las muestras seleccionadas, se realizó la secuenciación del promotor de *TERT* mediante pirosecuenciación, secuenciación Sanger y secuenciación masiva. También se realizaron técnicas inmunohistoquímicas para evaluar la expresión de proteínas reparadoras de apareamientos incorrectos del ADN o proteínas MMR.

RESULTADOS

En nuestra serie de pacientes, las lesiones benignas son más frecuentes en hombres, 60%, siendo la edad media en el momento del diagnóstico de 71 años. Los carcinomas sebáceos son más frecuentes en mujeres, 60,9%, y la edad media en el momento del diagnóstico es de 75 años. En conjunto, las lesiones se localizan preferentemente en el área de cabeza y cuello, donde suponen el 90,9% de las mismas. Tres pacientes con tumores benignos estaban inmunosuprimidos (dos trasplantados renales y un paciente VIH). El 29,6% de los pacientes desarrollaron neoplasias viscerales, siendo la más frecuente el adenocarcinoma colorrectal. Un paciente con un sebaceoma presentó recidiva local de la lesión. Respecto a los pacientes con carcinoma sebáceo, ninguno desarrolló metástasis en ganglios linfáticos ni a distancia y sólo un paciente sufrió recidiva local del tumor. Cinco pacientes con carcinoma fallecieron, pero ninguna muerte estuvo relacionada con el tumor. En cuanto a los factores asociados a mal pronóstico, el 37,9% de los carcinomas tiene un tamaño superior a 10 mm, el 27,6% presenta extensión pagetoide y en un 3,4% se detectó invasión vascular. Ninguno de los pacientes con estos tumores presentó peor evolución clínica. En el conjunto de la serie, el 30,8% de los tumores no tiene expresión nuclear de proteínas MMR en el estudio inmunohistoquímico y la mayoría de estas lesiones (68,8%) se sitúa en áreas extraoculares de cabeza y cuello. El patrón de pérdida más frecuente de nuestra serie es MSH2/MSH6. Dos pacientes estaban diagnosticados de síndrome de Muir-Torre y desarrollaron un adenocarcinoma colorrectal cada uno.

En el estudio de secuenciación se encontraron mutaciones en el promotor de *TERT* en el 27,6% de los carcinomas, mientras que en el grupo de los tumores sebáceos benignos no se detectó ninguna. Las mutaciones más frecuentes fueron C228T y C250T (37,5% cada una). En el análisis mediante NGS realizado en los 29 carcinomas sebáceos se identificaron un total de 40 mutaciones somáticas que afectaban a 8 de los 14 genes estudiados (TP53, promotor de *TERT*, EGFR, ATRX, PDGFRA, CDKN2A, PTEN y ACVR1). No se observaron diferencias al comparar los carcinomas según su localización en cuanto a mutaciones totales, mediana de mutaciones por lesión y frecuencia en los genes mutados. Al comparar los carcinomas

con proteínas MMR conservadas en el estudio inmunohistoquímico con el grupo con pérdida de expresión, se vieron diferencias significativas en el número de mutaciones totales, que fueron mayores en el grupo de proteínas conservadas, y en la frecuencia de mutación en el gen TP53, que estaba más frecuentemente mutado en este grupo.

DISCUSIÓN

En nuestro estudio hemos detectado mutaciones en el promotor de *TERT* en los carcinomas sebáceos en el 27,6% de los casos. Las mutaciones más frecuentes fueron la C228T y la C250T, ambas con igual frecuencia (37,5%). Estos resultados son similares a los obtenidos en otro tipo de neoplasias cutáneas, en las que, en general, ambas mutaciones tienen una frecuencia similar o la C250T supera a la C228T. Otras mutaciones detectadas con menor frecuencia fueron la C242T, en un 12,5% de los casos y la CC242_243TT, en un 12,5%. Las tres técnicas de secuenciación empleadas no mostraron diferencias en cuanto a la detección de la mutación y el grado de acuerdo de las tres para las diferentes mutaciones fue casi perfecto (índice kappa de Fleiss de 0,9).

En el grupo de tumores benignos (adenomas sebáceos y sebaceomas) no se detectó ninguna mutación, lo que está en consonancia con lo descrito en la literatura, ya que las mutaciones en el promotor de *TERT* están ausentes o son infrecuentes en neoplasias benignas. Encontramos que la diferencia fue estadísticamente significativa entre los sebaceomas y los carcinomas sebáceos, por lo que la presencia de la mutación podría ayudar a establecer el diagnóstico diferencial entre ambos tumores.

Respecto a las variables clínicas, los pacientes con carcinomas con mutaciones del promotor de *TERT* tenían una edad media en el momento del diagnóstico superior a la de los pacientes del grupo no mutado, eran más frecuentes en mujeres (66,7%) y se localizaban predominantemente en áreas extraoculares de cabeza y cuello (66,7%). No se detectaron recidivas en los pacientes con carcinoma mutado y la frecuencia de neoplasias viscerales fue ligeramente inferior (20%) que en los pacientes con carcinoma no mutado (28,6%). La pérdida de expresión de proteínas MMR en el estudio inmunohistoquímico fue menor en los carcinomas mutados (12,5%) que en los carcinomas no mutados (31,6%). En cuanto a las características histológicas, hemos observado que los carcinomas mutados presentan con mayor frecuencia factores de mal pronóstico (tamaño tumoral mayor de 10 mm, extensión pagetoide e invasión vascular). Cabe destacar que, de manera estadísticamente significativa, los carcinomas mutados muestran con más frecuencia un patrón de crecimiento invasivo que los no mutados. Por otro lado, hemos observado que la elastosis solar en los carcinomas mutados es más frecuente (62,5%) que en los no

mutados (23,8%). Aunque esta diferencia no alcanza la significación estadística, su presencia, junto con las transiciones C>T y CC>TT en las mutaciones, características de etiología por luz UV, hace suponer que este agente participa en el desarrollo de estas neoplasias. Por último, no encontramos asociación entre la mutación del promotor de *TERT* y estadios patológicos TNM más altos en los tumores estudiados.

En el análisis mediante secuenciación masiva se detectaron mutaciones en el 69% de los carcinomas y se identificó un total de 40 mutaciones somáticas que afectaban a 8 de los 14 genes estudiados. El gen más frecuentemente mutado fue TP53 en un 55,2% de casos, seguido de la mutación en el promotor de *TERT*, en un 24,1% de casos. Con menos frecuencia se detectaron mutaciones en EGFR, ATRX, PDGFRA, CDKN2A, PTEN y ACVR1, de éstos, todos, excepto ATRX, se consideran genes susceptibles de tratamiento. Al comparar los carcinomas con proteínas MMR conservadas por inmunohistoquímica con los que no expresaban alguna de ellas, se observaba que los primeros mostraban, de forma significativa, más mutaciones totales y una frecuencia de mutación en el gen TP53 mayor. Cabría esperar que los carcinomas con proteínas alteradas, al tener mayor probabilidad de alteraciones en los estudios moleculares, tuviesen más mutaciones que el grupo con proteínas conservadas. Este resultado podría explicarse por las diferencias en el tamaño muestral (20 carcinomas con proteínas conservadas y 7 carcinomas con proteínas alteradas). Por otro lado, la mayor frecuencia de mutaciones en TP53 en el grupo de proteínas conservadas (70%) frente al de proteínas alteradas (14,3%) sugiere una mayor participación de las vías relacionadas con TP53 en el desarrollo de los primeros.

CONCLUSIONES

1.- La mutación del promotor de *TERT* se ha detectado en el 27,6% de los carcinomas sebáceos de nuestra serie. La mutación no se ha identificado en tumores sebáceos benignos.

2.- La diferencia en la mutación del promotor de *TERT* entre carcinomas sebáceos y sebaceomas ha resultado significativa, por lo que su presencia apoyaría un diagnóstico de malignidad.

3.- El perfil histopatológico de los carcinomas sebáceos mutados se caracteriza, de manera significativa, por una mayor frecuencia de patrón de crecimiento invasivo, respecto a los carcinomas no mutados.

4.- Se han detectado mutaciones en otros genes en los carcinomas sebáceos. El gen más frecuentemente mutado fue TP53, seguido del promotor de *TERT*. Otros genes afectados con menor frecuencia han sido EGFR, ATRX, PDGFRA, CDKN2A,

PTEN y ACVR1. Los carcinomas sebáceos que conservan la expresión nuclear de proteínas MMR en el estudio inmunohistoquímico han mostrado, de forma significativa, un mayor porcentaje de mutaciones en el gen TP53, respecto a los carcinomas sebáceos con proteínas alteradas.

SUMMARY

INTRODUCTION

Sebaceous neoplasms are adnexal skin tumors predominantly located in head and neck areas of elderly patients. Sebaceous adenoma and sebaceoma are benign neoplasms that do not recur after complete excision. Sebaceous carcinoma may behave aggressively, with rates of recurrence, nodal metastases and distant metastases of 4-28%, 1.3-12% and 2-10%, respectively. Cancer-specific mortality has much lower rates in recent years, between 3% and 6.7%, thanks to earlier diagnosis and treatment.

Little is known about molecular alterations of sebaceous neoplasms. They may be related to Muir-Torre syndrome, a subset of the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome or Lynch syndrome. In addition to sebaceous tumors, these patients may develop visceral neoplasms, being colorectal carcinoma the most frequent.

TERT promoter mutation widely occurs in human neoplasms and they have been related to different clinicopathological features. To date this mutation has not been identified in sebaceous tumors.

OBJETIVES

This project aims to determine the presence of *TERT* promoter mutations in sebaceous neoplasms and its usefulness in establishing a diagnosis of malignancy, so that it can become an additional diagnostic tool besides morphological criteria. In addition, we intend to assess whether this mutation correlates with clinicopathological features of the tumors. Furthermore, by studying the presence of other mutations, we expect to deep in the understanding of genetic alterations of sebaceous carcinomas.

MATERIALS AND METHODS

A total of 91 sebaceous neoplasms (17 sebaceous adenomas, 45 sebaceomas and 29 sebaceous carcinomas) diagnosed between 2006 and 2016 were collected. All samples came from Departments of Pathology, Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Fundacion Jiménez Díaz, Hospital Universitario de Salamanca (IBSAL) and Dermatopathology Center Friedichshafen (Germany).

After DNA extraction, *TERT* promoter was analyzed by pyrosequencing, Sanger sequencing and next generation sequencing (NGS). In addition, expression of mismatch repair proteins were assessed by immunohistochemical techniques.

RESULTS

In our series, benign lesions are more frequent in men, 60%, with a mean age of 71 years at diagnosis. Sebaceous carcinomas are more common in women, 60.9%, and the mean age is 75 years. Overall, the most common location is the head and neck area, where they account for 90.9%. Three patients with benign tumors were immunosuppressed (two renal transplant patients and one HIV patient). 29.6% of the patients developed visceral neoplasms, the most frequent being colorectal adenocarcinoma. A patient with a sebaceoma presented a recurrence. No patient with sebaceous carcinoma had nodal or distant metastases and only one suffered from local tumor recurrence. Five patients with carcinoma died, but deaths were not carcinoma-related. Regarding factors predictive of poor prognosis, size greater than 10 mm, pagetoid extensión and vascular invasión were observed in 37.9%, 27.6% and 3.4% of carcinomas, respectively. None of these patients presented poor clinical evolution. Loss of MMR protein expression by immunohistochemistry was detected in 30.8% of cases and most of these lesions (68.8%) were located in extraocular areas of head and neck. The most frequent loss pattern was MSH2/MSH6. Two patients were diagnosed with Muir-Torre syndrome, and each one developed a colorectal adenocarcinoma.

In the sebaceous carcinoma group, 27.6% were found to have *TERT* promoter mutations by sequencing techniques, while benign sebaceous tumors showed none. The most frequent mutations were C228T and C250T (37.5% each). We identified 40 somatic mutations in the carcinoma group by NGS. They were found in 8 of the 14 genes analyzed (*TP53*, *TERT* promoter, *EGFR*, *ATRX*, *PDGFRA*, *CDKN2A*, *PTEN* and *ACVR1*). No differences were observed in the total number of mutations, median mutations per lesion and frequency of mutated genes between periocular and extraocular carcinomas. Total mutations and *TP53* mutations were significantly higher in carcinomas with MMR protein expression by immunohistochemistry than in those with negative staining.

DISCUSSION

In the present study, *TERT* promoter mutations were detected in 27.6% of sebaceous carcinomas, being C228T and C250T the most frequent (37.5% each). These results are quite similar to those obtained in other cutaneous neoplasms, in which both mutations have similar frequencies or C250T exceeds C228T. Other mutations detected were C242T (12.5%) and CC242_243TT (12.5%). The sequencing techniques employed show no differences in detecting the mutation. The agreement

among the methods for the different mutations was almost perfect (Fleiss kappa index of 0.9).

In the group of benign tumors no mutation was detected. This is consistent with the literature, since *TERT* promoter mutations are absent or rarely found in benign neoplasms. The difference was statistically significant between sebaceomas and sebaceous carcinomas, so the mutation may help to set the differential diagnosis between both tumors.

Regarding clinical features, patients with *TERT* promoter mutations had a higher mean age at diagnosis than the wild-type group, were more frequent in women (66.7%) and were preferentially located in extraocular areas of head and neck (66.7%). No recurrence was detected in patients with mutated carcinoma and development of visceral neoplasms was slightly lower (20%) than in the non-mutated group (28.6%). Loss of expression of MMR proteins by immunohistochemistry was lower in mutated carcinomas (12.5%) than in wild-type carcinomas (31.6%). Features predictive of poor prognosis (tumor size greater than 10 mm, pagetoid extension and vascular invasion) were more common in mutated carcinomas. Significantly, invasive growth pattern was found more frequently in mutated tumors than in non-mutated ones. Solar elastosis was seen more often in mutated carcinomas (62.5%) than in wild-type tumors (23.8%). Although this difference does not reach statistical significance, its presence along with UV-signature mutations (C>T and CC>TT transitions), suggest that this agent has a crucial role in the development of these neoplasms. Finally, no association was found between *TERT* promoter mutations and advanced TNM stages.

By NGS we detected mutations in 69% of the carcinomas. A total of 40 somatic mutations were identified. They were found in 8 of the 14 genes analyzed. The most frequently encountered mutations occurred in TP53 (55.2%), followed by promoter of *TERT* (24.1%). Less often, mutations were detected in EGFR, ATRX, PDGFRA, CDKN2A, PTEN and ACVR1. All of them, except ATRX, are potentially clinically actionable genes. Carcinomas which express MMR proteins had significantly more total mutations and greater TP53 mutations than those that lost any protein. However the latter was expected to have more mutations due to its greater likelihood of molecular alterations. Differences in sample size may explain this result (20 tumors with normal proteins and 7 with altered proteins). In addition, the higher frequency of TP53 mutations in the group with normal proteins (70%) compared to the group of altered proteins (14.3%) suggests that TP53-dependent pathways are more frequently related to the development of the former.

CONCLUSIONS

1.- Promoter *TERT* mutation has been detected in 27.6% of the sebaceous carcinomas of our series. No mutation was identified in benign sebaceous tumors.

2.- The difference in *TERT* promoter mutation between sebaceous carcinomas and sebaceomas was statistically significant, therefore the mutation may support a diagnosis of malignancy.

3.- The histopathological profile of mutated sebaceous carcinomas is characterized, significantly, by a higher frequency of invasive growth pattern than in wild-type carcinomas.

4.- Mutations in other genes have been detected in sebaceous carcinomas. TP53 was the most frequently mutated gene, followed by promoter of *TERT*. EGFR, ATRX, PDGFRA, CDKN2A, PTEN and ACVR1 were less often mutated. Significantly, sebaceous carcinomas with nuclear expression of MMR proteins by immunohistochemistry show a higher frequency of TP53 mutations than carcinomas with altered proteins.

INTRODUCCIÓN

1. LA GLÁNDULA SEBÁCEA NORMAL

La glándula sebácea es un anejo cutáneo presente en toda la superficie cutánea, excepto en las palmas y las plantas. Su tamaño es variable, incluso en el mismo individuo y en la misma región anatómica. Su densidad cambia según la zona corporal, siendo máxima en la cara y el cuero cabelludo (hasta 400-900 glándulas por cm^2) y mínima en el dorso de las manos (10-20 glándulas por cm^2). De ahí que las neoplasias sebáceas se localicen con mayor frecuencia en el área de cabeza y cuello, como se verá más adelante.^{1,2}

Las glándulas sebáceas se encuentran habitualmente asociadas con un folículo piloso de tipo terminal o velloso, formando la unidad pilosebácea o pilo-sebácea-apocrina si asocia, además, una glándula apocrina.^{2,3} Hay glándulas sebáceas no relacionadas con folículos pilosos en la mucosa oral (puntos de Fordyce) y en otras localizaciones ectópicas, como esófago y región genital.^{1,4} El área periocular contiene abundantes glándulas sebáceas, entre las que destacan las glándulas de Meibomio, las glándulas de Zeiss, las glándulas sebáceas de las cejas, las de la carúncula y las de los folículos pilosos de la piel del párpado.^{5,6}

Las glándulas sebáceas son estructuras uni o multilobuladas cuyos lobulillos confluyen en un conducto excretor común que se abre hacia el canal folicular. Una membrana basal rodea cada lóbulo, separándolo de la dermis. En la periferia de los lobulillos se identifica una capa de células germinativas, de morfología basaloide, con núcleo relativamente grande, hipercromático, nucléolo prominente y citoplasma escaso basófilo, sin vacuolización. Las células van madurando a partir de esta capa, siendo considerablemente más grandes que las germinativas y con pequeñas vacuolas lipídicas en su citoplasma. Se trata de los sebocitos inmaduros, que ocupan una o dos capas en la periferia del lóbulo. El resto está formado por sebocitos maduros, que muestran un citoplasma lleno de vacuolas y un núcleo festoneado por la impronta de dichas vacuolas sobre la membrana nuclear (Figura I.1). Hacia el centro del lobulillo los núcleos se vuelven cada vez más picnóticos hasta que la célula muere y descarga una mezcla de lípidos y restos celulares en el conducto excretor, denominada sebo.⁷⁻¹⁰ Se trata de una secreción de tipo holocrina, es decir, producida por la propia desintegración de la célula. Los lípidos presentes en el sebo son diglicéridos, triglicéridos, colesterol, ácidos grasos libres, ésteres de cera y escualeno (estos dos últimos son específicos de la glándula sebácea).^{1,8,11} Con frecuencia el sebo contiene

bacterias (*Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis*), levaduras (*Pytirosporium ovale*) y ácaros (*Demodex folliculorum* o *brevis*).⁴

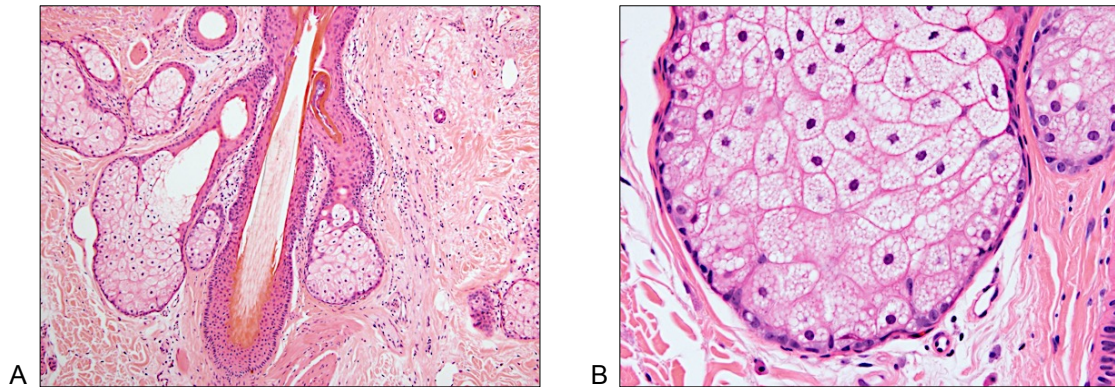


Figura I.1. Glándula sebácea. Células germinativas periféricas y sebocitos. A: 100X y B: 400X (HE).

El conducto sebáceo está revestido por un epitelio escamoso estratificado con una fina capa córnea, espiculada y ligeramente eosinófila, denominada sebolema, que envuelve al sebo una vez secretado, separándolo de la queratina del infundíbulo folicular, de disposición hojaldrada y basófila.^{9,10}

El desarrollo y activación de las glándulas sebáceas depende de los andrógenos. En el recién nacido, el efecto de los andrógenos maternos transplacentarios da como resultado glándulas sebáceas relativamente bien desarrolladas, que durante la vida intrauterina contribuyen a la formación del vérnix caseoso. Tras el nacimiento, el nivel de andrógenos disminuye y las glándulas sebáceas se atrofian. En la pubertad, el aumento de los niveles hormonales induce su agrandamiento y la producción de sebo. Por este motivo, las neoplasias sebáceas son muy raras en niños y poco frecuentes en la adolescencia.^{9,12}

La glándula sebácea se renueva durante la vida adulta y en su homeostasis participan hormonas, citoquinas, moléculas de señalización y mediadores del metabolismo de los lípidos.¹³ Recientemente se ha resaltado el papel de las vías de señalización en los procesos de desarrollo y diferenciación de la glándula sebácea, así como la implicación de algunas de ellas en el desarrollo de tumores sebáceos. Parece que la inhibición de la vía Wnt/beta-catenina y la activación de c-Myc y de la vía Hedgehog son importantes en los procesos de diferenciación y maduración de los sebocitos.¹³⁻¹⁶ La activación de la vía Wnt/beta-catenina produce la translocación de beta-catenina al núcleo donde se une con el factor de transcripción LEF-1 y permite la transcripción genética.¹⁴ En sebaceomas y adenomas sebáceos se ha demostrado la presencia de mutaciones del gen LEF-1.¹⁷ En ratones transgénicos que expresaban

defectos en el sitio de unión de la beta-catenina con el factor de transcripción LEF-1 se ha observado la aparición espontánea de tumores sebáceos.^{18,19}

El desarrollo de la glándula sebácea está relacionado con el del folículo piloso y la glándula apocrina. Los gérmenes o primordios foliculares aparecen en toda la superficie corporal, excepto en las palmas y las plantas, alrededor de la semana 10^a de gestación, como engrosamientos del ectodermo primitivo denominados placodas epiteliales. Comienza en el cuero cabelludo y la cara y progresa en sentido céfalo-caudal. Los gérmenes foliculares crecen en profundidad hacia el mesénquima, en forma de cordones de células epiteliales. La porción más profunda, que adopta la forma de bulbo y se convertirá en la matriz del folículo piloso, rodea a las células mesenquimales que formarán la papila folicular. La glándula sebácea se desarrolla en las semanas 13 a 15 de gestación. En la vaina radicular más externa del folículo primitivo se forman tres protuberancias. La superior dará origen a la glándula apocrina, la intermedia a la glándula sebácea y la inferior al punto de inserción del músculo erector del pelo. En las tres protuberancias las células tienen un núcleo redondo u oval, hipercromático y un citoplasma escaso. Posteriormente, en el centro de la protuberancia intermedia, las células comienzan a desarrollar vacuolas en el citoplasma, un signo de diferenciación sebácea. La protuberancia se agranda formándose el lóbulo sebáceo, en cuya periferia las células mantienen una morfología germinativa.^{2,10,20}

Se ha observado que, durante la formación de la unidad pilosebácea, se establecen distintos compartimentos de células madre según la expresión de ARN mensajero y proteínas específicas. Las células que expresan Lrig1 se consideran las células precursoras de los sebocitos. Sox9 es un marcador de células madre del folículo piloso, que también es indispensable en la formación de la unidad pilosebácea. En la placodas epiteliales, las células coexpresan Lrig1 y Sox9. Según avanza el desarrollo, estas células progenitoras generan grupos de células madre distintos. Las células que expresan Sox9 se separan de las que expresan Lrig1, que se mantienen en la parte alta del folículo piloso, donde darán origen a los sebocitos.^{15,16}

2. PERSPECTIVA HISTÓRICA Y CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DE LA GLÁNDULA SEBÁCEA

Las primeras descripciones de las neoplasias sebáceas datan del siglo XIX. La primera vez que se utilizó el término “adenoma sebáceo” fue en 1885 cuando Balzer y Ménétrier lo emplearon para denominar una neoplasia cutánea en una paciente de 21 años con numerosas pápulas pequeñas en cara, cuero cabelludo y cuello, aunque la ilustración del artículo se correspondía realmente con un tricoepitelioma.²⁰

En cuanto al carcinoma sebáceo, parece que Thiersch publicó el primer caso de localización periocular en 1865 y que Baldauf describió otro en 1870, sin embargo, el primer caso bien documentado se atribuye a Allaire en 1891.²¹ Posteriormente, se publicaron más artículos, incluido uno de Hagedoorn,²² que reconocieron la naturaleza agresiva y el potencial metastásico de esta neoplasia. La mayoría del conocimiento moderno sobre el carcinoma sebáceo del párpado fue iniciada por la revisión de Straatsma en 1956, que estudió 16 casos en los que determinó el origen y el comportamiento clínico de esta neoplasia.²³

En 1942 Beach y Severance revisaron la literatura previa sobre el carcinoma sebáceo y refirieron que Malherbe y Robin, a mediados del siglo XIX, fueron los primeros en describir un carcinoma sebáceo extraocular.²⁴

Warren y Warvi realizaron en 1943 la primera clasificación de las neoplasias con diferenciación sebácea.²⁵ Desde entonces las clasificaciones han sido múltiples, debido principalmente, a los problemas derivados de la nomenclatura y de los criterios empleados para su diagnóstico.¹⁰

Un ejemplo típico es el término “epitelioma sebáceo”, introducido por Lever en 1949 para definir una neoplasia cuyo grado de diferenciación se sitúa entre el adenoma sebáceo y el epitelioma basocelular quístico.²⁶ Este término ha sido empleado tanto para designar neoplasias benignas con diferenciación sebácea, como para el epitelioma basocelular con diferenciación sebácea.¹⁰ En 1984 Troy y Ackerman acuñaron el término "sebaceoma" para referirse a neoplasias sebáceas benignas bien delimitadas, localizadas principalmente en la parte superior de la dermis, generalmente sin conexión con la epidermis y con predominio de células basaloides. Además, describieron las características del adenoma sebáceo y del sebaceoma como neoplasias benignas y del carcinoma sebáceo, como maligna.²⁷ A pesar de esta propuesta siguió existiendo cierta confusión en cuanto al término "sebaceoma". Incluso artículos recientes clasifican estas neoplasias como adenoma sebáceo, epitelioma sebáceo/sebaceoma y carcinoma sebáceo.²⁸

En 1994, Steffen y Ackerman consideraron que algunos carcinomas sebáceos podían tener la misma arquitectura que un tumor benigno.²⁰ En 1998 Nussen y Ackerman revisaron los casos de adenomas sebáceos publicados y propusieron que la mayoría de éstos eran carcinomas sebáceos bien diferenciados.²⁹ Si bien este punto de vista no es ampliamente compartido, sirve para resaltar la dificultad que puede presentar la distinción de ambas entidades.

En el estudio de Harvey, que evaluaba la variabilidad interobservador en el diagnóstico de las lesiones circunscritas sebáceas,³⁰ se encontró una concordancia diagnóstica de media a moderada. En particular, hubo una gran variabilidad entre los patólogos en la proporción de casos diagnosticados como carcinoma, que oscilaba entre el 5% al 57% de los casos.³⁰ Kazakov describió la dificultad que existía para clasificar una pequeña serie de neoplasias sebáceas que mostraban una arquitectura "benigna" (lesiones más o menos bien circunscritas y simétricas con lóbulos bien demarcados), pero con citología atípica.³¹ Recientemente se ha propuesto el término de carcinoma sebáceo de bajo grado³² o neoplasias sebáceas borderline³³ para denotar neoplasias sebáceas con discordancia arquitectural y citológica.

En el estudio de variabilidad interobservador mencionado anteriormente,³⁰ se observaron muchos casos en los que hubo un solapamiento en el diagnóstico de lesiones benignas: entre la hiperplasia sebácea y el adenoma sebáceo y entre el adenoma sebáceo y el sebaceoma. Según los autores, parte de esta variabilidad se debe a la aplicación de criterios diagnósticos subjetivos. Las tres lesiones están compuestas por lóbulos bien circunscritos. Tanto el adenoma sebáceo como el sebaceoma muestran mayor número de células germinativas basaloides que la hiperplasia sebácea. El criterio utilizado para diferenciar la hiperplasia sebácea del adenoma sebáceo es la presencia de más de dos capas de células germinativas en este último. Para diferenciar el adenoma sebáceo del sebaceoma se emplea el porcentaje de células germinativas basaloides; si suponen más del 50% del tumor, se utiliza el término sebaceoma. Como se comenta en dicho estudio, esta última distinción, aunque práctica, es arbitraria y es poco probable que refleje un comportamiento biológico diferente del sebaceoma.³⁰ Sánchez Yus y cols. propusieron el término "sebomatricoma" para designar todas las neoplasias sebáceas benignas, siendo el adenoma sebáceo el extremo más diferenciado y el sebaceoma el menos diferenciado.³⁴

La clasificación de la OMS considera como neoplasias benignas con diferenciación sebácea, el adenoma sebáceo y el sebaceoma y como maligna, el carcinoma sebáceo. Hay un epígrafe adicional de tumores sebáceos quísticos,

variantes morfológicas de las tres categorías principales, que se consideran indicativos casi siempre de síndrome de Muir-Torre.³⁵

3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DE LAS NEOPLASIAS SEBÁCEAS

Los tumores derivados de las glándulas sebáceas, adenoma sebáceo, sebaceoma y carcinoma sebáceo, son neoplasias cutáneas poco frecuentes, que suelen presentarse en personas mayores. Suelen localizarse en el área de la cabeza y el cuello, pero pueden aparecer en cualquier zona del cuerpo. La presentación clínica es variada pudiendo confundirse clínicamente con otros tumores cutáneos más frecuentes, como el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas.³⁶

El reconocimiento de estos tumores es importante porque pueden formar parte del síndrome de Muir-Torre, una variante del síndrome de carcinoma colorrectal hereditario no asociado a poliposis o síndrome de Lynch, que se caracteriza por la asociación de neoplasias cutáneas (sebáceas con o sin morfología quística o queratoacantomatosa) y neoplasias viscerales. Generalmente se recomienda que estos tumores sean evaluados por inmunohistoquímica para detectar el estado de las proteínas reparadoras de apareamientos incorrectos del ADN o proteínas MMR (del inglés *mismatch repair*).³⁷

3.1. Adenoma sebáceo

El adenoma sebáceo es una neoplasia benigna, infrecuente, generalmente localizada en el área de la cabeza y el cuello de pacientes mayores, entre la sexta y séptima décadas de la vida. Pueden aparecer en otras zonas como el tronco, las extremidades y área anogenital. Suele presentarse como un nódulo solitario o múltiple, amarillento, rosado o de color piel y tamaño variable, normalmente menor de 1 cm de diámetro. Generalmente son asintomáticos y de lento crecimiento.^{38,39}

Histológicamente, son lesiones multilobuladas y bien circunscritas, relativamente simétricas y con un patrón similar a la glándula sebácea normal. Se localizan en la dermis superior y, con frecuencia, tienen conexión con la epidermis suprayacente o con el infundíbulo folicular (Figura 1.2).^{36,39}

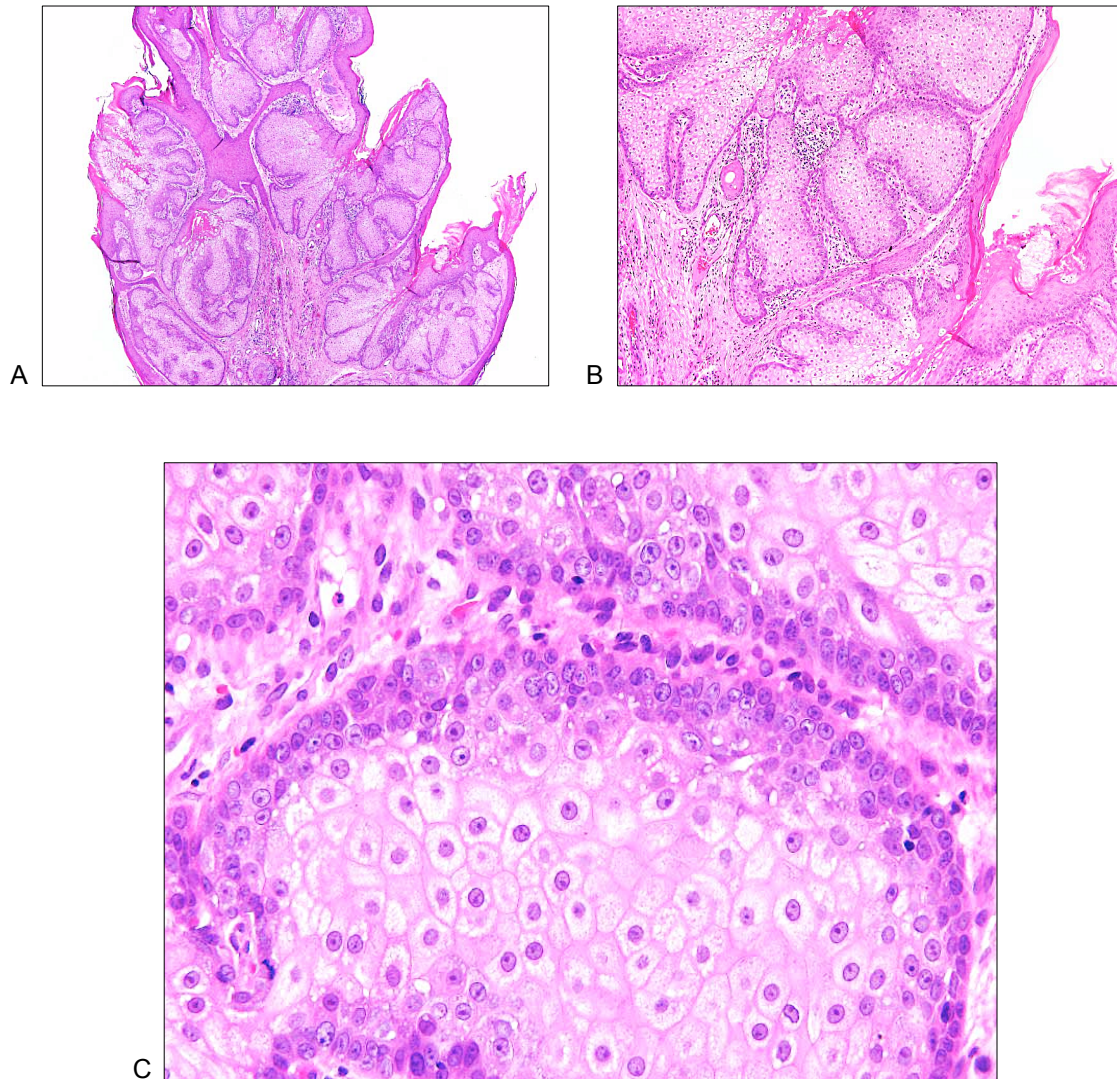


Figura I.2. Adenoma sebáceo. A: 40X, B: 200X, C: 400X (HE).

Los lóbulos presentan en la periferia más de dos hileras de células basaloides, en las zonas centrales, una población prominente de sebocitos maduros y, entre ambas poblaciones celulares, sebocitos parcialmente maduros. Sin embargo, la maduración no es tan ordenada como en la glándula sebácea normal. No se observa atipia citológica ni figuras de mitosis anormales. Las áreas centrales pueden presentar degeneración holocrina y formar espacios quísticos de tamaño variable.³⁹ Este cambio quístico se asocia frecuentemente con el síndrome de Muir-Torre.⁴⁰

La diferenciación entre adenoma sebáceo e hiperplasia sebácea puede ser difícil, sobre todo en casos en los que el adenoma está centrado en estructuras foliculares. En la hiperplasia sebácea los lóbulos se disponen alrededor de un infundíbulo folicular central conectado con la epidermis y muestra dos o menos capas de células basaloides periféricas. El adenoma sebáceo muestra mayor número de células germinativas y sebocitos parcialmente maduros. La implicación práctica de

diferenciar ambas entidades es considerar la posibilidad de un síndrome de Muir-Torre en el paciente con adenoma.⁹

Para diferenciarlo del sebaceoma se utiliza por convenio el punto de corte del 50% de células basaloides. Por debajo del 50% se considera adenoma sebáceo y por encima, sebaceoma.⁴¹

En ocasiones puede ser difícil de diferenciar de los carcinomas sebáceos con un contorno bien definido (grado I), como se ha comentado anteriormente. En estos casos hay que basarse en la presencia o no de rasgos citológicos de malignidad. La ulceración puede ocurrir en el adenoma, pero es infrecuente, por lo que si está presente se debe evaluar cuidadosamente la lesión.^{9,39}

El tratamiento es la escisión quirúrgica completa.⁹ Los adenomas sebáceos son las neoplasias sebáceas que con más frecuencia se asocian a síndrome de Muir-Torre.³⁶ Como son tumores benignos, si el paciente tiene este síndrome, el pronóstico vendrá determinado por la neoplasia visceral asociada.³⁵

3.2. Sebaceoma

El sebaceoma es una neoplasia sebácea benigna localizada típicamente en la región de la cabeza y el cuello. Es menos frecuente que se desarrolle en el tronco y las extremidades. La mayoría ocurre en paciente mayores, a partir de la quinta y sexta décadas de la vida.³⁹ Se suele presentar como una pápula o un nódulo amarillento o rosado, que con frecuencia muestra una superficie queratósica, costrosa o ulcerada.⁹ A veces son múltiples, particularmente en el síndrome de Muir-Torre.³⁸

Histológicamente, consiste en una neoplasia multilobular, generalmente bien circunscrita y simétrica localizada principalmente en la dermis, sin conexión con la epidermis o con conexión focal con la misma. Está constituida predominantemente por células sebáceas germinativas, de morfología basaloide, que suponen más del 50% de las células tumorales y, en menor proporción, por sebocitos maduros o parcialmente maduros, en grupos o aislados. La presencia de diferenciación ductal es un rasgo común. La actividad mitótica es variable y carece de atipia citológica significativa (Figura I.3).^{39,41} Un 25 a 30% de los sebaceomas muestra un patrón organoide de tipo laberíntico/sinusoidal, ondulado con estructuras parecidas a cuerpos de Verocay o de tipo carcinoide. Raramente presenta diferenciación focal apocrina, estructuras de tipo infundibuloquísticas, metaplasia escamosa o células fusiformes.^{39,42}

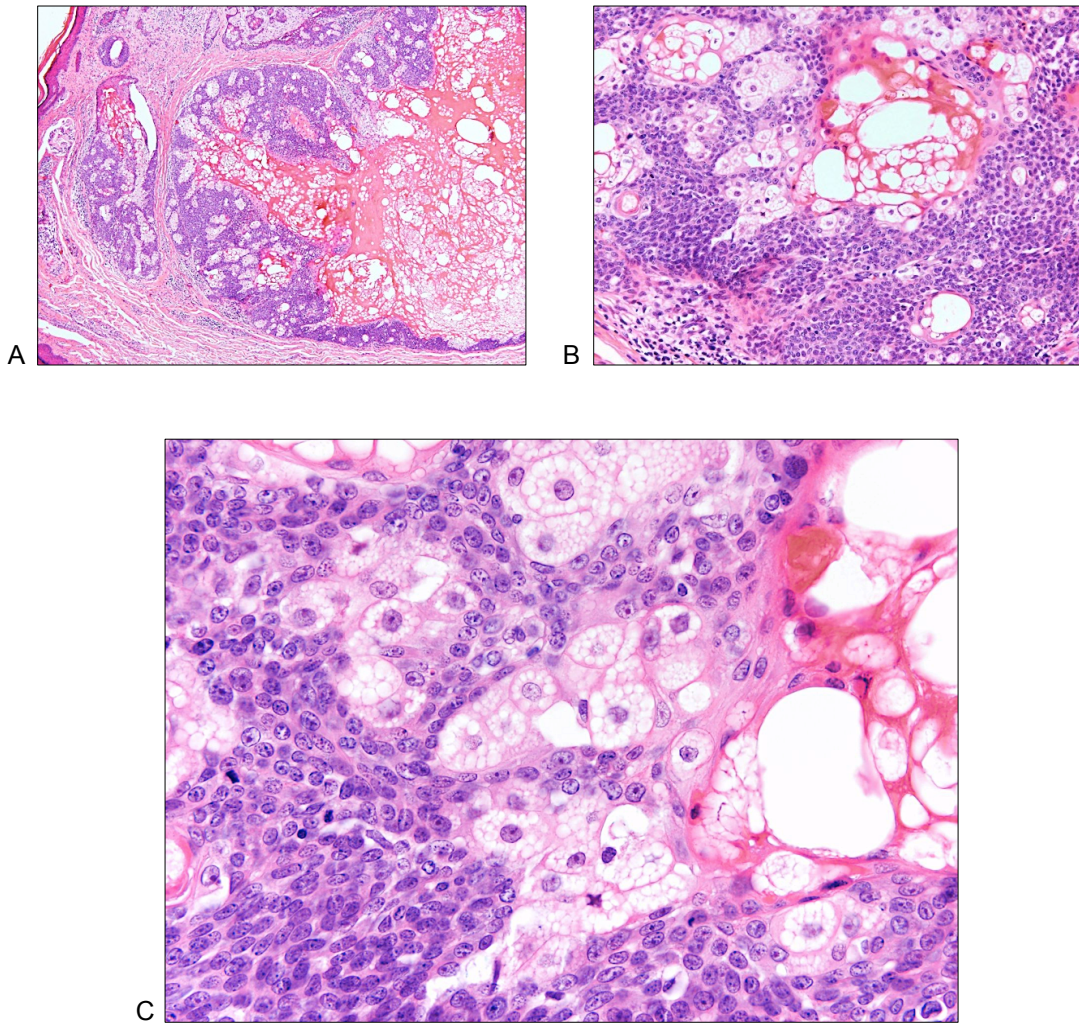


Figura I.3. Sebaceoma. A: 40X, B: 200X, C: 400X (HE).

El diagnóstico diferencial con el adenoma sebáceo se ha comentado en el apartado anterior. El adenoma recuerda la arquitectura de la glándula sebácea normal, con células germinativas periféricas y sebocitos maduros en la zona central. En el sebaceoma predominan las células germinativas. Se acepta la presencia de más de un 50% de células germinativas para considerarlo sebaceoma.⁴¹

El diagnóstico diferencial con el carcinoma sebáceo se basa en el crecimiento infiltrativo y la atipia citológica. Sin embargo, hay lesiones circunscritas, con predominio de las células basaloides sobre los sebocitos maduros y atipia citológica. La clasificación de estas lesiones como sebaceoma “atípico” o carcinoma sebáceo no está bien establecida. La mayoría son lesiones pequeñas (<1cm) y superficiales, por lo que la escisión completa con márgenes libres parece curativa.^{9,39}

En cuanto al carcinoma basocelular, algunos pueden mostrar focalmente patrones organoides con diferenciación sebácea, pero la presencia de empalizada nuclear periférica, hendiduras tumor-estroma y degeneración estromal mucinosa en el

carcinoma basocelular permiten diferenciarlo de las neoplasias sebáceas. Para distinguir el sebaceoma del tricoblastoma, se debe buscar diferenciación folicular focal, hendiduras estroma-estroma y cuerpos mesenquimales papilares. Los tumores carcinoides en la piel son casi siempre metastásicos y se pueden diagnosticar bien con la información clínica y con la presencia de marcadores neuroendocrinos en el estudio inmunohistoquímico.^{9,39}

El tratamiento del sebaceoma es la escisión quirúrgica y no recidivan ni metastatizan tras su extirpación completa.^{9,38}

3.3. Carcinoma sebáceo

El carcinoma sebáceo es una neoplasia maligna de la glándula sebácea muy infrecuente, representa el 0,2-4,6% de todas neoplasias cutáneas malignas.⁴³ Tiene una incidencia anual estimada de aproximadamente 1-2 casos por millón de personas.^{43,44} Es el tercer tumor más frecuente del párpado, por detrás del carcinoma de células basales y del carcinoma de células escamosas.⁴⁵

Aparece en pacientes mayores, con una edad media situada en los 70 años aproximadamente⁴⁶ y una mediana de 72 ó 73 años, según la series.^{44,46,47} Son tumores extremadamente raros en niños.^{48,49} Tradicionalmente, las series de carcinomas sebáceos publicadas mostraban una mayor frecuencia en mujeres,⁵⁰ sin embargo, estudios epidemiológicos recientes han detectado un ligero predominio en hombres, que oscila entre el 52,4 y el 60,3%.^{44,46,47,51} Se consideran factores de riesgo la edad avanzada, el sexo femenino, el antecedente de radiación, la predisposición genética al síndrome de Muir-Torre y, posiblemente, el retinoblastoma familiar.^{44,45}

El carcinoma sebáceo constituye del 1 al 3,2% de los tumores malignos del párpado en los países occidentales y en torno al 30-40% en los países asiáticos, aunque esta diferencia parece debida a una menor incidencia relativa de otros tumores malignos en esta población.^{43,52} La mayoría surge en las glándulas de Meibomio del párpado superior y, con menor frecuencia, en las del párpado inferior, en las glándulas Zeiss, en las glándulas sebáceas de la carúncula y, aún con menos frecuencia, en las glándulas sebáceas en el área de las cejas.⁵³ Suele presentarse como una pápula o nódulo amarillento o rosado de rápido crecimiento y puede confundirse clínicamente con procesos inflamatorios como chalazión o blefaroconjuntivitis, o con otros tumores más frecuentes como carcinoma de células basales o de células escamosas.^{36,43} Aunque se ha reportado una alta frecuencia en los carcinomas perioculares (hasta del 75% en algunas series), en estudios epidemiológicos recientes la frecuencia del carcinoma sebáceo periorcular se sitúa entre el 25,8% y el 45,9% y la de los extraoculares, entre el 54,1 y el 74,1%, siendo la

región extraocular de la cabeza y el cuello la principalmente afectada (40,7-68,8%).^{44,46,47,51} También se han descrito en otras localizaciones como genitales externos, tronco y extremidades.^{39,54} Los tumores extraoculares puede imitar clínicamente lesiones benignas, como el granuloma piógeno o el molusco contagioso, o neoplasias, como el carcinoma de células escamosas, el carcinoma de células basales o neoplasias anexiales.⁴³

Desde el punto de vista histológico, el carcinoma sebáceo se presenta como una proliferación intradérmica uni o multilobular, a veces con conexión focal con la epidermis o con el infundíbulo folicular, y con un estroma fibrovascular que carece de desmoplasia. Las partes centrales de los nidos celulares pueden ser necróticas dando un patrón de comedonecrosis. El tumor está constituido por una mezcla variable de células basaloides y de células con diferenciación sebácea. En las neoplasias bien diferenciadas, las células presentan abundante citoplasma, núcleo ovalado vesicular y nucléolo evidente, con un número variable de mitosis; las pobremente diferenciadas muestran alta relación núcleo/citoplasma, pleomorfismo nuclear, nucléolo prominente e intensa actividad mitótica (Figura I.4).^{35,39}

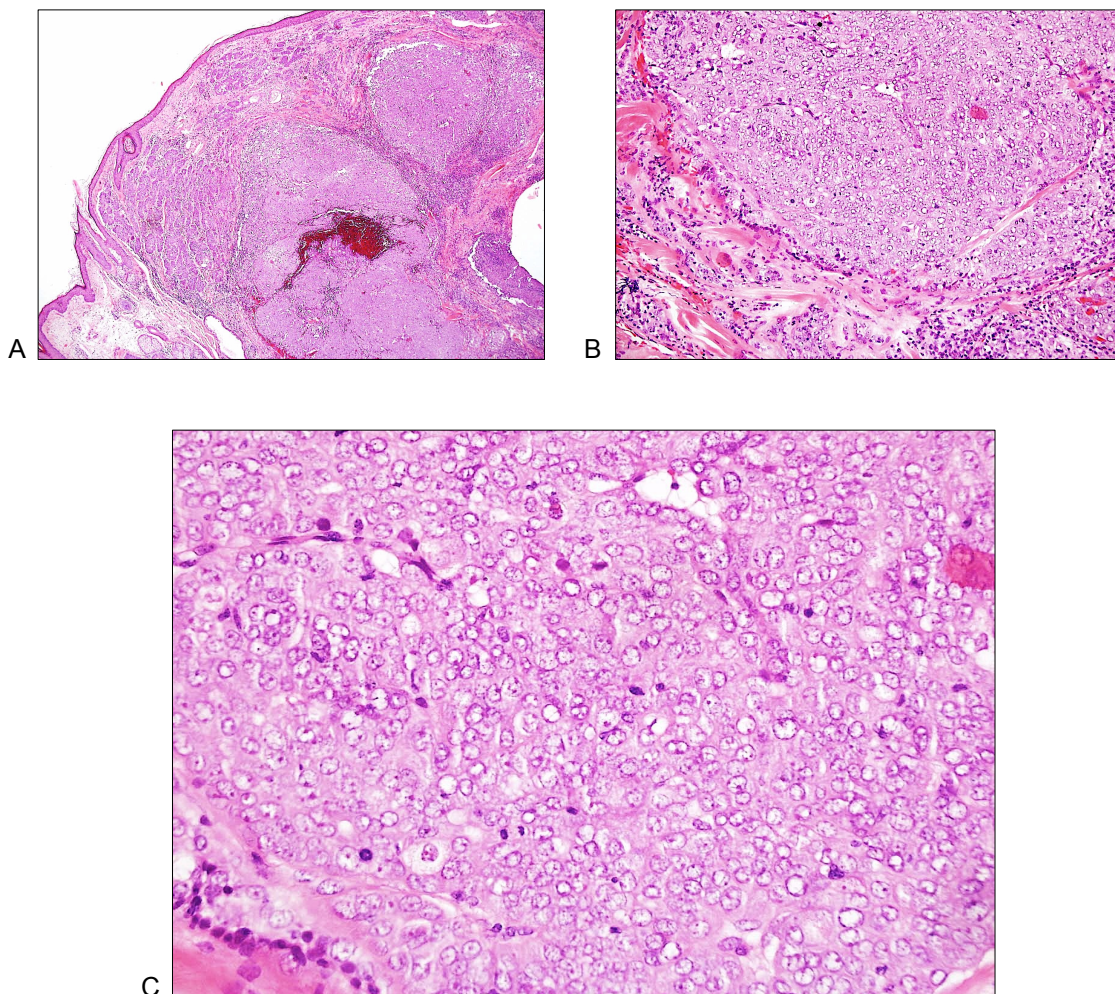


Figura I.4 Carcinoma sebáceo. A: 40X, B: 200X, C: 400X (HE).

Según el patrón de crecimiento, la OMS los divide en grado I (tumor compuesto de lóbulos bien delimitados y aproximadamente del mismo tamaño), grado II (aquéllos con una mezcla de nidos bien definidos y crecimiento infiltrativo o grupos de células confluentes) y grado III (lesiones con crecimiento invasivo o de tipo medular en sábana).³⁵

Los tumores perioculares pueden mostrar extensión pagetoide o, menos frecuentemente, carcinoma *in situ*. No es habitual ver estos cambios en lo casos extraoculares.³⁸

La OMS destaca las siguientes variantes, ya que pueden llevar a confusión con otros tumores cutáneos. La variante basaloide, en la que el tumor está constituido por células pequeñas con escaso citoplasma y, a menudo, con empalizada nuclear en la periferia de los nidos celulares. Generalmente muestra un patrón de crecimiento grado III y escasas células con rasgos claramente de sebocitos. La variante escamoide, en la que el tumor muestra una metaplasia escamosa prominente, a menudo con formación de perlas de queratina; en algunos casos también pueden presentar áreas de células fusiformes. Por último, algunos carcinomas puede mostrar un crecimiento organoide pseudoneuroendocrino, que imita a los tumores carcinoides.³⁵

El diagnóstico diferencial varía dependiendo de los patrones arquitecturales y citológicos. Hay neoplasias cutáneas, como el carcinoma de células basales, el carcinoma de células escamosas y las neoplasias anexiales, que muestran, con frecuencia, células con aclaramiento citoplasmático. En estos casos, es necesario establecer la presencia de diferenciación sebácea mediante las características morfológicas o con la ayuda de las técnicas de inmunohistoquímica. Una vez establecida la diferenciación sebácea, el diagnóstico diferencial de lesiones bien circunscritas se debe establecer con el adenoma sebáceo y el sebaceoma, ya comentado anteriormente. En cuanto al carcinoma de células escamosas, es importante recordar que los carcinomas sebáceos pueden mostrar diferenciación escamosa y que ésta puede ser extensa. En lo que se refiere al carcinoma basocelular con diferenciación sebácea, se trata de una entidad muy rara, presenta empalizada nuclear periférica en los nidos tumorales y hendidura de retracción entre tumor y estroma.^{9,39}

Puede ser difícil diferenciar los carcinomas sebáceos intraepiteliales de la enfermedad de Bowen en biopsias pequeñas superficiales del párpado, sobre todo cuando la diferenciación sebácea es escasa.⁹

Otros tumores a tener en cuenta en el diagnóstico diferencial son el melanoma, el tumor de células de Merkel y las metástasis cutáneas de carcinomas de células

claras (carcinoma renal de células claras, de próstata y hepatocelular), que pueden descartarse con un panel adecuado de marcadores inmunohistoquímicos, recordando que el carcinoma renal puede mostrar tinción positiva para adipofilina.^{9,36}

La estadificación con la clasificación TNM de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) es diferente según su ubicación (Tablas I.1, I.2 y I.3).⁵⁴ La relación entre la estadificación TNM y la progresión de la enfermedad ha sido validada para los carcinomas sebáceos del párpado. Una categoría T2b o mayor parece correlacionarse con un mayor riesgo de metástasis ganglionar y un comportamiento más agresivo. No se han realizado estudios similares con los carcinomas sebáceos extraoculares.⁵⁶⁻⁵⁸

Tabla I.1. Clasificación TNM para el carcinoma cutáneo de la piel del párpado

Clasificación T	Tamaño	
TX	El tumor primario no puede ser identificado	
T0	Sin evidencia de tumor primario	
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>	
T1	Tumor de 10 mm o menos en su mayor dimensión	T1a: no invade la placa tarsal ni el margen del párpado
		T1b: invade la placa tarsal o el margen del párpado
		T1c: afecta al espesor completo del párpado
T2	Tumor > 10 mm, pero menor o igual a 20 mm en su mayor dimensión	T2a: no invade la placa tarsal ni el margen del párpado
		T2b: invade la placa tarsal o el margen del párpado
		T2c: afecta al espesor completo del párpado
T3	Tumor > 20 mm en su mayor dimensión	T3a: no invade la placa tarsal ni el margen del párpado
		T3b: invade la placa tarsal o el margen del párpado
		T3c: afecta al espesor completo del párpado
T4	Cualquier tumor palpebral que invada estructuras oculares, orbitarias o faciales adyacentes	T4a: el tumor invade estructuras oculares o intraorbitarias
		T4b: el tumor invade (o erosiona) las paredes óseas de la órbita o se extiende a los senos paranasales o invade el saco lacrimal/conducto nasolacrimal o el cerebro
Clasificación N	Nº de ganglios metastásicos	
NX	No se pueden evaluar los ganglios regionales	
N0	Sin evidencia de afectación ganglionar	
N1	Un único ganglio regional ipsilateral de 3 cm o menos en su dimensión máxima	
N2	Un único ganglio ipsilateral de más de 3 cm en su dimensión máxima o ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales	
Clasificación M	Localización	
M0	Sin metástasis a distancia	
M1	Metástasis a distancia	

Tabla I.2. Clasificación TNM para el carcinoma cutáneo de cabeza y cuello (excluye el párpado)

Clasificación T	Tamaño
TX	El tumor primario no puede ser identificado
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor de 2 cm o menos en su mayor dimensión
T2	Tumor > 2 cm y ≤ 4 cm en su mayor dimensión

T3	Tumor > 4 cm en su mayor dimensión o erosión ósea leve o invasión perineural o invasión en profundidad*
T4a	Tumor con invasión extensa del hueso cortical o de la médula ósea
T4b	Tumor con invasión de la base del cráneo o esqueleto axial, incluida la afectación foraminal y/o del foramen vertebral hacia el espacio epidural.
Clasificación N	Nº de ganglios metastásicos
NX	No se pueden evaluar los ganglios regionales
N0	Sin evidencia de afectación ganglionar
N1	Un único ganglio ipsilateral de 3 cm o menos en su dimensión máxima, sin extensión extranodal
N2	
N2a	Un único ganglio ipsilateral de más de 3 cm y menos de 6 cm en su dimensión máxima sin extensión extranodal
N2b	Múltiples ganglios ipsilaterales, ninguno de más de 6 cm en su dimensión máxima, sin extensión extranodal
N2c	Ganglios bilaterales o contralaterales, ninguno de más de 6 cm en su mayor dimensión, sin extensión extranodal
N3a	Un ganglio de más de 6 cm en su dimensión máxima, sin extensión extranodal
N3b	Un único ganglio o múltiples ganglios con extensión extranodal clínica **
Clasificación M	Localización
M0	Sin metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
<p>*: La invasión profunda se define como una invasión más allá de la grasa subcutánea o > 6 mm (medido desde la capa granular de la epidermis adyacente normal a la base del tumor); la invasión perineural para la clasificación T3 se define como afectación clínica o radiológica de los nervios mencionados sin invasión ni transgresión del foramen o de la base del cráneo.</p> <p>** : La presencia de afectación cutánea o invasión de partes blandas con fijación/anclaje profundo al músculo subyacente o a estructuras adyacentes o signos clínicos de afectación nerviosa se clasifica como extensión extranodal clínica</p>	

Tabla I.3. Clasificación TNM para el carcinoma cutáneo (excluye párpado, cabeza y cuello, perianal, vulva y pene)

Clasificación T	Tamaño
TX	El tumor primario no puede ser identificado
T0	Sin evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor de 2 cm o menos en su mayor dimensión
T2	Tumor > 2 cm y ≤ 4 cm en su mayor dimensión
T3	Tumor > 4 cm en su mayor dimensión o erosión ósea leve o invasión perineural o invasión en profundidad*
T4a	Tumor con invasión extensa del hueso cortical o de la médula ósea
T4b	Tumor con invasión de la base del cráneo o esqueleto axial, incluida la afectación foraminal y/o foramen vertebral hacia el espacio epidural.
Clasificación N	Nº de ganglios metastásicos
NX	No se pueden evaluar los ganglios regionales
N0	Sin evidencia de afectación ganglionar
N1	Un único ganglio de 3 cm o menos en su dimensión máxima
N2	Un único ganglio ipsilateral de más de 3 cm y menos de 6 cm en su dimensión máxima o múltiples ganglios ipsilaterales ninguno mayor de 6 cm en su dimensión máxima
N3	Un ganglio de más de 6 cm en su dimensión máxima
Clasificación M	Localización
M0	Sin metástasis a distancia
M1	Metástasis a distancia
<p>*: La invasión profunda se define como una invasión más allá de la grasa subcutánea o > 6 mm (medido desde la capa granular de la epidermis adyacente normal a la base del tumor); la invasión perineural para la clasificación T3 se define como afectación clínica o radiológica de los nervios mencionados sin invasión ni transgresión del foramen o de la base del cráneo.</p> <p>En el caso de tumores múltiples simultáneos, se clasifica el tumor con la T más alta y el número de tumores se indica entre paréntesis.</p>	

En la literatura antes del año 2000, las tasas de metástasis del carcinoma sebáceo en los ganglios linfáticos regionales variaban entre el 8 y el 28%. Los casos de series publicados en los últimos años han encontrado tasas menores, entre el 1,3 y el 12%.^{44,46,50,59} Las metástasis a distancia son menos frecuentes, entre el 2 y el 10%, y pueden afectar al pulmón, hígado, hueso o cerebro.^{50,56,60,61}

El tratamiento de elección es quirúrgico, mediante escisión con margen amplio. En cuanto a la recidiva del carcinoma, en la literatura reciente sobre este tipo de tumores se reportan tasas del 4-28% tras escisión quirúrgica,^{50,59,61,62} tanto para carcinomas sebáceos perioculares como extraoculares, que son inferiores a lo publicado hace más de veinte años (19-37%).⁶³⁻⁶⁵ En los carcinomas perioculares también se realiza la cirugía de Mohs, observándose tasas de recidiva menores (6,4-11%).⁴⁵ En general, el uso de radioterapia se restringe a lesiones recurrentes, enfermedad metastásica o tratamiento paliativo en pacientes que no son candidatos para la escisión quirúrgica.^{45,50} Se ha visto que la quimioterapia tópica y la crioterapia son beneficiosas en casos con afectación pagetoide.⁶⁰

Así mismo, se ha observado una disminución de la tasa de mortalidad, con cifras situadas actualmente en el 3-6,7%^{6,61,66} en comparación con lo reportado en la literatura de los años 80 y 90, 18-30%.^{50,64,65}

Entre los factores de mal pronóstico destacan la invasión vascular, linfática o de la órbita, la afectación de ambos párpados, una pobre diferenciación, un origen multicéntrico, la extensión pagetoide, el diagnóstico tardío (> 6 meses) y un tamaño tumoral mayor de 10 mm.⁵⁰ Aunque se ha considerado tradicionalmente que los carcinomas perioculares tienen un peor pronóstico, estudios recientes no han encontrado diferencias entre los casos perioculares y los extraoculares de cabeza y cuello.⁴⁴ Los tumores situados fuera de estas localizaciones parecen tener un mejor pronóstico, aunque se han descrito casos agresivos.^{42,67,68}

4. CRITERIOS DE DIFERENCIACIÓN SEBÁCEA

La presencia de sebocitos es un criterio de diferenciación sebácea que, generalmente, se observa sin dificultad con la tinción de hematoxilina-eosina. Los sebocitos maduros muestran un citoplasma multivacuolado con vacuolas lipídicas de pequeño tamaño y un núcleo central festoneado por la impronta de dichas vacuolas sobre su membrana. Los sebocitos inmaduros presentan un citoplasma parcialmente vacuolado, mostrando, a veces, sólo una o dos vacuolas; los núcleos son redondeados o poco festoneados por la ausencia de presión de las vacuolas sobre la

membrana nuclear. Las células sebáceas germinativas son pequeñas, con citoplasma escaso y núcleo grande, redondeado e hipercromático (Figura I.5).^{10,20}

El adenoma sebáceo muestra una morfología lobulada que recuerda a la de la glándula sebácea, con más de dos hileras de células germinativas periféricas y sebocitos maduros e inmaduros. En los sebaceomas, por el contrario, predominan las células germinativas, encontrándose, en menor proporción, sebocitos en distintos estadios de maduración. Los carcinomas sebáceos, según el grado de diferenciación, muestran, en mayor o menor medida, sebocitos de aspecto maduro, inmaduro y células de aspecto basaloide. Muestran atipia nuclear y frecuentes figuras de mitosis.^{10,40} Otros criterios histológicos de diferenciación sebácea son la presencia de sebo, sebolema o ductos similares a los conductos sebáceos de la glándula sebácea normal, que suelen ser abundantes en las neoplasias sebáceas benignas e infrecuentes en el carcinoma sebáceo.^{4,10}

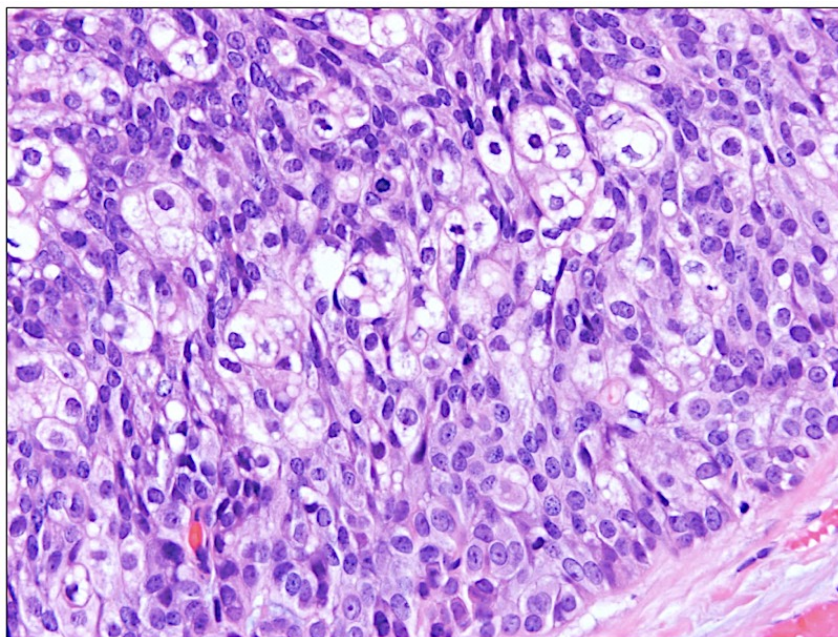


Figura I.5. Sebocitos en distinto grado de maduración y células germinativas, 400X (HE).

En ocasiones hay que recurrir a técnicas especiales para confirmar la presencia de lípidos intracitoplasmáticos o para realizar el diagnóstico diferencial con otras entidades, especialmente en los casos de carcinoma sebáceo pobremente diferenciado. En esta situación hay que diferenciarlo entre otros, del carcinoma de células basales y del carcinoma de células escamosas. Las tinciones histoquímicas con Oil Red y Sudán IV permiten demostrar las vacuolas lipídicas en el interior de las células neoplásicas. Tienen una sensibilidad de aproximadamente el 40% y su aplicación está limitada a secciones de tejido fresco congelado, ya que el

procesamiento habitual en parafina disuelve los lípidos. Además, tiñen de forma inespecífica macrófagos y células del estroma no cargadas de lípidos y la tinción pierde intensidad con el paso del tiempo.^{69,70}

Las técnicas de inmunohistoquímica tienen la ventaja de que se pueden aplicar a tejidos fijados en formol e incluidos en parafina. Sin embargo, la mayoría de las tinciones utilizadas no son marcadores puros de diferenciación sebácea.⁷⁰ El antígeno de membrana epitelial (EMA), la citoqueratina 7, CAM 5.2, Ber-EP4, CD15 y el receptor de andrógenos pueden sugerir diferenciación sebácea, pero no son completamente específicos, lo que limita su utilidad práctica en el estudio de las neoplasias sebáceas.^{70,71}

Otras inmunotinciones más específicas no están fácilmente disponibles o son difíciles de interpretar. Investigaciones recientes han estudiado la utilidad de anticuerpos frente a la familia de proteínas asociadas a las vacuolas lipídicas: perilipina, adipofilina y TIP47 para identificar la diferenciación sebácea.^{72,73} Aunque las tres tienen alta especificidad, la adipofilina es la más sensible.⁷³ La adipofilina muestra un patrón de tinción vesicular membranoso en neoplasias sebáceas, sin embargo, este patrón también se observa en lesiones xantomatosas y en el carcinoma de células renales. Por otro lado, se ha detectado tinción granular focal y débil en algunos carcinomas de células basales y escamosos, tricolemomas, hidradenomas y nevus balonzados, que se ha interpretado como inespecífica.⁷² Algunos autores lo han considerado reactividad cruzada inespecífica con algún otro antígeno intracitoplásmico y no con presencia de lípidos.⁷³ Otros autores, por el contrario, consideran que este patrón se debe a pequeñas cantidades de lípidos intracitoplasmáticos no detectables con hematoxilina-eosina. Este hallazgo ha sugerido que la biosíntesis de lípidos está alterada en estas neoplasias.⁷⁴ De hecho se ha encontrado que la adipofilina es prácticamente ubicua en los tejidos humanos normales y que su expresión está aumentada en los carcinomas correspondientes.^{75,76} Por lo tanto, aunque el patrón de expresión es útil, hay que ser cuidadoso en la interpretación de este marcador.

Se han estudiado también otros anticuerpos de diferenciación sebácea dirigidos contra las proteínas implicadas en la síntesis o procesamiento de los lípidos: proteína ABHD5, el componente 1 del receptor de progesterona (PGRMC1) y la escualeno sintetasa (SQS). Se ha observado un patrón de tinción citoplasmática puntiforme y membranosa en las células tumorales sebáceas y tinción citoplasmática no específica en algunos casos de carcinoma de células basales. Si bien estos anticuerpos pueden tener mayor especificidad para la diferenciación sebácea, su utilidad clínica está disminuida por la limitada disponibilidad de los mismos y la dificultad de su interpretación.^{70,77}

Otros autores han publicado que el anticuerpo contra el factor XIIIa (clon AC-1A1) muestra un patrón de tinción nuclear sensible y específico en las neoplasias sebáceas, con una distribución e intensidad significativamente mayor que en carcinomas de células basales, carcinomas de células escamosas y otros tumores con cambio de célula clara. En tumores sebáceos han identificado una tinción nuclear fuerte, generalmente difusa. Un pequeño porcentaje de tumores no sebáceos mostraba tinción fuerte focal. Por ello, la interpretación de este marcador puede presentar dificultades, ya que, en ciertos casos, puede ser difícil la cuantificación exacta de positividad 'difusa' frente a 'focal'. Además, la positividad se restringía únicamente al clon AC-1A1, no observándose una reactividad similar con otros clones (EP3372 y E980.1), quedando por determinar la proteína específica contra la que está dirigido el clon AC-1A1. Por otro lado, la tinción nuclear también se ha observado en queratinocitos maduros de la epidermis normal, epitelio folicular y glándulas ecrinas normales, por lo que no puede ser considerado un marcador sebáceo puro.⁷⁸⁻⁸⁰

En un estudio reciente se ha comparado la expresión de adipofilina, el factor XIIIa y GATA3 en neoplasias sebáceas. La adipofilina y el factor XIIIa tenían una alta sensibilidad en neoplasias sebáceas benignas (entre 91 y 98%). La cifra era menor en el carcinoma sebáceo (70% para la adipofilina y 73% para el factor XIIIa), por debajo de lo publicado en estudios previos (97 y 100% respectivamente). De acuerdo con la literatura, se detectó una alta especificidad (98%), tanto de la adipofilina como del factor XIIIa para excluir lesiones que simulaban el carcinoma sebáceo, como el carcinoma de células basales y el carcinoma de células escamosas. Por otro lado, GATA3 mostraba una alta sensibilidad en neoplasias sebáceas (97%), pero una especificidad muy baja (12%).⁸¹

5. ALTERACIONES MOLECULARES DE LOS TUMORES SEBÁCEOS

Se sabe poco sobre la patogenia de los tumores sebáceos. Una de las vías de carcinogénesis más estudiada en las neoplasias sebáceas es la inestabilidad de microsátélites, en parte debido a la asociación de estas neoplasias con el síndrome de Muir-Torre (SMT). Además de esta vías, existen otros mecanismos moleculares, menos conocidos, que contribuyen a su desarrollo.

5.1. Tumores sebáceos cutáneos en el síndrome de Muir-Torre

El síndrome de Muir-Torre fue descrito por Muir⁸² en 1967 y por Torre⁸³ en 1968. Se caracteriza por la asociación de neoplasias cutáneas (sebáceas,

queratoacantomasas o no) y neoplasias viscerales.³⁸ El diagnóstico se basa en la presencia de, al menos, una neoplasia sebácea y una neoplasia maligna visceral o, alternativamente, múltiples queratoacantomas asociados a neoplasias viscerales y antecedentes familiares de SMT.⁸⁴

La mayoría de los casos (SMT I) muestra un patrón de herencia autosómico dominante con alta penetrancia y expresión variable, aunque se han descrito casos esporádicos, generalmente en pacientes trasplantados.⁸⁵ Este tipo de SMT se desarrolla a una edad temprana y se asocia a una fuerte historia familiar de cáncer. Se considera una variante del síndrome de Lynch o síndrome de carcinoma colorrectal hereditario no asociado a poliposis. Se caracteriza por defectos en los genes de reparación de apareamientos incorrectos del ADN o MMR (del inglés *mismatch repair*). Los genes más relevantes son MSH2, MSH6, MLH1 y PMS2. Su función es detectar y reparar los errores que se producen durante la replicación del ADN, sobre todo en las regiones de los microsatélites; si este sistema no funciona, se produce una inestabilidad genómica que se denomina inestabilidad de microsatélites, que predispone al desarrollo de tumores.⁸⁶ La prevalencia de defectos en estas proteínas en neoplasias sebáceas no está tan bien caracterizado como en el carcinoma colorrectal. En la literatura, el patrón de deficiencia más frecuente en tumores sebáceos es la pérdida de MSH2/MSH6 (aproximadamente un 90%), seguido de MLH1/PMS2 (aproximadamente un 10%).⁸⁷ Recientemente se han notificado casos de deficiencia aislada de MSH6^{84,87-89} y casos raros de pérdida aislada de PMS2.^{87,90} Un estudio reciente muestra un menor porcentaje para el patrón de deficiencia MSH2/MSH6 (63%), mayor para MLH1/PMS2 (19%) y MSH6 (15%), y muy bajo para PMS2 (2,8%).⁸⁷ Las alteraciones se observan con más frecuencia en neoplasias sebáceas fuera del área de cabeza y cuello.^{87,91}

Alrededor de un 35% de los pacientes con SMT no muestran inestabilidad de microsatélites, constituyendo un segundo subtipo de este síndrome, denominado SMT II. En este subtipo se ha detectado inactivación bialélica en el gen MYH, un gen reparador por escisión de base, con una herencia autosómica recesiva.⁸⁵ En estos pacientes las neoplasias muestran un inicio más tardío y tienen una historia familiar menos pronunciada.⁸⁶

El SMT es más frecuente en varones que en mujeres, con un ratio 3:2. Las neoplasias aparecen en edades más tempranas que en la población general (53 años de media en el caso de los tumores sebáceos y 50 años de media en los viscerales) y se comportan de forma menos agresiva comparadas con su contrapartida esporádica.^{84,85,92} Las neoplasias sebáceas suelen aparecer fuera del área de la cabeza y el cuello, a diferencia de los tumores esporádicos, que son más frecuentes

en esta región.^{85,93} Se considera que las neoplasias sebáceas múltiples y los tumores sebáceos con cambios quísticos son altamente específicos de SMT.^{35,38,41,94} Sin embargo, se han publicado casos de tumores quísticos sebáceos clínicamente no asociados con SMT y casos de neoplasias quísticas con baja frecuencia de deficiencias en las proteínas MMR, por lo que se ha cuestionado esta asociación.⁹⁵ Otros tumores cutáneos que se desarrollan en el SMT son los queratoacantomas, que se producen hasta en el 20% de los pacientes con SMT, con o sin una neoplasia sebácea concurrente. Lesiones híbridas con características histológicas de queratoacantoma y de adenoma sebáceo se consideran altamente sugestivas de SMT.^{92,96}

No están claros los factores que predisponen al desarrollo de tumores en edades tempranas, pero la radiación ultravioleta, la radioterapia y la inmunosupresión se han relacionado con el SMT I.⁸⁵ El adenoma sebáceo se considera el marcador más específico de SMT, con una asociación que varía del 25 a 60%. La asociación es menor con el sebaceoma (27%) y con el carcinoma sebáceo (30%), aunque estudios recientes indican que puede ser mayor.^{85,96}

La neoplasia visceral más frecuente es el adenocarcinoma colorrectal, que suele aparecer proximal a la flexura esplénica, más que distal a ésta, como ocurre en los casos esporádicos. El SMT II parece predisponer al desarrollo de pólipos adenomatosos. Otros tumores relacionados son los del endometrio, ovario, intestino delgado, páncreas, tracto hepatobiliar, cerebro, tracto urotelial superior, mama y pulmón. Menos frecuentemente se han publicado casos de carcinoma neuroendocrino de célula pequeña de cérvix, leucemia mieloide aguda, sarcoma óseo primario, liposarcoma pleomórfico, histiocitoma fibroso maligno, rhabdomyosarcoma y linfomas B.^{85,92} Casi la mitad de los pacientes con SMT desarrollan dos o más tumores malignos viscerales.⁹²

El estudio de las alteraciones del mecanismo de reparación del ADN puede realizarse a tres niveles: a) estudiando los genes directamente, b) analizando la expresión de las proteínas codificadas o c) analizando los microsatélites, que son la diana final donde actúan las proteínas reparadoras. Como el análisis de mutaciones germinales es costoso, habitualmente se seleccionan los pacientes mediante el análisis de microsatélites y el análisis inmunohistoquímico.

Por inmunohistoquímica se puede realizar el estudio de proteínas de la vía MMR para determinar si existe pérdida de la expresión de alguna de ellas e identificar qué gen está probablemente alterado (Figura I.6). La pérdida de tinción tiene una sensibilidad de aproximadamente el 80% para SMT I.⁸⁸ En los casos de pérdida de tinción inmunohistoquímica no asociada con SMT, la inactivación de los genes de esta

vía puede ser causada por la hipermetilación del gen. Las mutaciones del gen BRAF o la pérdida de tinción inmunohistoquímica de p16 están asociadas con la inactivación de los genes MMR por hipermetilación del ADN. Por tanto, la presencia de mutación BRAF o pérdida de p16 no sugiere el diagnóstico de SMT, aunque haya pérdida de tinción de las proteínas MMR. Por otro lado, se ha observado que las mutaciones del gen KRAS podrían sugerir el diagnóstico de SMT.^{85,97,98}

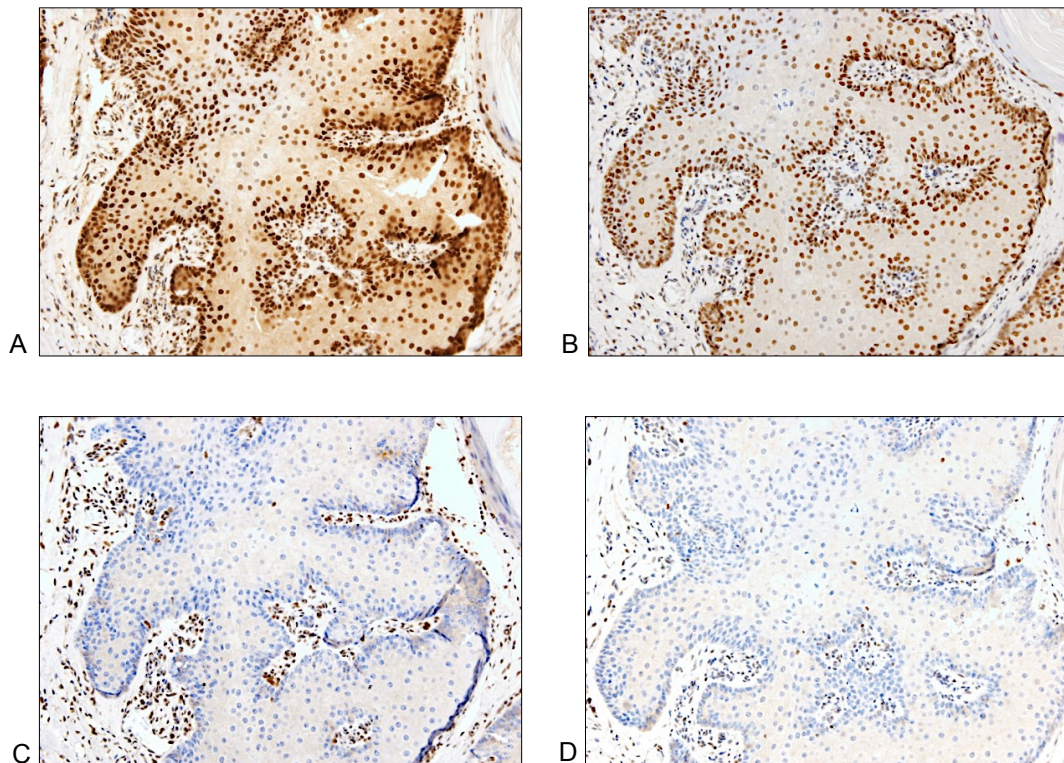


Figura I.6. Expresión inmunohistoquímica de las proteínas MMR en un adenoma sebáceo. A. Expresión nuclear conservada de MLH1 (200X). B. Expresión nuclear conservada de PMS2 (200X). C. Ausencia de expresión nuclear de MSH2 (200X). D. Ausencia de expresión nuclear de MSH6 (200X).

En los tumores con pérdida inmunohistoquímica de las proteínas MMR, se debería llevar a cabo un análisis de inestabilidad de microsatélites. Éste se realiza mediante PCR y consiste en estudiar un panel de 5 marcadores microsatélites (marcadores Bethesda) consistentes en 3 repeticiones dinucleótidas (D2S123, D5S346 y D17S250) y 2 repeticiones mononucleótidas (BAT25 y BAT26). La inestabilidad de microsatélites en 2 de los 5 marcadores indica una alta probabilidad de inestabilidad de microsatélites.^{84,85,96}

Como el SMT II se debe a inactivación bialélica del gen MYH no se puede detectar mediante el panel inmunohistoquímico ni con el análisis de inestabilidad de microsatélites, por lo que en los pacientes con una historia familiar de malignidad se debería realizar un estudio genético y seguimiento.^{36,85}

5.2. Otras alteraciones moleculares

A parte de la inestabilidad de microsatélites producida por mutaciones en los genes de las proteínas MMR, se han detectado otras alteraciones moleculares implicadas en el desarrollo de las neoplasias sebáceas.

Por un lado, se ha destacado la importancia de las vías de señalización Hedgehog y Wnt/beta-catenina en el desarrollo de los tumores sebáceos. La activación de la vía Wnt produce la translocación de beta-catenina al núcleo donde se une con el factor de transcripción LEF-1 y permite la transcripción genética. Se han encontrado mutaciones en LEF-1 que alteran su unión con beta-catenina dando como resultado la inhibición de la transcripción de los genes dependientes de esta vía y el desarrollo de tumores sebáceos cutáneos.^{17,18,99} La activación de ambas vías parece relacionada con un comportamiento más agresivo de los carcinomas sebáceos periorbitales metastásicos.¹⁰⁰ Un estudio sobre el perfil de expresión génica en el carcinoma sebáceo del párpado identificó alteraciones en las vías de señalización MAPK y JAK/STAT.¹⁰¹

La vía de p53 se ha estudiado como otro mecanismo en la patogénesis de los tumores sebáceos. La proteína p53, codificada por el gen TP53, induce apoptosis cuando se daña el ADN. La mutación de p53 es frecuente en los tumores cutáneos, como el carcinoma de células escamosas y el carcinoma de células basales, en los que está implicada la radiación ultravioleta (UV). Varios estudios han detectado mutación de TP53 en carcinomas sebáceos del párpado, entre el 50 y el 67% de los casos, pero sin presentar la mutación tándem típica inducida por daño de la luz UV.^{102,103} Este hallazgo plantea la posibilidad de que la desregulación de p53, como mecanismo de carcinogénesis sebácea, pueda ocurrir de forma independiente del daño por radiación UV. En otro estudio se encontró que p53 se sobreexpresaba con mayor frecuencia en tumores de la región periorbital ocurriendo casi exclusivamente en carcinomas sebáceos. Además, en todas las lesiones sebáceas con sobreexpresión de p53, las proteínas de reparación MMR estaban intactas, sugiriendo una vía molecular distinta a la de la inestabilidad de microsatélites en estos tumores.¹⁰⁴

Otros autores han destacado el papel que puede jugar HER2 en el desarrollo y la progresión del carcinoma sebáceo del párpado, además de sus potenciales implicaciones terapéuticas.^{105,106} HER2 es un receptor transmembrana con actividad tirosín-quinasa. Una vez activado HER2, desencadena distintas vías moleculares intracelulares diferentes que inhiben la apoptosis, promueven la proliferación celular, estimulan la neovascularización inducida por el tumor y activan la invasión y metástasis del carcinoma. Como se ha señalado antes, la alteración de la vía de la MAPK está implicada en el carcinoma sebáceo de los párpados.¹⁰¹ La principal vía

activada por HER2 es la vía RAS-RAF-MAPK. KRAS es el gen mutado más frecuentemente implicado en esta vía, y la mutación KRAS tiene un papel clave en la vía de señalización MAPK en neoplasias cutáneas. Estas consideraciones llevaron al estudio de las alteraciones en HER2 y KRAS en los carcinomas sebáceos del párpado, observándose que un 87,5% mostraban una alta expresión de la proteína HER2, dos tercios de los cuales presentaba amplificación del gen. No se observaron mutaciones en KRAS, de forma similar a estudios previos, por tanto, las alteraciones de KRAS pueden no estar involucradas en la patogénesis de los carcinomas sebáceos del párpado.¹⁰⁵

Dos publicaciones recientes^{107,108} han estudiado el perfil mutacional de las neoplasias sebáceas mediante la técnica de secuenciación masiva. En uno de estos trabajos se estudiaron neoplasias sebáceas circunscritas, tanto adenomas sebáceos como sebaceomas y carcinomas sebáceos. Se encontró que el gen mutado con más frecuencia era TP53, identificándose en todos los carcinomas estudiados. No se encontró correlación con la expresión inmunohistoquímica de p53. Las mutaciones más frecuentes después de TP53 fueron CDKN2A, EGFR, CTNNB1 y KRAS. Tampoco se encontró correlación entre un determinado gen, perfil mutacional o mutación individual y el diagnóstico histológico.¹⁰⁷

En otro de los trabajos¹⁰⁸ se estudiaron las mutaciones en carcinomas sebáceos perioculares y extraoculares. Se encontraron mutaciones en genes considerados susceptibles de tratamiento como NF1, IDH2, PDGFRB, TET2, PTEN, ERBB2, PIK3CA, AKT1 y BRAF, en carcinomas perioculares y en ALK, BTK, FGFR2, PTEN, PDGFRB, MET, TSC, ERBB2, PIK3CA, CHEK2, ABL2, HRAS, NF1 y ABL1, en carcinomas extraoculares. Las mutaciones más frecuentes ocurrían en TP53 y RB1, que se restringían a carcinomas perioculares, aunque no era estadísticamente significativo, y se correlacionaban con expresión aberrante de ambas proteínas.

Las mutaciones identificadas en los carcinomas sebáceos perioculares, PTEN, PIK3CA, ERBB2, NF1, AKT y BRAF, están implicadas en la activación de la vía PI3K.¹⁰⁸ Los micro ARN miR-486-5p y miR-1 que, específicamente regulan componentes de esta vía, también estaban incrementados en el carcinoma periorcular.¹⁰⁹ Estos datos sugerían que la activación de la vía PI3K es importante en la carcinogénesis de estos tumores perioculares y podría tener utilidad el manejo de estos pacientes con inhibidores PI3K, particularmente inhibidores mTOR. Se observó también una considerable heterogeneidad intertumoral entre tumores perioculares primarios y metastásicos.¹⁰⁸ Las mutaciones en TP53 se observaron exclusivamente en carcinomas sebáceos perioculares. Este hallazgo, junto con estudios previos que reportaban una elevada frecuencia de mutaciones en TP53 en carcinomas sebáceos

perioculares,^{102,103} sugería que el carcinoma sebáceo periocular surgiría a partir de vías dependientes de TP53.¹⁰⁸

Los tumores extraoculares mostraron también mutaciones relacionadas con la vía PI3K. Sin embargo, presentaban de manera específica mutaciones implicadas con las vías de reparación del ADN y del remodelamiento cromatínico (FANCA, WRN, ARID2, MLH1, MSH2, CHEK2, SMARCB1, SMARCA4 y MLL3). Además, la mayoría de los carcinomas sebáceos extraoculares mostraban un mayor número de mutaciones por lesión, defectos en la expresión de proteínas MMR y fenotipo de inestabilidad alta de microsatélites, con mutaciones adquiridas en MLH1 o MSH2 y pérdida de heterocigosidad en dos de los tres casos con este fenotipo. Por ello, el autor sugiere que estos tumores se desarrollarían a partir de defectos en los genes de reparación MMR.¹⁰⁸

La mutación en RB1 apoyaría la relación clínica observada entre pacientes con retinoblastoma y carcinoma sebáceo periocular.¹¹⁰

Otros autores¹¹¹ han estudiado la expresión de telomerasa en neoplasias sebáceas, una enzima que se encuentra activada en aproximadamente el 90% de los tumores.¹¹² Se estudió la expresión inmunohistoquímica de la transcriptasa reversa de la telomerasa (*TERT*), proteína que codifica la subunidad catalítica de la telomerasa, identificándose positividad nucleolar fuerte y uniforme de las células germinativas y de los sebocitos inmaduros en lesiones sebáceas hiperplásicas y neoplásicas. Se observó positividad en estructuras normales, menos intensa y más puntiforme que en las neoplasias. La tinción confirmaba el diagnóstico realizado en las preparaciones histológicas, pero no aportaba información adicional. Tampoco se observaron diferencias en los casos asociados con el síndrome de Muir-Torre.¹¹¹

Recientemente, se ha estudiado la presencia de mutaciones en el promotor del gen *TERT* en distintos tumores, como veremos más adelante. Se han identificado mutaciones en tumores cutáneos como melanoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma basocelular.¹¹³⁻¹¹⁵ Hasta la fecha sólo se ha realizado un estudio sobre dicha mutación en carcinomas sebáceos.¹¹⁶ Los autores estudiaron la presencia de mutación en el promotor de *TERT* en tumores cutáneos perioculares incluyendo carcinoma basocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células escamosas *in situ*, neoplasia intraepitelial conjuntival grado III y carcinoma sebáceo. La mutación se detectó en el 82% de los carcinomas basocelulares, en el 60% de los carcinomas de células escamosas invasivos, en el 50% de los carcinomas de células escamosas *in situ* y en el 44% de las neoplasias intraepiteliales conjuntivales grado III, sin embargo, no se encontró ninguna mutación en los carcinomas sebáceos. Por otro lado, la presencia frecuente de elastosis solar y de mutaciones características de luz

ultravioleta en los carcinomas basocelulares y escamosos del estudio ponía de manifiesto el papel de este factor en la patogénesis de estos tumores.¹¹⁵

6. PROMOTOR DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA DE LA TELOMERASA

6.1. Telómeros y telomerasa

Los telómeros son complejos nucleoprotéicos localizados en los extremos de los cromosomas eucariotas cuya función es mantener la estabilidad cromosómica. Durante la división celular, la ADN polimerasa no puede replicar los extremos más terminales de un cromosoma lineal (el denominado "problema del final de la replicación"). Esto significa que los cromosomas se acortan progresivamente durante divisiones celulares sucesivas, degradándose poco a poco a lo largo del tiempo. Por otro lado, si los extremos de los cromosomas lineales no están protegidos, corren el riesgo de ser interpretados como rupturas de ADN y desencadenar la respuesta celular al daño del ADN de doble cadena. Los telómeros mantienen la estabilidad del genoma protegiendo de la degradación las secuencias codificantes de las regiones terminales de los cromosomas y evitan la activación de la respuesta celular al daño del ADN de cadena doble.¹¹⁷⁻¹¹⁹

El ADN telomérico humano consiste en una región de 2-15 kb que contiene repeticiones en tándem de la secuencia TTAGGG y se localiza en los extremos de los cromosomas. Están constituidos por una secuencia de ADN de doble cadena y un extremo corto de cadena simple que sobresale en el extremo terminal 3', que es rico en guanosina. Existen además proteínas asociadas a los telómeros, destacando el complejo proteico denominado telosoma o shelterina. Este complejo está formado por las proteínas TRF1, TRF2, Rap1, TIN2, TPP1 y POT1 y protege a los cromosomas formando un bucle de ADN telomérico, estabilizando los extremos.¹¹⁸⁻¹²¹

La longitud telomérica está regulada por la telomerasa, que es una ADN polimerasa dependiente de ARN, cuya función enzimática es la de añadir secuencias teloméricas para mantener una longitud telomérica estable.¹¹⁷

La actividad telomerasa está silenciada en la mayoría de las células somáticas maduras, por lo que las repeticiones teloméricas se van perdiendo progresivamente con las divisiones celulares y los telómeros se vuelven cada vez más cortos manteniendo la integridad cromosómica y la estabilidad del genoma. La telomerasa se expresa durante el desarrollo embrionario, restringiéndose en el adulto a las células madre, órganos hematopoyéticos y las células reproductoras. En estas células los telómeros se pierden a un ritmo reducido.^{117,122}

Tras un número limitado de divisiones (límite de Hayflick) se alcanza una longitud telomérica crítica y se detiene el ciclo celular. Las vías supresoras tumorales de las proteínas p53 y del retinoblastoma (pRb) desencadenan la denominada senescencia replicativa. Este punto de control se conoce como etapa de mortalidad 1 (M1) y sirve para evitar la división celular incontrolada. Aunque las células en este estado permanecen metabólicamente activas, dejan de dividirse, previniendo una mayor pérdida de ADN, la inestabilidad genómica y la acumulación de mutaciones potencialmente oncogénicas.^{122,123}

Si una célula adquiere mutaciones somáticas que inhiben p53 o pRb, evita la senescencia y adquiere una ampliación del periodo replicativo en el que siguen acortándose los telómeros, hasta que alcanzan un segundo punto de control proliferativo llamado etapa de mortalidad 2 (M2) o "crisis" celular. Este punto se caracteriza por una inestabilidad genómica importante, ya que los telómeros son tan cortos que pierden la función protectora, produciéndose fusiones y roturas y, finalmente, la muerte celular.^{122,123}

Para sobrevivir, las células malignas deben escapar de los puntos de control M1 y M2 y activar un mecanismo para mantener o alargar sus telómeros con el fin de evitar la senescencia, logrando la inmortalidad replicativa. Esta capacidad puede lograrse por uno de los dos mecanismos de mantenimiento de telómeros: la acción de la enzima telomerasa o el alargamiento alternativo de los telómeros (ALT).¹²³

6.2. Telomerasa y *TERT*

La telomerasa es una ADN polimerasa dependiente de ARN que está constituida por una subunidad catalítica denominada transcriptasa reversa de la telomerasa (*TERT* del inglés *Telomeric End Reverse Transcriptase*) y un componente de ARN que la telomerasa utiliza como molde (*TERC* del inglés *Telomeric RNA Component*) para la extensión del telómero añadiendo repeticiones TTAGGG. A ellos se asocian una serie de proteínas adicionales necesarias para su funcionamiento: disquerina, ribonucleoproteína NOP10, ribonucleoproteína GAR1, ribonucleoproteína NHP2, reptina y pontina.^{124,125}

El gen de *TERT* se localiza en el cromosoma 5p15.33, consiste en 16 exones y 15 intrones y abarca más de 40 kb de longitud. La región promotora del gen constituye el elemento regulador más importante de la expresión de *TERT* y, en consecuencia, de la actividad telomerasa. El promotor de *TERT* está regulado por muchos factores de transcripción y vías de señalización.^{124,125}

El promotor carece de los elementos reguladores de la transcripción típicos, cajas TATA y CAAT, pero contiene secuencias de unión para varios activadores y

represores de la transcripción (E-boxes, GC-boxes, Ets y E2F). Los activadores transcripcionales dirigidos al promotor de *TERT* incluyen c-Myc, Sp1, Ets-1, factor nuclear de células T activadas, factor nuclear kappa B (NFκB), proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP, factor 1 inducible por hipoxia (HF-1) y STAT3; los represores transcripcionales son WT1, proteína MZF-2, p53, AP-1, AP-2, AP-4, menina, Smad3 y factor CCCTC.¹²⁴⁻¹²⁶

También se han identificado hormonas, citoquinas y oncogenes, que regulan la transcripción del promotor de *TERT*. La regulación hormonal de *TERT* más estudiada ha sido la relacionada con los estrógenos, observándose que producen activación de la transcripción. En cuanto a las citoquinas, se ha visto que EGF activa el promotor de *TERT*, mientras que TGFβ reprime la transcripción. Determinados oncogenes, como Her2/neu, RAS y RAF, activan la transcripción estimulando los factores de transcripción ETS (Figura I.7).^{112,116,118}

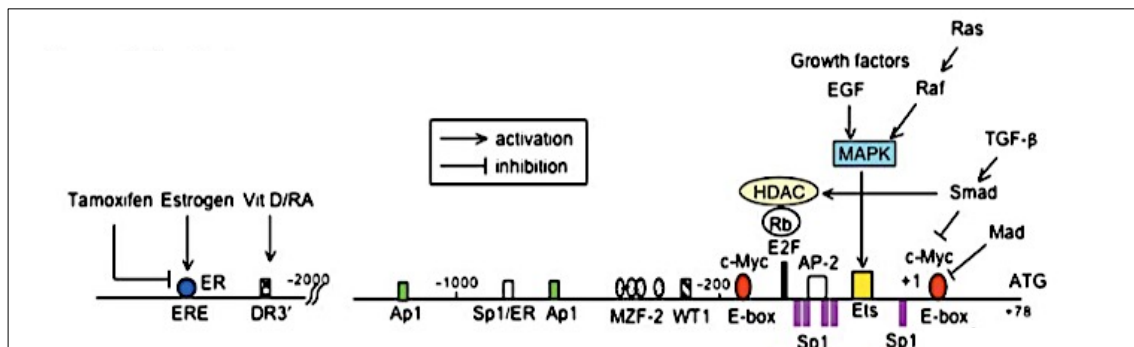


Figura I.7. Elementos reguladores del promotor de *TERT*. ERE: elemento de respuesta a estrógenos; DR3': secuencia similar a DR3'; AP-1: proteína activadora 1; ER/SP1: ER-Sp1 half-site; MZF-2: myeloid-specific zinc finger; WT1: Wilms tumour 1; ETS: E-twenty-six; E-Box: enhancer box; SP1: proteína de especificidad 1; HDAC: histona desacetilasa; Rb: retinoblastoma; AP-2: proteína activadora 2; EGF: factor de crecimiento epidérmico. (Modificado de Kyo S et al. *Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers*. *Cancer Sci*. 2008 Aug;99(8):1528-38).

En cuanto a las vías de señalización, se ha observado que la activación de la vía Wnt/b-catenina aumenta la expresión de *TERT*.¹²⁷

Las modificaciones epigenéticas en el ADN y las histonas también regulan la transcripción de *TERT*. El promotor de *TERT* contiene islas CpG, siendo susceptible a la regulación por cambios en el estado de metilación del ADN. La hipermetilación de los sitios CpG evita la interacción del factor de unión CCCTC con el promotor, lo que da como resultado la activación transcripcional. Además, la acetilación y la desacetilación de histonas pueden contribuir a la regulación de la expresión del ARNm

de *TERT*. Por último, la expresión de *TERT* también está regulada por los mecanismos de "splicing" del ARNm y los microARN.^{120,126}

6.3. Promotor de *TERT* y cáncer

En aproximadamente el 90% de los cánceres se observa reactivación de la actividad de la telomerasa. En el resto de tumores no se detecta actividad telomerasa y las células mantienen sus telómeros mediante un mecanismo de alargamiento alternativo (ALT) a través de recombinaciones cromosómicas.^{123,128}

Los altos niveles de actividad telomerasa detectados en las células cancerígenas contrastan con el hecho de que las mutaciones en la región codificante de la telomerasa parecen ser infrecuentes en el cáncer.¹²⁸

En 2013 dos estudios^{113,114} publicaron la presencia de mutaciones en la región promotora del *TERT* en el melanoma. En el caso del melanoma familiar, la mutación se detectó en la posición -57pb (chr5:1,295,161 A>C) del sitio de inicio de la transcripción.¹¹³ En el melanoma esporádico las mutaciones estaban localizadas en las posiciones -124pb (chr5:1,295,228 C>T) y -146pb (chr5:1,295,250 C>T), denominadas C228T y C250T respectivamente. Se detectaron con menos frecuencia mutaciones en las posiciones -138/-139pb (chr5:1,295,242 y chr5:1,295,243 CC>TT) y -124/-125pb (chr5:1,295,228 y chr5:1,295,229 CC>TT).^{113,114} Las mutaciones crean un lugar de unión *de novo* para el factor de transcripción de la familia ETS/TCF (CCGGAA/T), diferente del preexistente (GGAA/T), que incrementa la actividad transcripcional del gen *TERT*.^{128,129}

Estas mutaciones se han observado en otros tumores distintos del melanoma, como los del sistema nervioso central,¹³⁰⁻¹³² carcinoma de vejiga,^{133,134} carcinoma hepatocelular,^{135,136} fibroxantoma atípico,¹³⁷ sarcoma pleomórfico dérmico,¹³⁷ carcinoma de células basales^{115,138} y carcinoma de células escamosas de la piel,^{115,138} entre otros. Se ha visto que la presencia de estas mutaciones incrementa de 2 a 4 veces la expresión de la telomerasa.¹²⁸ En otros tumores no se han reportado mutaciones o son poco frecuentes, como por ejemplo en tumores hematopoyéticos,¹³² del estroma gastrointestinal¹³⁹ y de pulmón.^{140,141}

Un estudio reciente sobre mutaciones del promotor de *TERT*, en 60 tipos de tumores diferentes dividió los tumores en aquéllos con baja frecuencia de mutaciones (<15%) y con alta frecuencia (>15%).¹³² Según esta prevalencia, se formuló la hipótesis de que las mutaciones del promotor de *TERT* ocurren principalmente en tumores que derivan de tejidos con tasas bajas de autorrenovación.

Las dos mutaciones principales identificadas son la C228T y la C250T, que son mutuamente excluyentes. En la mayoría de los tumores la frecuencia de la C228T es

mayor que la de C250T. Sin embargo, en los tumores cutáneos ambas mutaciones tienen una frecuencia similar o es más frecuente la C250T que la C228T.¹²⁵ Otras mutaciones menos frecuentes son la -124C>A y la -138/-139CC>>TT.^{115,142,143} La mutación -57C>A, descrita en el melanoma familiar, también se ha detectado como mutación somática en algún caso.^{113,143} En los tumores cutáneos, además, son características las mutaciones en tándem CC>TT en las posiciones -124/-125pb y -138/-139pb, que ocurren en un 10% de los casos, sugiriendo la etiología de la radiación ultravioleta.^{125,142,143} Parece, además, que las mutaciones en el promotor de *TERT* son más frecuentes en tumores de zonas expuestas al sol que en los originados en zonas no expuestas.^{142,143}

La mutación en el promotor de *TERT* se ha asociado con distintas variables clínico-patológicas y, en muchos tumores, se relaciona con formas adversas de la enfermedad.^{125,144} Por ejemplo, en el melanoma se ha asociado a estadios avanzados, pacientes de mayor edad y marcadores de mal pronóstico, como el aumento del grosor de Breslow, la ulceración y la tasa mitótica.^{143,144} Además, la mutación tiende a ocurrir junto con mutaciones de BRAF y alteraciones en CDKN2A.¹⁴³ También se ha observado una reducción de la supervivencia libre de enfermedad y peor evolución, especialmente si se asocia a mutaciones de BRAF/NRAS en tumores primarios.^{144,145} En pacientes con tumores del sistema nervioso central, parece que las mutaciones del promotor de *TERT* influyen en el resultado clínico, ya que se ha asociado con la progresión del tumor y una peor supervivencia.¹⁴⁶ Las mutaciones en el promotor de *TERT* e IDH y la delección de 1p19q ha permitido establecer grupos con distinta tasa de supervivencia.^{147,148} En el carcinoma urotelial de vejiga, la mutación del promotor de *TERT* es de limitado valor pronóstico debido a que la frecuencia de mutaciones es similar en tumores en diferentes estadios o grados.^{149,150} Se ha observado que, en tumores no invasivos, la mutación de FGFR3 tiende a coexistir junto con las mutaciones del promotor de *TERT*.¹³⁴

Por último, cabe señalar que las mutaciones del promotor de *TERT* son características de tumores de los adultos, siendo, en general, raras en tumores pediátricos y de adultos jóvenes.¹²⁵ Así, en el hepatoblastoma, en los gliomas y tumores tiroideos pediátricos y en el meduloblastoma, no se han detectado mutaciones en el promotor de *TERT* o son menos frecuentes que en los correspondientes tumores de los adultos.^{132,146,151}

Como se ha comentado anteriormente, sólo se ha publicado un estudio sobre mutaciones del promotor de *TERT* en carcinoma sebáceo cutáneo.¹¹⁶ Mediante secuenciación Sanger se analizó la presencia de mutaciones en el promotor de *TERT*

en 20 carcinomas sebáceos perioculares, no identificándose ninguna mutación en los casos estudiados.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

El proceso diagnóstico de las neoplasias de las glándulas sebáceas puede presentar dificultades derivadas, por un lado, de su rareza y por otro, de la determinación de la diferenciación sebácea. La baja frecuencia de estas entidades conlleva un pobre conocimiento de su patogénesis y una baja sospecha diagnóstica. En cuanto a la diferenciación sebácea, la morfología puede no ser clara en el estudio microscópico básico e incluso, siendo clara, puede ser difícil determinar la naturaleza benigna o maligna de la misma, como demuestran los estudios de variabilidad diagnóstica interobservador. En lo referente a las técnicas inmunohistoquímicas, además de que pueden ser difíciles de interpretar, no son totalmente específicas de estas entidades.

Dado el comportamiento agresivo que pueden mostrar los carcinomas sebáceos, es fundamental un diagnóstico precoz y un tratamiento adecuado. Por ello, es necesario ampliar el conocimiento sobre estos tumores lo que, además de facilitar el proceso diagnóstico, mejorará el manejo clínico de los pacientes. En este sentido, las técnicas de biología molecular pueden ser de gran ayuda para conocer el perfil mutacional de estas neoplasias, pudiendo constituir un criterio diagnóstico adicional. Además, la investigación podría traducirse en la aplicación de terapias dirigidas contra dianas moleculares específicas asociadas a estas neoplasias.

Las mutaciones en el promotor del gen de la transcriptasa reversa de la telomerasa (*TERT*) han sido poco estudiadas en tumores sebáceos y podrían constituir una herramienta diagnóstica útil, pronóstica y terapéutica. Por este motivo, el presente trabajo pretende profundizar en la comprensión de las alteraciones genéticas de estas lesiones a través del estudio de dichas mutaciones.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es identificar mutaciones en el promotor de *TERT* en neoplasias sebáceas benignas (adenomas sebáceos y sebaceomas) y malignas (carcinomas sebáceos) y correlacionar los resultados con el tipo de tumor sebáceo, las características clínicas de los pacientes y las características histológicas

de las lesiones, determinando si su presencia se asocia con el diagnóstico de malignidad y una peor evolución de los mismos.

Como objetivos específicos se establecen los que se detallan a continuación:

1.- Analizar y comparar la presencia de mutaciones en el promotor de *TERT* en adenomas sebáceos, sebaceomas y carcinomas sebáceos.

2.- Establecer si existen diferencias significativas entre la presencia de mutaciones en tumores sebáceos benignos (adenomas sebáceos y sebaceomas) y malignos (carcinomas sebáceos), de forma que su existencia apoye un diagnóstico de malignidad.

3.- Definir si la presencia de mutaciones en el promotor de *TERT* se asocia con diferencias clínicas e histológicas significativas respecto a los pacientes que no las presentan.

4.- Determinar la presencia de otras mutaciones en carcinomas sebáceos mediante secuenciación masiva, con el fin de ampliar el conocimiento de las bases moleculares de estos tumores.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE CASOS

Se recopilaron de forma retrospectiva un total de 91 muestras pertenecientes a 91 pacientes diagnosticados de tumores sebáceos entre los años 2006 y 2016. Las muestras procedían de los Servicios de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre, del Hospital Universitario Ramón y Cajal, de la Fundación Jiménez Díaz, del Hospital Universitario de Salamanca (IBSAL) y del Centro de Dermatopatología Friedichshafen (Alemania). En concreto se estudiaron 62 tumores sebáceos benignos (17 adenomas sebáceos y 45 sebaceomas) y 29 malignos (carcinomas sebáceos). El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Una vez seleccionados los pacientes, se revisaron las historias clínicas para recoger los datos clínicos y su evolución. De los 91 pacientes se obtuvieron datos clínicos de 64 de ellos, aunque no de forma completa en todos los casos.

2. MUESTRAS TISULARES

Todas las muestras del estudio estaban fijadas en formaldehído tamponado al 4% e incluidas en parafina. En todos los casos se disponía de una laminilla con varios cortes representativos del tumor teñidos con hematoxilina-eosina. Todas las preparaciones fueron revisadas histopatológicamente para confirmar el diagnóstico de adenoma sebáceo, sebaceoma y carcinoma sebáceo. Sólo se incluyeron aquéllos casos en los que el bloque tumoral mostraba un porcentaje de células tumorales superior al 10%. Con el microscopio óptico se identificaron las lesiones y se señalaron con un rotulador para realizar la macrodissección, evitando áreas con necrosis, inflamación y piel normal adyacente.

3. VARIABLES A ESTUDIO

3.1. Variables clínicas

De los pacientes de los que se disponía de información clínica se recogieron las siguientes variables: hospital de origen, número de historia clínica, número de

biopsia, sexo, edad en el momento del diagnóstico, diagnóstico clínico, localización de la lesión, recidiva, metástasis, desarrollo de tumores viscerales y status (vivo o fallecido).

3.2. Variables histopatológicas

Para el estudio histopatológico se estudiaron secciones del tumor teñidas con hematoxilina-eosina. Se reevaluaron todos los tumores para confirmar o, en su caso, reclasificar el tumor.

En los carcinomas sebáceos se determinó también el tamaño, el grado de diferenciación, el patrón de crecimiento, la variante histológica, la presencia de elastosis solar, de extensión pagetoide y de invasión linfática, vascular o perineural, así como el estadio TNM.

4. INMUNOHISTOQUÍMICA

Se realizaron técnicas de inmunohistoquímica para evaluar la expresión de proteínas reparadoras de apareamientos incorrectos del ADN o proteínas MMR en las neoplasias sebáceas. Se estudiaron las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2. En un caso se realizó estudio para CD31, con el fin de confirmar la presencia de invasión vascular. En otro caso, para comprobar una mutación del gen BRAF obtenida mediante secuenciación masiva en un porcentaje en torno al 10%, se estudió la expresión inmunohistoquímica VE1 de BRAF.

Se obtuvieron secciones de 4 μm de espesor a partir de los bloques tisulares de parafina. Las secciones se montaron en portaobjetos de vidrio cargados o xilanizados. La técnica se realizó con el sistema Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems) en el inmunoteñidor automático Bond IIITM (Leica Biosystems) que consta de los pasos que se detallan a continuación. Primero se desparafinaron y se rehidrataron las muestras y, posteriormente, se realizó el desenmascaramiento con tampón citrato a pH y con los tiempos indicados en la tabla III.1. A continuación, los portaobjetos se trataron con peróxido de hidrógeno al 0,3%, diluido en metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente para anular la actividad de la peroxidasa endógena. Después se incubaron con suero no inmune al 10% durante 10 minutos para bloquear la unión no específica al anticuerpo y, posteriormente, con los anticuerpos anti-MLH1, anti-MSH2, anti-MSH6, anti-PMS2 anti-CD31 y anti-BRAF durante 20 minutos, seguido del polímero durante otros 20 minutos. Luego se incubaron con sustrato cromógeno tetracloruro de diaminobenzamina durante 9

minutos y se realizó una contratinción con hematoxilina durante 1 minuto. Finalmente, se deshidrataron y se procedió al montaje en los portaobjetos con un cubreobjetos. En la tabla III.1 se detallan las características de los anticuerpos.

Se considera que el tumor conserva la expresión de las proteínas MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2 si se observa tinción nuclear en las células tumorales. Se considera que hay pérdida de expresión en ausencia de dicha tinción, con la presencia de un control interno positivo como la epidermis normal, las células del estroma o los linfocitos. Se determina como no valorable si la ausencia de expresión no se acompaña de un control interno positivo. El anticuerpo anti-CD31 se valoró analizando la presencia de tinción en la membrana de las células endoteliales de los vasos. El anticuerpo anti-BRAF se considera positivo y, por tanto, mutado, si se detecta tinción citoplasmática en las células tumorales y negativo en ausencia de tinción.

Tabla III.1 Características de los anticuerpos empleados en el estudio inmunohistoquímico

Anticuerpo	Clon	Dilución	Casa comercial	Desenmascaramiento
MLH1	G168-15	1/100	Biocare	pH 9 durante 30 minutos
MSH2	FE11	1/50	Biocare	pH 9 durante 30 minutos
MSH6	44	1/50	Biocare	pH 9 durante 30 minutos
PMS2	A16-4	1/50	Biocare	pH 9 durante 30 minutos
CD31	JC70C	1/20	Dako	pH 6 durante 20 minutos
BRAF	VE1	1/100	Spring	pH 9 durante 30 minutos

5. TÉCNICAS MOLECULARES

5.1. Extracción de ADN

Una vez seleccionado el bloque para cada tumor, se realizó la macrodissección del mismo obteniéndose de 5 a 10 secciones de 5 µm de espesor.

El ADN genómico se extrajo utilizando el kit de Genómica (Genómica S.A.U., Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. El tejido se desparafinó con xileno y etanol. Posteriormente, las muestras se incubaron a 56°C con buffer de lisis y proteinasa K toda la noche. Al día siguiente se inactivó la digestión a 70°C durante 10 minutos y se purificaron con columnas mediante centrifugación. La concentración y pureza del ADN fueron determinadas mediante el espectrofotómetro NanoDrop™ ND-2000 UV-Vis (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA) y el fluorímetro Invitrogen™ Qubit™ 3 (ThermoFisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Las

muestran se conservaron a -20°C.

5.2. Pirosecuenciación

La pirosecuenciación fue una de las técnicas empleadas para estudiar la presencia de mutaciones del promotor de *TERT*. Como se ha descrito anteriormente, las mutaciones más frecuentes en dicho promotor son la C228T y C250T, que se encuentran a -124 y -146 pb del inicio de la traducción, respectivamente. También se incluyó la mutación C242T, menos frecuente, que se encuentra a -137 pb del inicio de la traducción.

Se utilizaron los siguientes cebadores para amplificar un fragmento de 110 pb que contenía las posiciones de las mutaciones mencionadas: 5'-CCCTTCACCTTCCAGCTCC-3' (forward) y 5'-AAAGGAAGGGGAGGGGCTG-3' (reverse, 5' biotinilado). La PCR se llevó a cabo utilizando el termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) con una desnaturalización inicial a 95°C durante 15 minutos, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, hibridación a 60°C durante 30 segundos, extensión a 72°C durante 30 segundos y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

El cebador para la pirosecuenciación (5'-ACCCCGCCCCGTCCCGACCCC-3') fue diseñado desde la mutación C250T, a -146 pb del inicio de la traducción, en dirección 3' de modo que se pudieran analizar las tres posibles mutaciones en el mismo ensayo. La pirosecuenciación se llevó a cabo en el pirosecuenciador PyroMark Q24 (Qiagen) utilizando el reactivo PyroMark Gold Q24 (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se añadió Q-solution para mejorar el rendimiento de la amplificación. Los resultados fueron analizados con el software PyroMark Q24 2.0.6 Build 20 (Qiagen).

5.3. Secuenciación Sanger.

La secuenciación Sanger se realizó para confirmar los resultados de la pirosecuenciación utilizando el mismo par de cebadores y las mismas condiciones de PCR. La calidad de los productos de la PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% antes de la secuenciación. Los productos de la PCR se purificaron con el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) y después se utilizaron como moldes para la secuenciación.

Se empleó el kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) para realizar la secuenciación. Los productos obtenidos se purificaron con el kit Applied BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Thermo Fisher

Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las muestras se cargaron en el secuenciador Applied Biosystems™ 3130 XL (Thermo Fisher Scientific) y los resultados se analizaron con el software Chromas 2.5.1 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane QLD 4101, Australia).

5.4. Secuenciación masiva o *Next Generation Sequencing* (NGS)

Se empleó un panel para secuenciación masiva (NGS) constituido por 14 genes previamente relacionados con cáncer (IDH1, EGFR, H3F3A, ACVR1, PDGFRA, p*TERT*, HIST1H3B, HIST1H3C, BRAF, CDKN2A, PTEN, IDH2, TP53 y ATRX), utilizando el software Ion AmpliSeq™ Designer (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). El diseño permitió analizar la secuencia codificante de los genes incluidos en el panel más 5 pb de la unión exón-intrón en cada gen y los *hotspots*.

La construcción de la librería y la cuantificación se realizó utilizando el kit Ion AmpliSeq™ Library Kit v2.0 y el kit Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific), respectivamente. Las librerías se multiplexaron, y la PCR de emulsión y la carga del chip se realizó en el Ion Torrent CHEF (Thermo Fisher Scientific), según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las muestras se secuenciaron con una cobertura media de 1000X en el secuenciador S5 (Thermo Fisher Scientific).

Se empleó el programa Ion Torrent Suite v.4.2, (Thermo Fisher Scientific) para realizar el alineamiento de las secuencias leídas con el genoma de referencia hg19 e identificar todas las variantes presentes en las muestras analizadas.

Tras el alineamiento, se filtraron las variantes para excluir aquellas con: 1) menos de 30 lecturas; 2) una frecuencia alélica < 10%; 3) una localización fuera de la región exónica o de las regiones de splicing; 4) variantes sinónimas; 5) variantes presentes en la población con una frecuencia del alelo menos común > 1% de acuerdo con el Proyecto 1000 Genomas (dbSNP build id 138). Las restantes variantes se visualizaron utilizando el visor Integrative Genomic Viewer (IGV, Broad Institute), se revisaron manualmente y se seleccionaron para excluir errores de secuenciación sistemáticos.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se recopilaron en una base de datos en Excel (Microsoft Office) y se realizó el análisis estadístico empleando el software estadístico R (versión 3.4.4. Grupo CRAN).¹⁵²

En el análisis descriptivo las variables categóricas se presentaron como frecuencias absolutas y relativas. Las variables cuantitativas continuas con distribución normal fueron expresadas como media \pm desviación estándar y las continuas sin distribución normal como mediana y rango intercuartílico.

Para el análisis univariante, los datos cualitativos fueron analizados con el test chi-cuadrado. Las inferencias para las variables continuas fueron estimadas aplicando el test de la t de Student o test de Wilcoxon-Mann-Whitney, dependiendo de su distribución. En todos los contrastes empleados se consideraron que las diferencias eran estadísticamente significativas cuando la p-valor era menor de 0,05. Cuando se encontraron diferencias estadísticamente significativas en variables con más de dos categorías, al realizar las comparaciones dos a dos, se aportó p-valor ajustado por Bonferroni.

Así mismo, se analizó el grado de acuerdo entre las tres técnicas empleadas en el estudio (pirosecuenciación, secuenciación Sanger y NGS) calculando el índice kappa de Fleiss junto con el intervalo de confianza al 95%.

IV. RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES CON NEOPLASIAS SEBÁCEAS

De los 91 tumores sebáceos estudiados se dispone de datos clínicos, aunque no siempre completos, de 64 pacientes, correspondientes a 40 lesiones benignas (15 adenomas sebáceos y 25 sebaceomas) y 24 malignas (carcinomas sebáceos).

1.1 Sexo

En la serie de pacientes del estudio, el 52,4% (33 de 63) son hombres y el 47,6% (30 de 63), mujeres. Por grupos de tumores, las neoplasias benignas son más frecuentes en hombres, 60% (24 de 40), que en mujeres, 40% (16 de 40). Lo contrario ocurre en los tumores malignos, en los que el 60,9% (14 de 23) ocurre en mujeres, mientras que el 39,1% (9 de 23) aparece en hombres (Tabla IV.1).

Tabla. IV.1. Distribución de las neoplasias sebáceas benignas y malignas por sexo

	Tumores benignos N (%)	Tumores malignos N (%)	Total N (%)
Hombre	24 (60)	9 (39,1)	33 (52,4)
Mujer	16 (40)	14 (60,9)	30 (47,6)
Total	40 (100)	23 (100)	63 (100)

Dentro del grupo de los tumores sebáceos benignos, los adenomas sebáceos se diagnosticaron con más frecuencia en hombres, 80% (12 de 15), que en mujeres, 20% (3 de 15), mientras que los sebaceomas mostraron una frecuencia similar en ambos grupos, 48% (12 de 25) en hombres y 52% (13 de 25) en mujeres (Figura IV.1).

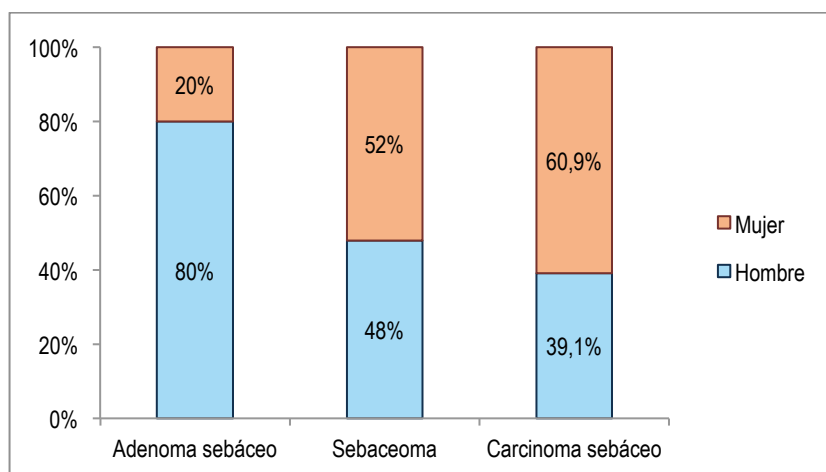


Figura. IV.1. Distribución de los adenomas sebáceos, sebaceomas y carcinomas sebáceos por sexo.

1.2. Edad

La edad de los pacientes en el momento del diagnóstico se encuentra entre los 33 y los 95 años, con una media de 73 años y una mediana de 77. En los tumores benignos, la media de edad es de 71 años, siendo menor en los adenomas sebáceos (69 años) que en los sebaceomas (72 años). En los carcinomas sebáceos la media es de 75 años y la mediana de 80 (Tabla IV.2).

Tabla IV.2. Edad en el momento del diagnóstico

	Rango de edad (años)	Edad media \pm DS (años)	Edad mediana (años)
Benignos (N=40)	42-90	71 \pm 14	74
Adenoma sebáceo (N=15)	42-90	69 \pm 16	74
Sebaceoma (N=25)	44-88	72 \pm 12	75
Malignos (N=24) Carcinoma sebáceo (N=24)	33-95	75 \pm 16	80
Total (N=64)	33-95	73 \pm 15	77

1.3. Localización

En conjunto, las lesiones se localizan preferentemente en el área de cabeza y cuello, donde suponen el 90,9% (50 de 55) de las mismas. Por grupos de tumores, en esta región se sitúan el 84,6% (11 de 13) de los adenomas sebáceos, el 94,7% (18 de 19) de los sebaceomas y el 91,3% (21 de 23) de los carcinomas sebáceos. Sólo el 9,1% (5 de 55) de los tumores se encuentran fuera de esta zona (Tabla IV.3).

Tabla IV.3. Localización de las neoplasias sebáceas

	Adenoma sebáceo N (%)	Sebaceoma N (%)	Carcinoma sebáceo N (%)	Total N (%)
Cabeza y cuello	11 (84,6)	18 (94,7)	21 (91,3)	50 (90,9)
Otra localización	2 (15,4)	1 (5,3)	2 (8,7)	5 (9,1)
Total	13 (100)	19 (100)	23 (100)	55 (100)

En el grupo de tumores benignos destaca la zona extraocular de cabeza y cuello, 69,2% (9 de 13) de los adenomas y 84,2% (16 de 19) de los sebaceomas, frente a la periocular, 15,4% (2 de 13) de los adenomas y 10,5% (2 de 19) de los sebaceomas. Lo mismo ocurre en los carcinomas sebáceos, en los que un 56,5% (13

de 23) de localiza en áreas extraoculares de cabeza y cuello y un 34,8% (8 de 23), en la región periocular y (Tabla IV.4).

Tabla IV.4. Localización desglosada de las neoplasias sebáceas

		Adenoma sebáceo	Sebaceoma	Carcinoma sebáceo	Total
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
Periocular		2 (15,4)	2 (10,5)	8 (34,8)	12 (21,8)
Extraocular	Cabeza y cuello	9 (69,2)	16 (84,2)	13 (56,5)	38 (69,1)
Extraocular	Otra localización	2 (15,4)	1 (5,3)	2 (8,7)	5 (9,1)
Total		13 (100)	19 (100)	23 (100)	55 (100)

1.4. Inmunosupresión

Dos de los 64 pacientes (3,1%) son trasplantados renales, en tratamiento con prednisona y tacrolimus. Uno de ellos desarrolló un adenoma sebáceo y el otro, un sebaceoma. Otro paciente del estudio (1,6%) es VIH positivo y se le diagnosticó un adenoma sebáceo.

1.5. Neoplasias viscerales

El 29,6% (16 de 54) de los pacientes desarrollaron neoplasias viscerales. Por grupos de tumores fueron el 35,7% (5 de 14) de los pacientes con adenoma sebáceo, el 28,6% (6 de 21) de los pacientes con sebaceoma y el 26,3% (5 de 19) con carcinoma sebáceo. Dos pacientes estaban diagnosticados de síndrome de Muir-Torre, uno de ellos con un adenoma sebáceo localizado en la espalda y el otro con un sebaceoma en el hombro; ambos desarrollaron un adenocarcinoma colorrectal (Tabla IV.5).

Tabla IV.5. Neoplasias viscerales

Neoplasia sebácea	Paciente	Neoplasia visceral	S. Muir-Torre
Carcinoma sebáceo	Paciente 2	Adenocarcinoma colorrectal	No
	Paciente 9	Adenocarcinoma colorrectal	No
	Paciente 10	Carcinoma urotelial	No
	Paciente 12	Adenocarcinoma gástrico	No
	Paciente 28	Adenocarcinoma colorrectal	No
Adenoma sebáceo	Paciente 31	Adenocarcinoma colorrectal y carcinoma urotelial	No
	Paciente 35	Adenocarcinoma colorrectal	No
	Paciente 38	Adenocarcinoma colorrectal	Sí
	Paciente 42	Adenocarcinoma colorrectal y adenocarcinoma de próstata	No
	Paciente 43	Linfoma no Hodgkin	No

	Paciente 54	Carcinoma de pulmón	No
	Paciente 55	Carcinoma urotelial	No
Sebaceoma	Paciente 56	Carcinoma de laringe	No
	Paciente 63	Adenocarcinoma colorrectal	No
	Paciente 64	Adenocarcinoma colorrectal	Sí
	Paciente 65	Linfoma MALT gástrico y GIST gástrico	No

MALT: *Mucosa-associated lymphoid tissue* (tejido linfocitoide asociado a las mucosas); GIST: *gastrointestinal stromal tumor* (tumor del estroma gastrointestinal).

De las 19 neoplasias, la más frecuente fue el adenocarcinoma colorrectal, 47,4% (9 de 19), seguida del carcinoma urotelial, 15,8% (3 de 19). Otros tumores que desarrollaron los pacientes fueron adenocarcinoma gástrico, carcinoma epidermoide de laringe, carcinoma epidermoide de pulmón, linfoma no Hodgkin, tumor del estroma gastrointestinal gástrico y linfoma MALT gástrico, en un 5,2% (1 de 19) cada uno (Figura IV.2).

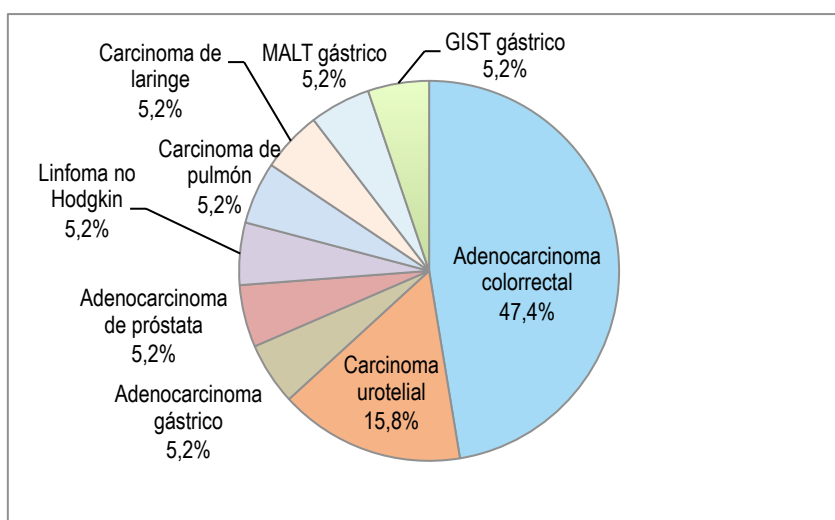


Figura IV.2. Frecuencia de las neoplasias viscerales. (MALT: *Mucosa-associated lymphoid tissue* (tejido linfocitoide asociado a las mucosas); GIST: *gastrointestinal stromal tumor* (tumor del estroma gastrointestinal)).

1.6. Recidiva, metástasis y supervivencia

En el grupo de los sebaceomas, un paciente de 21 (4,8%) presentó recidiva local de la lesión. Respecto a los pacientes con carcinoma sebáceo, ninguno desarrolló metástasis en ganglios linfáticos ni a distancia y sólo un paciente de 17 (5,9%) sufrió recidiva local del tumor. Así mismo, en el grupo de los carcinomas, 5 pacientes de 11 (45,5%) con evolución conocida fallecieron, pero ninguna muerte estuvo relacionada con dicha neoplasia.

2. CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE LAS NEOPLASIAS SEBÁCEAS

2.1. Adenomas sebáceos

Los 17 adenomas sebáceos de la serie se caracterizan histológicamente por ser tumores bien circunscritos, que recuerdan a la glándula sebácea normal. Están formados por lóbulos de sebocitos maduros e inmaduros con más de dos hileras de células germinativas periféricas, que suponen menos del 50% del tumor. Las células no tienen atipia y las figuras mitóticas son raras (Figura IV.3).

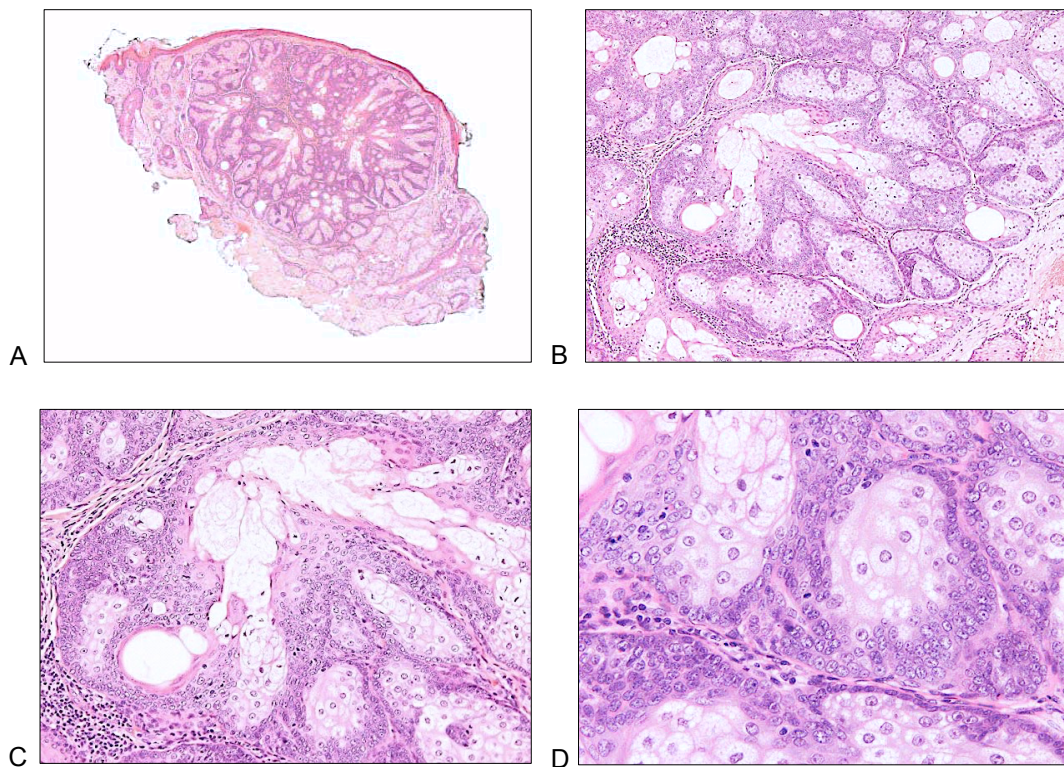


Figura IV.3. Adenoma sebáceo. A y B. Neoplasia constituida por lóbulos bien circunscritos que recuerdan a la glándula sebácea normal (A: 20X y B: 100X, HE). C y D. Se observan sebocitos y células germinativas sin atipia (C: 200X y D: 400X, HE).

2.2. Sebaceomas

Los 45 sebaceomas incluidos en el estudio muestran contornos bien circunscritos y una arquitectura lobular. Están constituidos predominantemente por células basaloides, que suponen más del 50% del tumor, entremezcladas con sebocitos de aspecto maduro e inmaduro. La actividad mitótica es variable, pero la atipia citológica generalmente es leve y no hay necrosis (Figura IV.4).

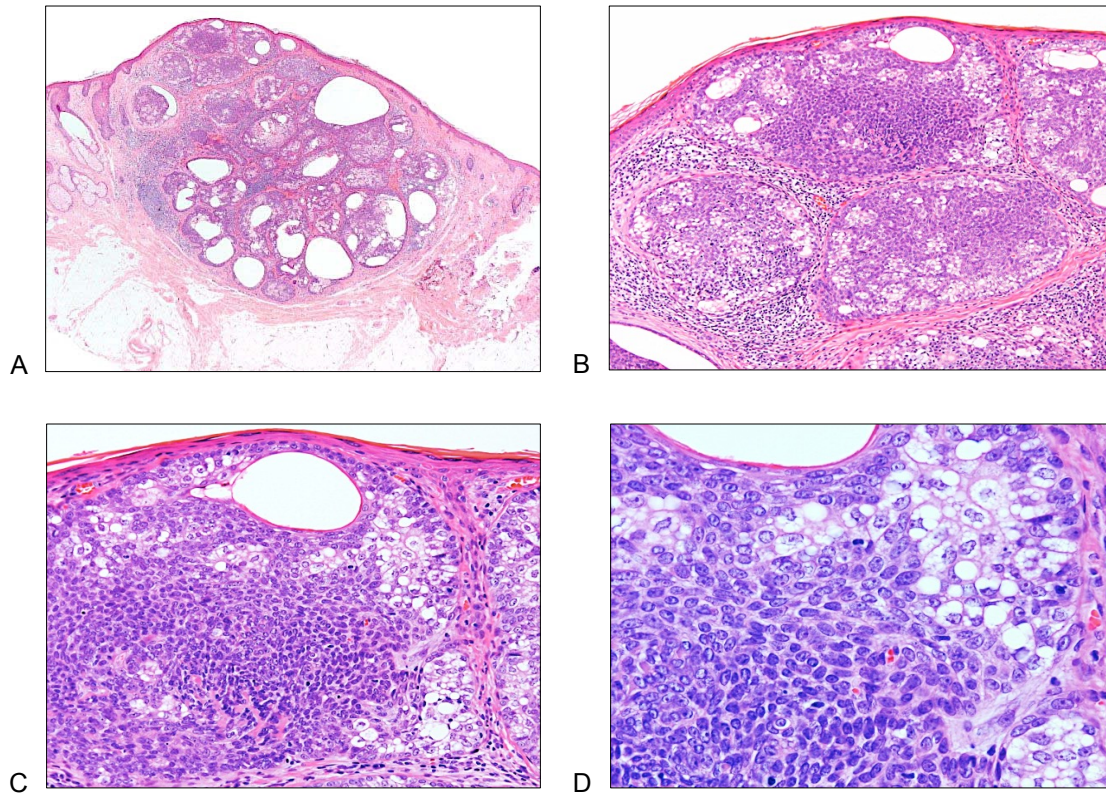


Figura IV.4. Sebaceoma. A y B. Neoplasia constituida por l6bulos bien circunscritos (A: 20X y B: 100X, HE). C y D. Predominio de las c6lulas basaloides sobre los sebocitos (C: 200X y D: 400X, HE).

2.3. Carcinomas seb6ceos

Los 29 carcinomas seb6ceos del estudio se caracterizan por presentar atipia citol6gica y numerosas mitosis, con una arquitectura bien circunscrita, infiltrante o una mezcla de ambas (Figura IV.5).

En cuanto al tama1o de los carcinomas seb6ceos, se ha observado un peor pron6stico para aqu6llos mayores de 10 mm.⁴⁵ Considerando este punto de corte, en nuestra serie, el 37,9% (11 de 29) muestran un tama1o superior a 10 mm. Ninguno de los pacientes present6 recidiva de la lesi6n.

Respecto al grado de diferenciaci6n, el 75,9% (22 de 29) de los carcinomas seb6ceos son bien diferenciados y el 24,1% (7 de 29), mal diferenciados. En cuanto a la variante microsc6pica, el 48,3% (14 de 29) se clasificaron como basaloides, el 48,3% (14 de 29) como escamoides y el 3,4% (1 de 29) como pseudoneuroendocrino.

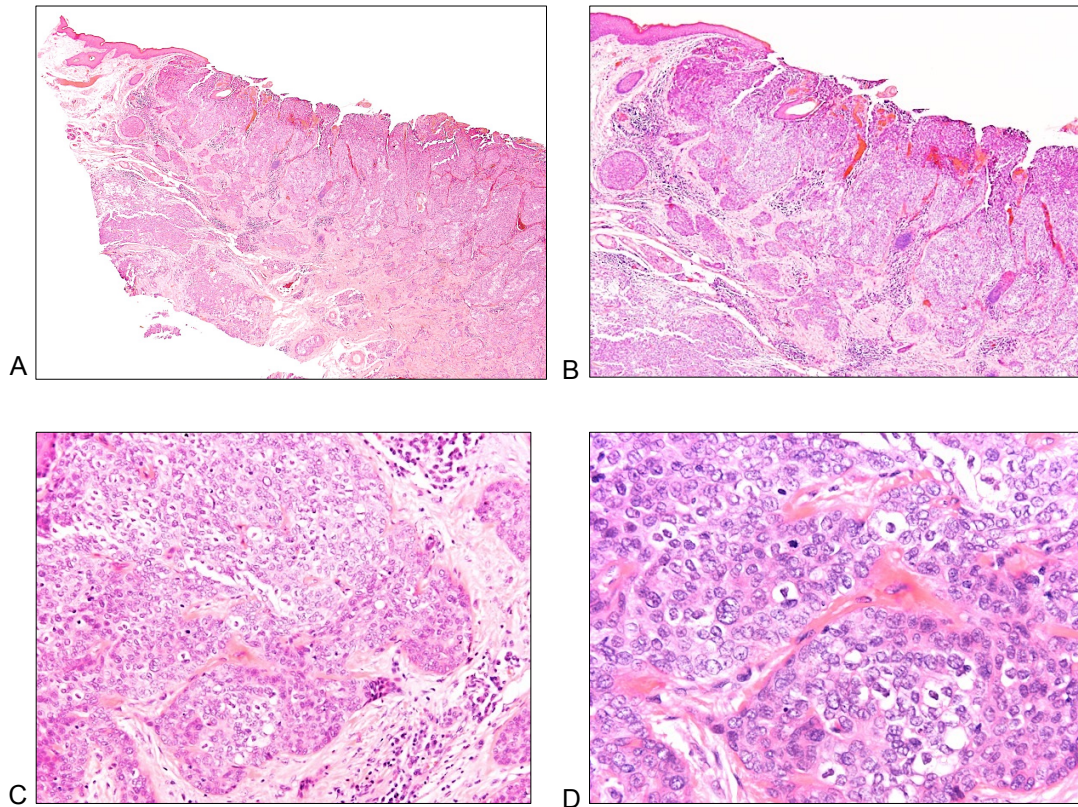


Figura IV.5. Carcinoma sebáceo. A y B. El tumor muestra áreas circunscritas e infiltrantes (A: 20X y B: 100X, HE). C y D. Se observa atipia celular y mitosis (C: 200X y D: 400X, HE).

Según el patrón de crecimiento, el 51,7% (15 de 29) se clasificaron como grado I, el 34,5% (10 de 29), como grado II y el 13,8% (4 de 29), como grado III (Figura IV.6).

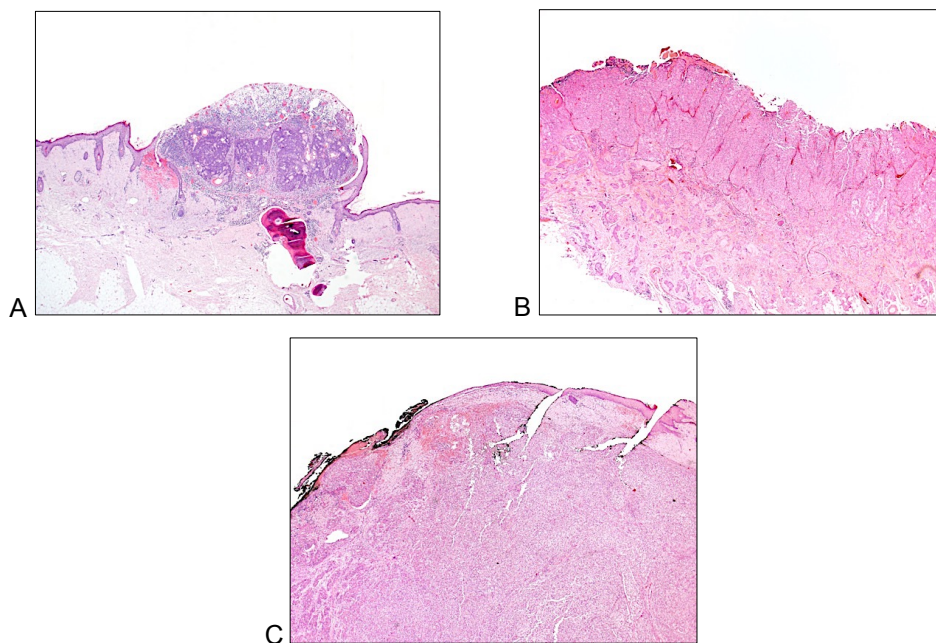


Figura IV.6. Patrón de crecimiento en carcinomas sebáceos. A. Grado I (20X, HE). B. Grado II (20X, HE). C. Grado III (20X, HE).

Se estudió la presencia de elastosis solar detectándose en el 34,5% (10 de 29) de los carcinomas (Figura IV.7). La mayoría de estos casos, el 90% (9 de 10), localizados en la región de cabeza y cuello (2 periorculares y 7 extraoculares); el caso restante es de ubicación desconocida.

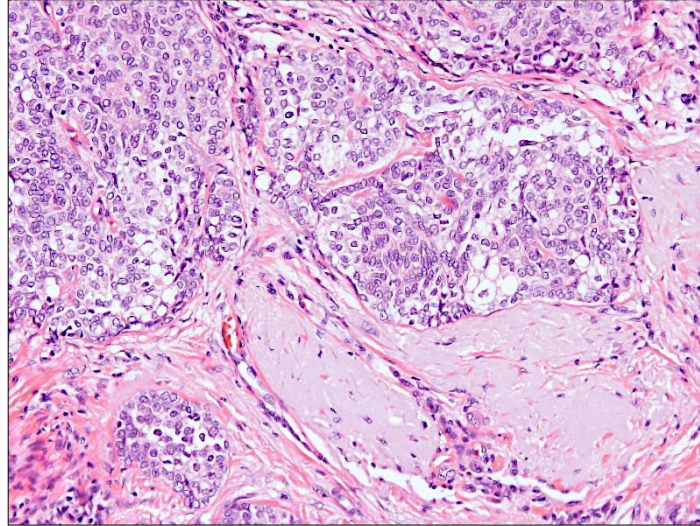


Figura IV.7. Elastosis solar (200X, HE).

El 27,6% (8 de 29) de los carcinomas presentan extensión pagetoide (Figura IV.8). En el área de cabeza y cuello la extensión pagetoide era del 87,5% (7 de 8), 2 periorculares y 5 extraoculares. En el caso restante no se conocía su ubicación.

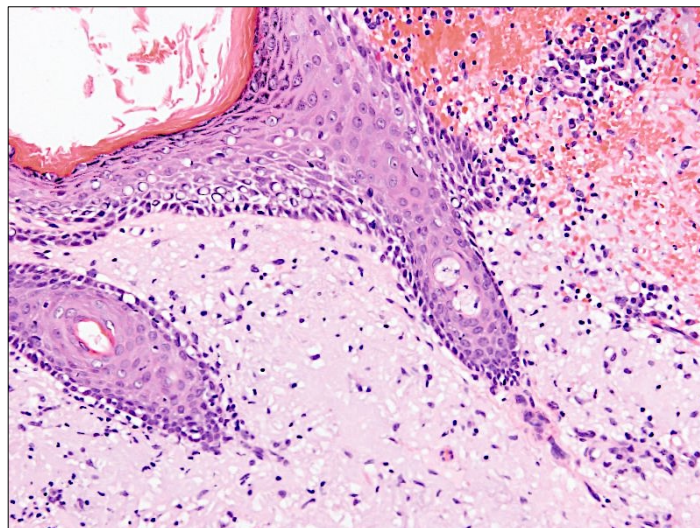


Figura IV.8. Extensión pagetoide (200X, HE).

Se detectó invasión vascular en un carcinoma sebáceo de los 29 de nuestro estudio (3,4%) con la tinción de hematoxilina-eosina, confirmada posteriormente con técnicas inmunohistoquímicas para CD31 (Figura IV.9).

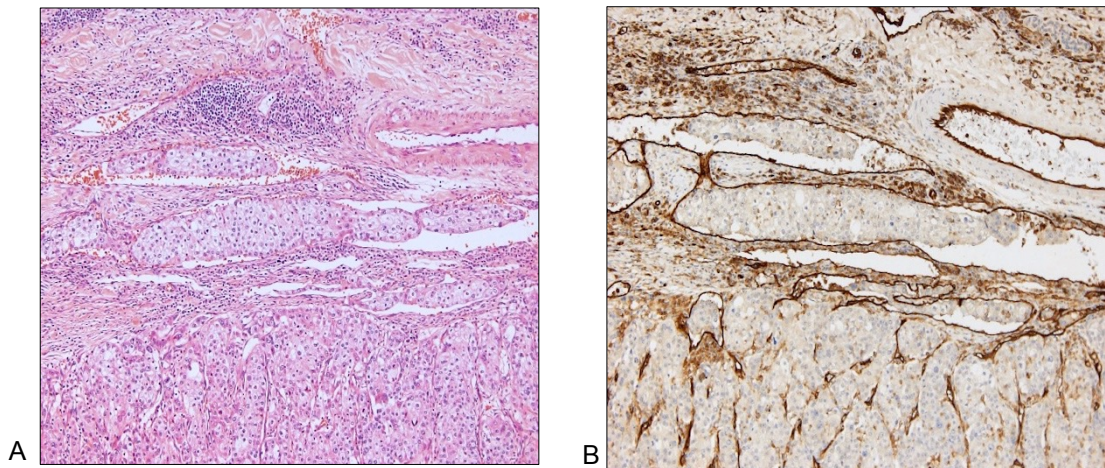


Figura IV.9. Invasión vascular. A. Se observan células tumorales en el interior de los vasos (100X, HE). B. El estudio inmunohistoquímico para CD31 confirma la invasión vascular (100X, IHQ)

Catalogamos los carcinomas sebáceos siguiendo la clasificación TNM de la AJCC (8ª edición).⁵⁵ En ningún caso se identificaron metástasis ganglionares (N0) ni a distancia (M0). En cuanto a los carcinomas perioculares, el 50% (4 de 8) se encuentran en estadio T1a, el 25% (2 de 8) en estadio T1b, 12,5% (1 de 8) en T2a y 12,5% (1 de 8) en estadio T2c. Respecto a los 13 carcinomas extraoculares localizados en cabeza y cuello, el 69,2% (9 de 13) se encuentran en estadio T1, el 7,7% (1 de 13) en estadio T2 y el 23,1% (3 de 13) en estadio T3. Dos carcinomas sebáceos se localizaban fuera de la región de cabeza y cuello, uno de ellos se encuentra en estadio T1 y el otro en estadio T3. (Tabla IV.6).

Tabla IV.6. Clasificación TNM de los carcinomas sebáceos de la serie. A. Carcinomas sebáceos de la piel del párpado. B. Carcinomas sebáceos de cabeza y cuello (excluye el párpado). C. Carcinomas sebáceos (excluye párpado, cabeza y cuello, perianal, vulva y pene).

A	TNM	Perioculares (N=8) N (%)	B	TNM	Extraoculares cabeza y cuello (N=13) N (%)	C	TNM	Otra localización (N=2) N (%)
	T1aN0M0	4 (50)		T1N0M0	9 (69,2)		T1N0M0	1 (50)
	T1bN0M0	2 (25)		T2N0M0	1 (7,7)		T2N0M0	0 (0)
	T1cN0M0	0 (0)		T3N0M0	3 (23,1)		T3N0M0	1 (50)
	T2aN0M0	1 (12,5)						
	T2bN0M0	0 (0)						
	T2cN0M0	1 (12,5)						

3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO DE PROTEÍNAS REPARADORAS DE APAREAMIENTOS INCORRECTOS DEL ADN

En el conjunto de la serie, el 30,8% (20 de 65) de los tumores perdían la tinción nuclear de proteínas reparadoras de apareamientos incorrectos del ADN (proteínas MMR) en el estudio inmunohistoquímico. Por grupos de tumores, la ausencia de expresión se encontró en el 40% (6 de 15) de los adenomas, el 30,4% (7 de 23) de los sebaceomas y el 25,9% (7 de 27) de los carcinomas (Figura IV.10).

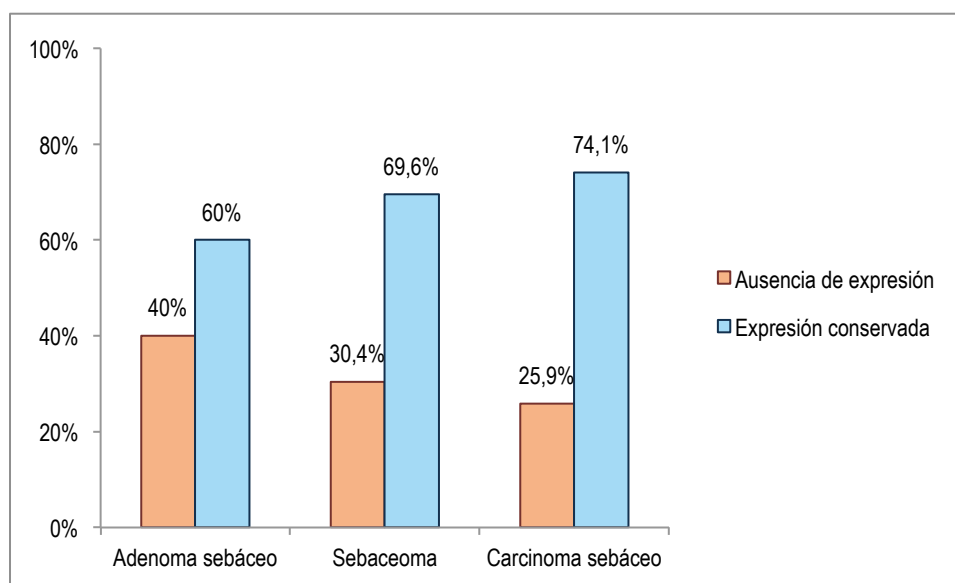


Figura IV.10. Expresión de proteínas MMR en el estudio inmunohistoquímico.

Respecto a la localización (Tabla IV.7), la mayoría de las lesiones con pérdida de expresión proteica se sitúa en áreas extraoculares de cabeza y cuello, 68,8% (11 de 16), siendo en su mayoría neoplasias benignas (4 adenomas sebáceos y 5 sebaceomas). De los restantes tumores, el 12,5% (2 de 16) se localiza en la región periorcular y el 18,7% (3 de 16), en áreas fuera de la cabeza y el cuello.

Tabla IV.7. Localización de las neoplasias con pérdida de proteínas MMR

	Adenoma sebáceo N (%)	Sebaceoma N (%)	Carcinoma sebáceo N (%)	Total N (%)
Periorcular	1 (16,7)	0 (0)	1 (20)	2 (12,5)
Extraocular cabeza y cuello	4 (66,6)	5 (100)	2 (40)	11 (68,8)
Otra localización	1 (16,7)	0 (0)	2 (20)	3 (18,7)
Total	6 (100)	5 (100)	5 (100)	16 (100)

Considerando sólo el grupo de los carcinomas, el porcentaje de pérdida de expresión es mayor en los tumores de localización extraocular en conjunto (cabeza y cuello y de otra localización) que en los perioculares (Tabla IV.8).

Tabla IV.8. Distribución de los carcinomas sebáceos según el estudio inmunohistoquímico

	Periocular N (%)	Extraocular N (%)
Ausencia de expresión	1 (12,5)	4 (28,6)
Expresión conservada	7 (87,5)	10 (71,4)
Total	8 (100)	14 (100)

El patrón de pérdida más frecuente en la serie fue MSH2/MSH6, en un 65% (13 de 20) de los casos. En los adenomas predomina la pérdida MSH2/MSH6, observado en un 66,7% (4 de 6) de los casos. En los sebaceomas destaca la pérdida de proteína MSH6, con una frecuencia de 42,8% (3 de 7). En el caso de carcinomas, todos los tumores con pérdida de tinción presentaban negatividad para MSH2/MSH6 (Tabla IV.9).

Tabla IV.9. Patrones de pérdida de tinción de proteínas MMR

	Adenoma sebáceo N (%)	Sebaceoma N (%)	Carcinoma sebáceo N (%)	Total N (%)
MSH2 negativo/MSH6 negativo	4 (66,7)	2 (28,6)	7 (100,0)	13 (65)
MLH1 negativo/PMS2 negativo	1 (16,7)	1 (14,3)	0 (0,0)	2 (10)
MSH6 negativo	1 (16,7)	3 (42,8)	0 (0,0)	4 (20)
MSH2 negativo	0 (0,0)	1 (14,3)	0 (0,0)	1 (5)
Total	6 (100)	7 (100)	7 (100)	20 (100)

4. MUTACIÓN DEL PROMOTOR DE *TERT* EN NEOPLASIAS SEBÁCEAS

4.1. Mutación del promotor de *TERT* en neoplasias sebáceas benignas y malignas

En el grupo de los carcinomas sebáceos analizados se encontraron mutaciones en el promotor de *TERT* en el 27,6% (8 de 29) de los casos. En el grupo de los tumores sebáceos benignos no se detectó ninguna mutación (Figura IV.11).

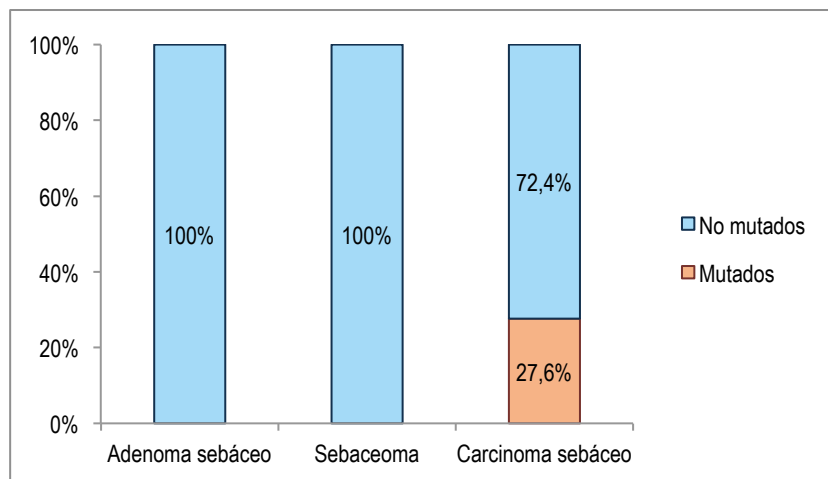


Figura IV.11. Frecuencia de la mutación en el promotor de *TERT* en neoplasias sebáceas.

En el estudio estadístico se observa que hay diferencia significativa en la presencia de mutaciones entre los tumores malignos y benignos (p -valor $< 0,0001$). Al realizar el análisis por grupos, las diferencias se encontraban entre los sebaceomas y los carcinomas sebáceos (p -valor: $0,0008$).

4.2. Técnicas de secuenciación

En cuanto a las técnicas de detección de las mutaciones, no se observaron diferencias significativas entre la pirosecuenciación, la secuenciación Sanger y la secuenciación masiva (p -valor: $0,9714$) (Figura IV.12).

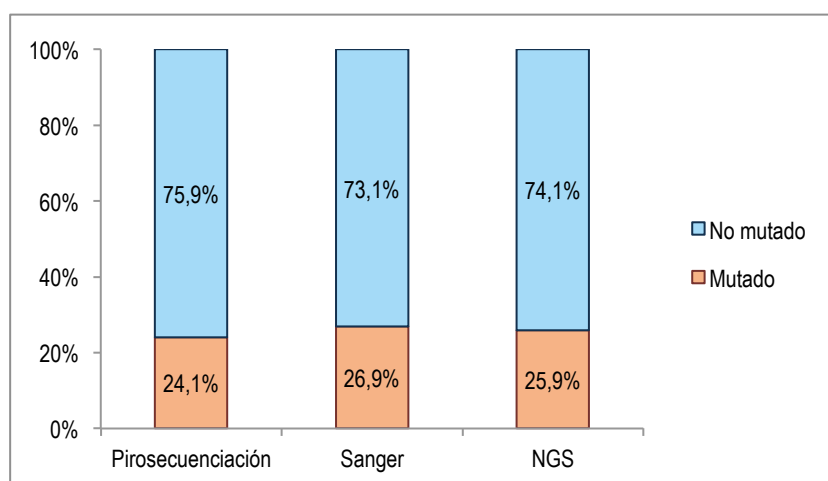


Figura IV.12. Frecuencia de detección de la mutación por las tres técnicas moleculares.

Las mutaciones C228T, C250T y C242T fueron halladas por las tres técnicas, excepto una mutación C228T no detectada por NGS, que se atribuyó a la ausencia de celularidad tumoral tras repetidas extracciones de ADN de la muestra. La mutación compuesta CC242_243TT fue detectada únicamente por NGS. (Tabla IV.10).

Tabla IV.10. Frecuencia de detección de las distintas mutaciones por las tres técnicas moleculares

	Pirosecuenciación (N=29) N (%)	Sanger (N=26) N (%)	NGS (N=27) N (%)
Mutado C228T	3 (10,3)	3 (11,5)	2 (7,4)
Mutado C250T	3 (10,3)	3 (11,5)	3 (11,1)
Mutado C242T	1 (3,4)	1 (3,8)	1 (3,7)
Mutado CC242_243TT	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,7)
No mutados	22 (75,9)	19 (73,1)	20 (74,1)

El grado de acuerdo entre las tres técnicas en la detección de las mutaciones fue casi perfecto (índice kappa de Fleiss: 0,9 con un intervalo de confianza al 95% de 0,41-1).

4.3. Mutación del promotor de *TERT* en carcinomas sebáceos

Las mutaciones más frecuentes fueron C228T y C250T, detectándose ambas con la misma frecuencia, 37,5% (3 de 8) cada una. La mutación C242T se encontró en un caso (12,5%) al igual que la mutación compuesta CC242_243TT (12,5%). (Figura IV.13).

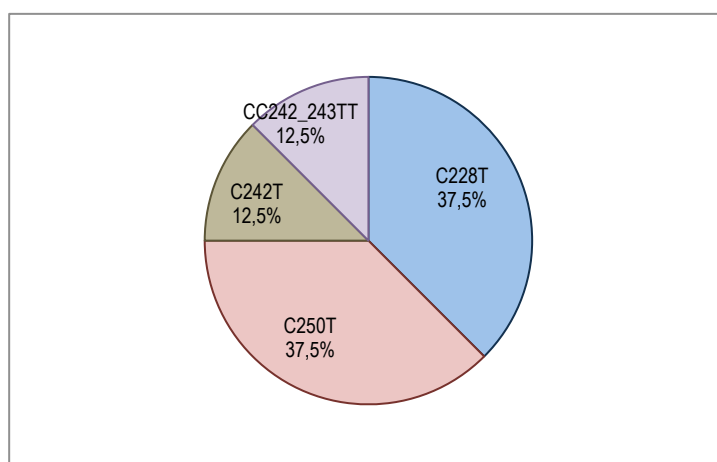


Figura IV.13. Frecuencias por tipo de mutación.

A continuación se muestran las gráficas de secuenciación Sanger y pirosecuenciación para cada tipo de mutación.

1.- Mutación C228T (Figura IV.14)

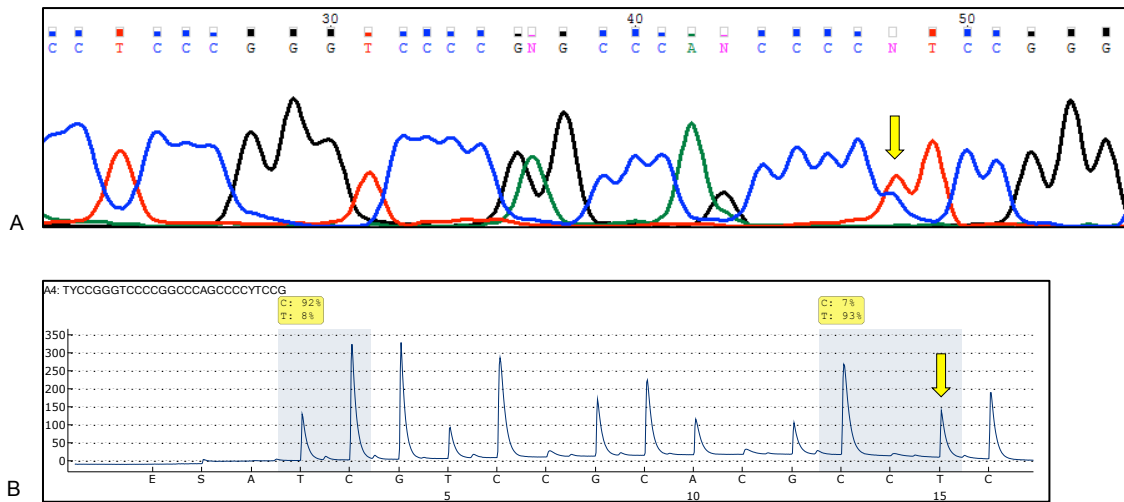


Figura IV.14. Mutación C228T. A. Secuenciación Sanger. Se muestra la mutación (flecha), observándose un pico en la curva roja (timina) donde debería existir un pico en la curva azul (citosina). B. Pirosecuenciación. Se señala el pico de timina (flecha) debido a la presencia de la mutación.

2.- Mutación C250T (Figura IV.15)

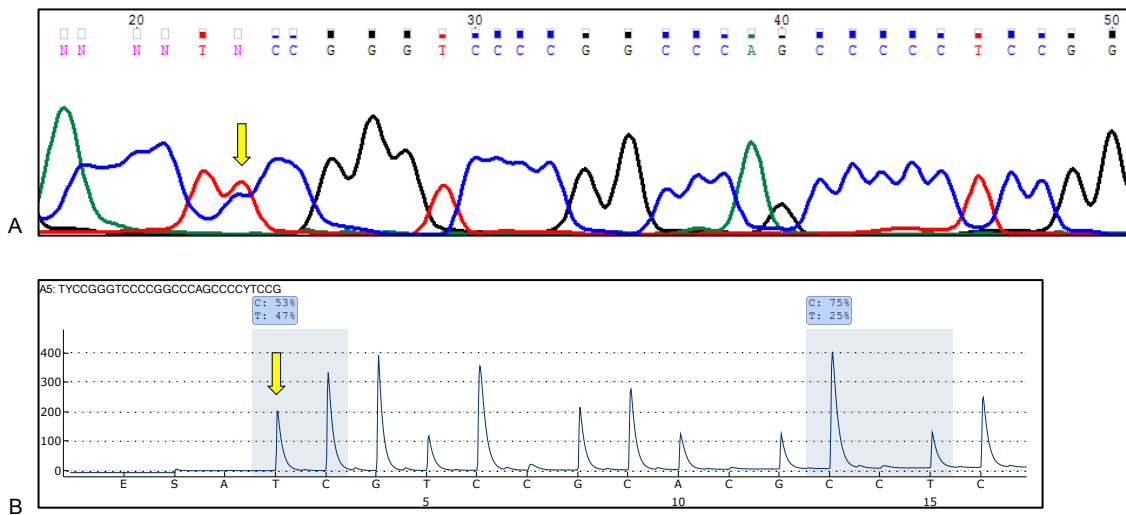


Figura IV.15. Mutación C250T. A. Secuenciación Sanger. Se muestra la mutación (flecha), observándose un pico en la curva roja (timina) donde debería existir un pico en la curva azul (citosina). B. Pirosecuenciación. Se señala el pico de timina (flecha) debido a la presencia de la mutación.

3.- Mutación C242T (Figura IV.16)

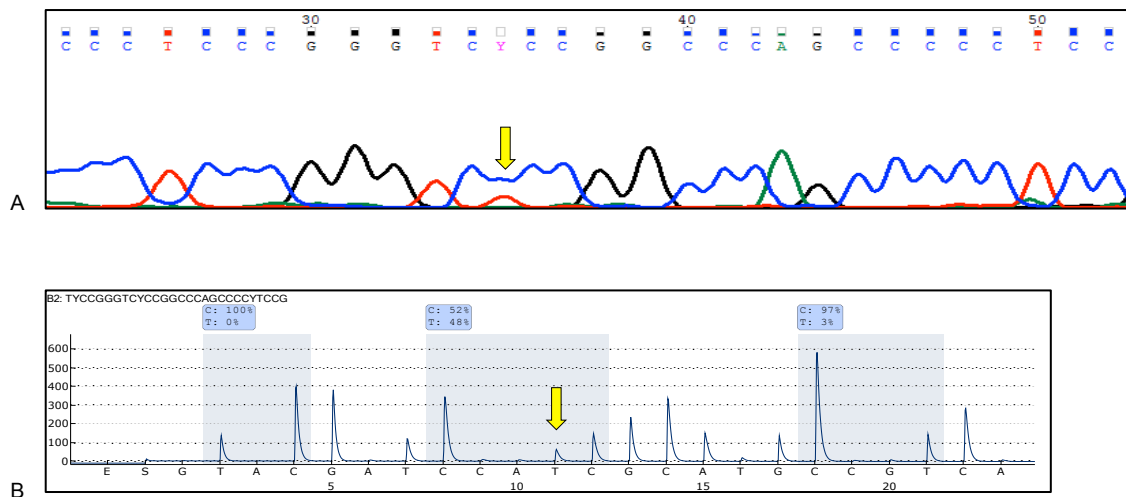


Figura IV.16. Mutación C242T. A. Secuenciación Sanger. Se muestra la mutación (flecha), observándose un pico en la curva roja (timina) donde debería existir un pico en la curva azul (citosina). B. Pirosecuenciación. Se señala el pico de timina (flecha) debido a la presencia de la mutación.

4.- Mutación CC242_243TT (Figura IV.17)

Esta mutación fue detectada sólo por NGS. Revisando la secuenciación Sanger y la pirosecuenciación, se observó que la mutación era prácticamente imperceptible en la secuenciación Sanger, posiblemente por su menor sensibilidad, y se interpretó inicialmente como negativa. Por otra parte, la pirosecuenciación no estaba diseñada para detectar esta mutación, ya que no incluía el análisis de esas posiciones.

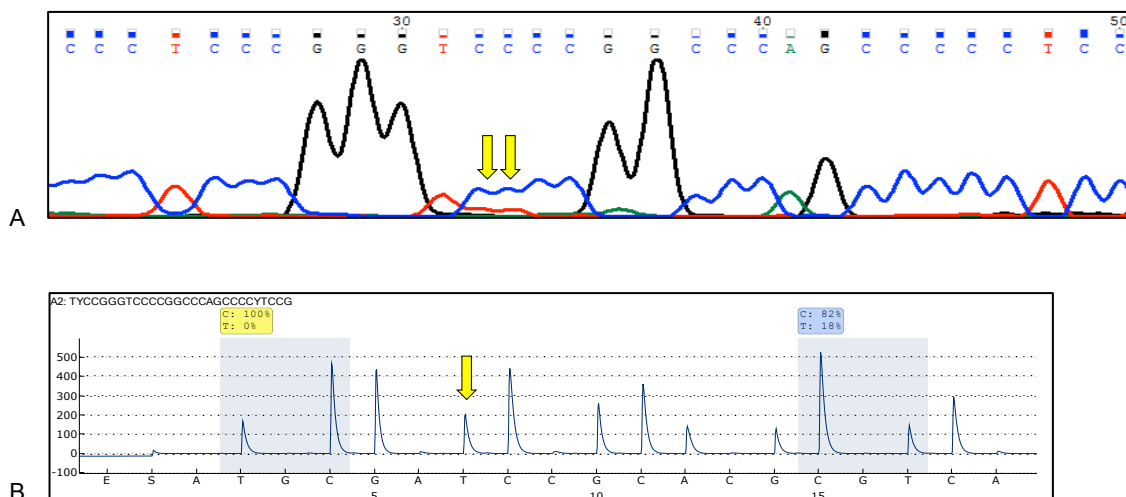


Figura IV.17. Mutación CC242_243TT. A. Secuenciación Sanger. Se muestra la mutación detectada por NGS (flechas), observándose una ligera elevación de la curva roja (timina), que inicialmente se interpretó como fondo y, por tanto, como resultado negativo. B. Pirosecuenciación. Se señala el pico de timina (flecha) debido a la presencia de la mutación detectada por NGS, aunque se encuentra fuera de las áreas sombreadas de análisis.

4.4. Características clínicas de los pacientes con carcinomas sebáceos mutados y no mutados

En la tabla IV.11 se comparan las características clínicas de los pacientes con carcinomas sebáceos mutados y no mutados de la serie.

En relación con la edad, los pacientes con carcinomas mutados tienen una edad media superior (86 ± 8 años) que en los pacientes del grupo no mutado (72 ± 17 años). Los carcinomas mutados son algo más frecuentes en mujeres, 66,7% (4 de 6), que los no mutados, 58,8% (10 de 17). En cuanto a la localización, se observa una mayor frecuencia de carcinomas mutados en regiones extraoculares de cabeza y cuello, 66,7% (4 de 6), que de no mutados, 52,9% (9 de 17). Sin embargo, en la región periorcular, el porcentaje de carcinomas mutados y no mutados es similar, 33,3% (2 de 6) y 35,3% (6 de 17), respectivamente. Dos carcinomas de 17 no mutados (11,8%) se ubicaban fuera de la región de cabeza y cuello. Ningún carcinoma mutado se localizó fuera de esta zona.

No se detectaron recidivas en los pacientes con carcinoma mutado, mientras que un paciente de 11 con carcinoma no mutado (9,1%) mostró recidiva local del tumor. Los pacientes con carcinomas no mutados desarrollaron neoplasias viscerales con una frecuencia ligeramente superior, 28,6% (4 de 14), que los del grupo mutado, 20% (1 de 5). Fallecieron 3 pacientes con carcinoma mutado de un total de 5 (60%) con evolución conocida, y 2 con carcinoma mutado de 6 (33,3%) con evolución conocida, pero ninguno a consecuencia del tumor.

Tabla IV.11. Características clínicas de los pacientes con carcinomas sebáceos mutados y no mutados

	Carcinoma mutado	Carcinoma no mutado	p-valor
Edad media \pm DS	86 \pm 8	72 \pm 17	0,0804
Sexo N (%)			
Hombre	2 (33,3)	7 (41,2)	0,8820
Mujer	4 (66,7)	10 (58,8)	
Total	6 (100)	17 (100)	
Localización N (%)			
Periorcular	2 (33,3)	6 (35,3)	0,6510
Extraocular cabeza y cuello	4 (66,7)	9 (52,9)	
Otra localización	0 (0,0)	2 (11,8)	
Total	6 (100)	17 (100)	
Recidiva N (%)			
Sí	0 (0,0)	1 (9,1)	0,7511
No	6 (100)	10 (90,9)	
Total	6 (100)	11 (100)	
Neoplasia visceral N (%)			
Sí	1 (20)	4 (28,6)	0,8275
No	4 (80)	10 (71,4)	
Total	5 (100)	14 (100)	

4.5. Expresión inmunohistoquímica de proteínas reparadoras de apareamientos incorrectos del ADN en los carcinomas sebáceos mutados y no mutados

En cuanto al estudio inmunohistoquímico de las proteínas reparadoras de apareamientos incorrectos del ADN (proteínas MMR), los carcinomas no mutados presentan un mayor porcentaje de lesiones con pérdida de tinción, 31,6% (6 de 19), respecto a los carcinomas mutados, 12,5% (1 de 8) (Tabla IV.12). En ambos grupos el patrón de pérdida de tinción fue MSH2 negativo/MSH6 negativo.

Tabla IV.12. Expresión de proteínas MMR en carcinomas sebáceos mutados y no mutados

Proteínas MMR	Carcinoma mutado (N=8) N (%)	Carcinoma no mutado (N=19) N (%)	p-valor
Perdidas	1 (12,5)	6 (31,6)	0,5808
Conservadas	7 (87,5)	13 (68,4)	

4.6. Características histopatológicas de los carcinomas sebáceos mutados y no mutados

La tabla IV.13 resume las características histopatológicas de los carcinomas sebáceos mutados y no mutados.

Tabla IV.13. Características histopatológicas de los carcinomas sebáceos mutados y no mutados

	Carcinoma mutado (N=8) N (%)	Carcinoma no mutado (N=21) N (%)	p-valor
Tamaño máximo			
≤ 10 mm	4 (50,0)	14 (66,6)	0,6902
> 10 mm	4 (50,0)	7 (33,3)	
Diferenciación			
Bien	6 (75,0)	16 (76,2)	0,9999
Mal	2 (25,0)	5 (23,8)	
Variante			
Basaloide	2 (25,0)	12 (57,1)	0,1964
Escamoide	6 (75,0)	8 (38,1)	
Pseudoneuroendocrina	0 (0,0)	1 (4,8)	
Patrón de crecimiento			
G I	4 (50,0)	11 (52,4)	0,0484
G II	1 (12,5)	9 (42,8)	
G III	3 (37,5)	1 (4,8)	
Elastosis solar			
Sí	5 (62,5)	5 (23,8)	0,1279
No	3 (37,5)	16 (76,2)	
Extensión pagetoide			
Sí	3 (37,5)	5 (23,8)	0,7852
No	5 (62,5)	16 (76,2)	
Invasión vascular N (%)			
Sí	1 (12,5)	0 (0,0)	0,6097
No	7 (87,5)	21 (100,0)	

En cuanto al tamaño (Figura IV.18), los tumores mayores de 10 mm son más frecuentes en el grupo de los carcinomas mutados, 50% (4 de 8), que en el grupo de los no mutados, 33,3% (7 de 21).

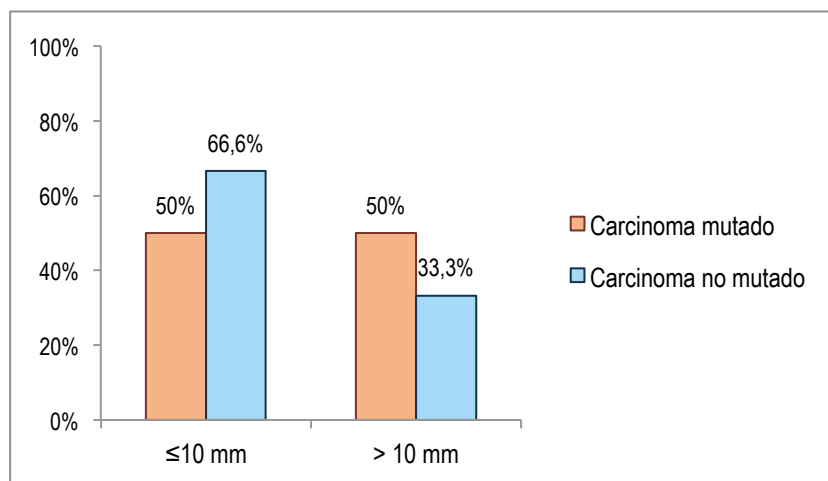


Figura IV.18. Tamaño en carcinomas sebáceos mutados y no mutados.

No se observan discrepancias en cuanto al grado de diferenciación histológica entre ambos grupos de carcinomas (Figura IV.19). El porcentaje de tumores bien diferenciados es del 75% (6 de 8) en los mutados y del 76,2% (16 de 21) en los no mutados, mientras que los mal diferenciados suponen el 25% (2 de 8) de los mutados y el 23,8% (5 de 21) de los no mutados. En cuanto a la variante histológica, los carcinomas mutados son predominantemente escamoides, 75% (6 de 8) y los no mutados, basaloides, 57,1% (12 de 21).

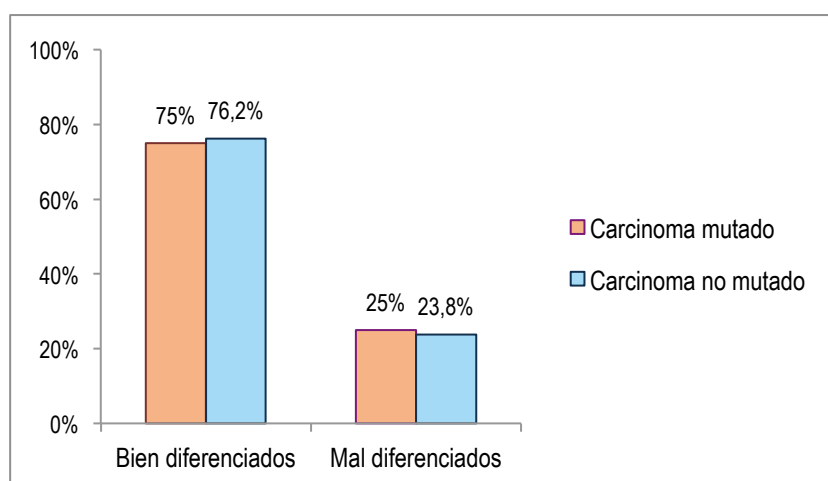


Figura IV.19. Grado de diferenciación en carcinomas sebáceos mutados y no mutados.

Respecto al patrón de crecimiento, se advierte un porcentaje similar de tumores de grado I en ambos grupos, 50% (4 de 8) en mutados y 52,4% (11 de 21) en no mutados. Los tumores de grado II son más frecuentes en el grupo de carcinomas no mutados, 42,8% (9 de 21), que en mutados, 12,5% (1 de 8), mientras que los tumores de grado III son más frecuentes en el grupo de mutados, 37,5% (3 de 8), que en no mutados, 4,8% (1 de 21). En el estudio estadístico había diferencias significativas entre ambos grupos (p-valor: 0,0484) y, al realizar las comparaciones por categorías, las diferencias se encontraban entre los grados II y III (p-valor: 0,0150). Por lo tanto, los carcinomas con patrón de crecimiento grado II son significativamente más frecuentes en el grupo no mutado que en el mutado, mientras que los de grado III son más frecuentes en el grupo mutado que en el no mutado (Figura IV.20).

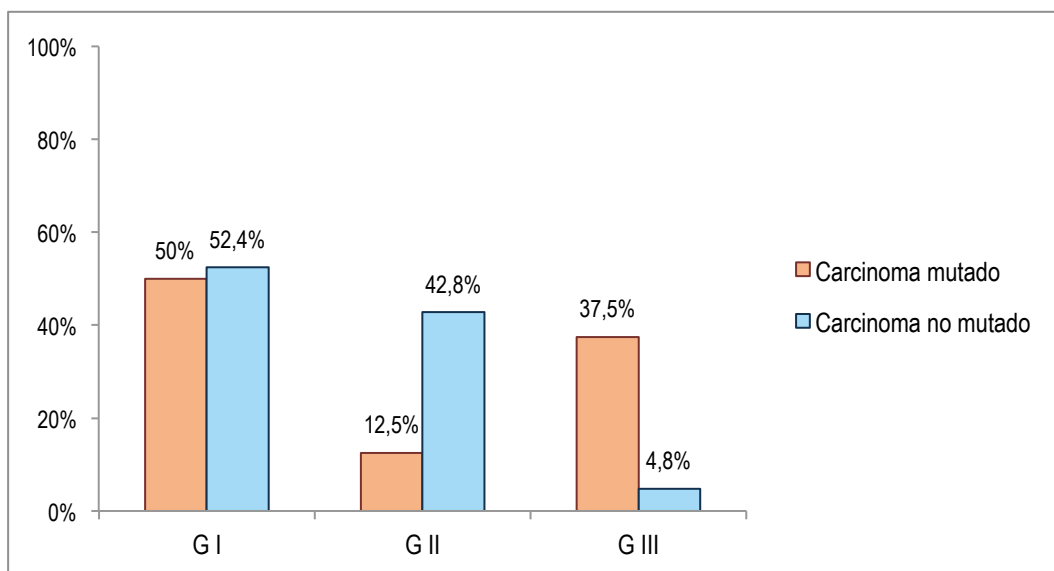


Figura IV.20. Patrón de crecimiento en carcinomas sebáceos mutados y no mutados.

En cuanto a la elastosis solar (Figura IV.21), ésta predomina en los carcinomas mutados, 62,5% (5 de 8), frente a los no mutados, 23,8% (5 de 21).

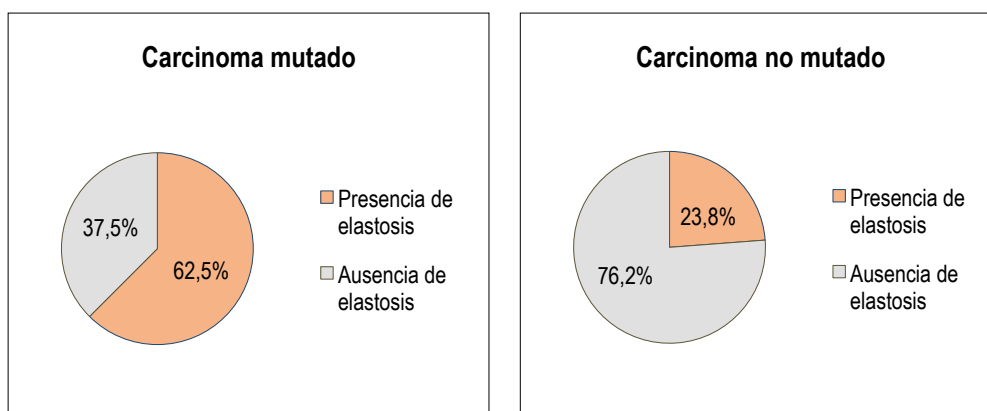


Figura IV.21. Elastosis solar en carcinomas sebáceos mutados y no mutados

Se identificó extensión pagetoide (Figura IV.22) en un 37,5% (3 de 8) de los carcinomas mutados y en un 23,8% (5 de 21) de los no mutados.

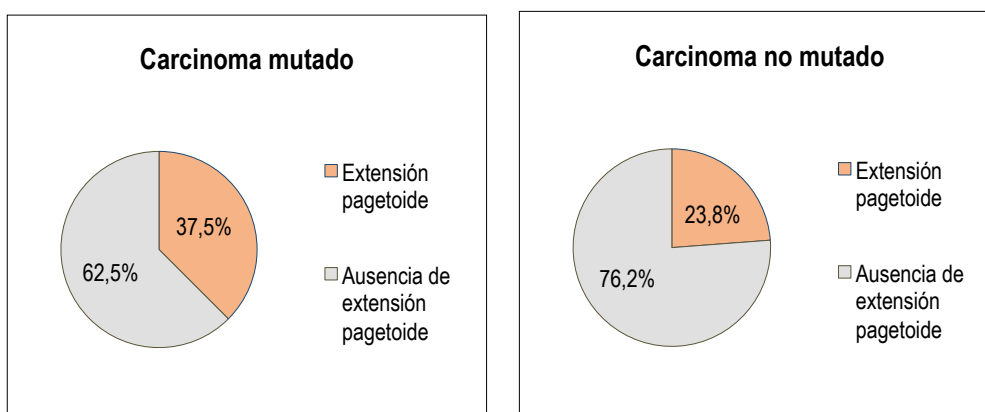


Figura IV.22. Extensión pagetoide en carcinomas sebáceos mutados y no mutados

En el grupo de los carcinomas mutados un caso de los 8 (12,5%) mostró invasión vascular, mientras que en el grupo de no mutados no se evidenció dicho hallazgo. En ningún caso se advirtió invasión perineural.

4.7. Mutación del promotor de *TERT* y estadio TNM

En el grupo de carcinomas perioculares se observa el mismo porcentaje de tumores mutados en estadio T1a, 50% (1 de 2), que de no mutados, 50% (3 de 6). En estadio T1b y T2c se observan sólo carcinomas no mutados, mientras que en estadio T2a sólo hay tumores mutados (Tabla IV.14).

Tabla IV.14. Estadio TNM de los carcinomas sebáceos perioculares

TNM	Carcinomas mutados (N=2)	Carcinomas no mutados (N=6)	p-valor
	N (%)	N (%)	
T1a	1 (50)	3 (50)	0,2614
T1b	0 (0)	2 (33,3)	
T2a	1 (50)	0 (0)	
T2c	0 (0)	1 (16,7)	

En el caso de los carcinomas de áreas extraoculares de cabeza y cuello, es mayor el porcentaje de neoplasias en estadio T1 en el grupo no mutado, 77,8% (7 de 9) que en el mutado, 50% (2 de 4). Por el contrario, los carcinomas en estadio T3 son más frecuentes en los mutados, 50% (2 de 4), que en los no mutados, 11,1% (1 de 9). En estadio T2 sólo había un carcinoma no mutado (Tabla IV.15).

Tabla IV.15. Estadio TNM de los carcinomas sebáceos extraoculares de cabeza y cuello

TNM	Carcinomas mutados (N=4)	Carcinomas no mutados (N=9)	p-valor
	N (%)	N (%)	
T1	2 (50)	7 (77,8)	0,2769
T2	0 (0%)	1 (11,1)	
T3	2 (50)	1 (11,1)	

Por lo que respecta a los dos carcinomas localizados fuera de la región de cabeza y cuello, ambos eran no mutados, uno de ellos en estadio T1 y el otro en estadio T3 (Tabla IV.16).

Tabla IV.16. Estadio TNM de los carcinomas sebáceos de otra localización

TNM	Carcinomas mutados (N=0)	Carcinomas no mutados (N=2)
	N (%)	N (%)
T1	0 (0)	1 (50)
T3	0 (0)	1 (50)

4.8. Presencia de otras mutaciones en carcinomas sebáceos

En el análisis mediante NGS de los 29 carcinomas sebáceos se identificaron un total de 40 mutaciones somáticas que afectaban a 8 de los 14 genes estudiados: TP53, promotor de *TERT*, EGFR, ATRX, PDGFRA, CDKN2A, PTEN y ACVR1. Se excluyó una posible mutación de BRAF con una frecuencia en torno al 10%, al comprobarse que era negativa por inmunohistoquímica. Se detectaron mutaciones en el 69% (20 de 29) de los carcinomas (Tabla IV.17). En los carcinomas mutados la

mediana fue de 2 mutaciones por lesión (rango: 1-3). El gen más frecuentemente mutado fue TP53, en un 55,2% de los casos (16 de 29), seguido de la mutación en el promotor de *TERT*, observada en un 24,1% de los tumores (7 de 29). La mutación en EGFR se identificó en un 17,2% de los casos (5 de 29) y la de ATRX en un 13,8% (4 de 29). PDGFRA y CDKN2A estaban mutados en un 10,3% de los casos (3 de 29) cada uno y PTEN y ACVR1 en un 3,4% (1 de 29) cada uno (Figura IV.23).

Tabla IV.17. Mutaciones detectadas por NGS en los carcinomas sebáceos de nuestra serie

Gen	Secuencia mutada	Aminoácidos mutados	Tipo de mutación	Nº de tumores afectados
<i>TP53</i>	c.818G>A	p.Arg273His	missense	1
<i>TP53</i>	c.586C>T	p.Arg196Ter	nonsense	3
<i>TP53</i>	c.797G>A	p.Gly266Glu	missense	1
<i>TP53</i>	c.670G>T	p.Glu224Ter	nonsense	1
<i>TP53</i>	c.487T>A	p.Tyr163Asn	missense	1
<i>TP53</i>	c.184G>T	p.Glu62Ter	nonsense	1
<i>TP53</i>	c.734G>A	p.Gly245Arg	missense	2
<i>TP53</i>	c.825T>G	p.Cys275Trp	missense	1
<i>TP53</i>	c.396G>C	p.Lys132Asn	missense	1
<i>TP53</i>	c.817C>T//c.472C>T	p.Arg273Cys//p.Arg158Cys	missense	1
<i>TP53</i>	c.535C>T	p.His179Tyr	missense	1
<i>TP53</i>	c.742C>T	p.Arg248Trp	missense	1
<i>TP53</i>	c.1003C>T	p.Arg335Cys	missense	1
<i>EGFR</i>	c.2327G>A	p.Arg776His	missense	1
<i>EGFR</i>	c.1580G>A	p.Arg527Gln	missense	1
<i>EGFR</i>	c.710C>A//c.2011C>T	p.Ala237Asp//p.Arg671Cys	missense	2
<i>EGFR</i>	c.1346G>A	p.Gly449Glu	missense	1
<i>ATRX</i>	c.1579G>C	p.Asp527His	missense	1
<i>ATRX</i>	c.3935G>A	p.Gly1312Glu	missense	1
<i>ATRX</i>	c.2156C>A	p.Ser719Tyr	missense	1
<i>ATRX</i>	c.5016G>A	p.Trp1672Ter	nonsense	1
<i>PDGFRA</i>	c.1436G>A	p.Arg479Gln	missense	1
<i>PDGFRA</i>	c.1518_1519delCCinsTT	p.Leu507Phe	synonymous	1
<i>PDGFRA</i>	c.2488A>G	p.Lys830Glu	missense	1
<i>pTERT</i>	c.250C>T			3
<i>pTERT</i>	c.228C>T			2
<i>pTERT</i>	c.242C>T			1
<i>pTERT</i>	c.242_243CC>TT			1
<i>CDKN2A</i>	c.238C>T	p.Arg80Ter	nonsense	1
<i>CDKN2A</i>	c.147_148delCCinsTT	p.Gln50Ter	synonymous	1
<i>CDKN2A</i>	c.242C>T	Pro81Leu	missense	1
<i>PTEN</i>	c.77C>T	p.Thr26Ile	missense	1
<i>ACVR1</i>	c617G>A	p.Arg206His	missense	1

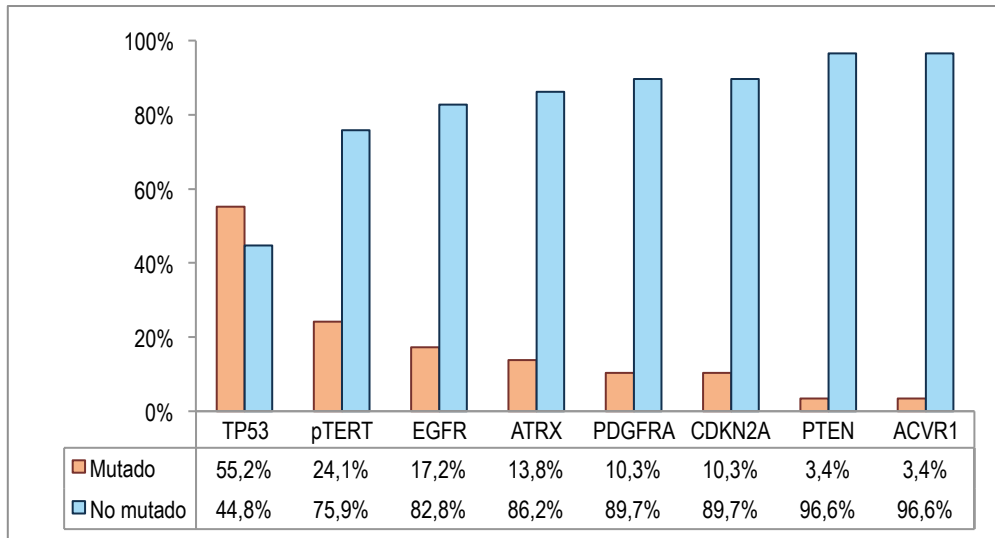


Figura IV.23. Frecuencia de mutación de los genes estudiados por NGS en carcinomas sebáceos.

Se compararon las mutaciones según la localización de los tumores (Figura IV.24).

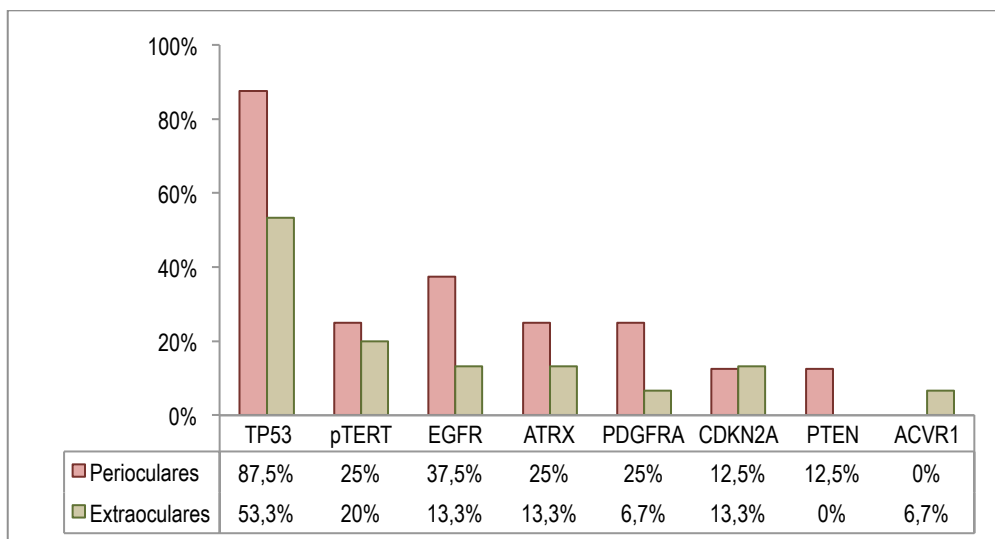


Figura IV.24. Frecuencia de mutación de los genes estudiados por NGS en carcinomas sebáceos perioculares y extraoculares.

En cuanto a los carcinomas perioculares, el 87,5% (7 de 8) estaban mutados y mostraban un total de 18 mutaciones somáticas, con una mediana de 3 mutaciones por lesión (rango: 2-3). Estas mutaciones se encontraron en TP53 en un 87,5% de los casos (7 de 8), EGFR en un 37,5% (3 de 8), promotor de *TERT*, ATRX y PDGFRA en un 25% (2 de 8) cada uno y CDKN2A y PTEN en un 12,5% (1 de 8) cada uno; no se observaron mutaciones en ACVR1. Siete de las mutaciones se encuentran en genes considerados susceptibles de tratamiento (EGFR, PDGFRA CDKN2A y PTEN). El 73,3% (11 de 15) de los carcinomas localizados en áreas extraoculares estaban mutados y se detectaron un total de 19 mutaciones somáticas, con una mediana de 1

mutación por lesión (rango: 1-2). Los genes afectados fueron TP53 en un 53,3% de los casos (8 de 15), promotor de *TERT* en un 20% (3 de 15), EGFR, ATRX y CDKN2A en un 13,3% (2 de 15) cada uno y PDGFRA y ACVR1 en un 6,7% (1 de 15) cada uno; no se encontraron mutaciones en PTEN. Cinco de las mutaciones se encuentran en genes considerados susceptibles de tratamiento (EGFR, PDGFRA y CDKN2A). Entre ambos grupos las diferencias encontradas no fueron significativas.

También se comparó la presencia de mutaciones entre el grupo de carcinomas que en el estudio inmunohistoquímico no expresa proteínas MMR y el grupo que las conserva (Figura IV.25).

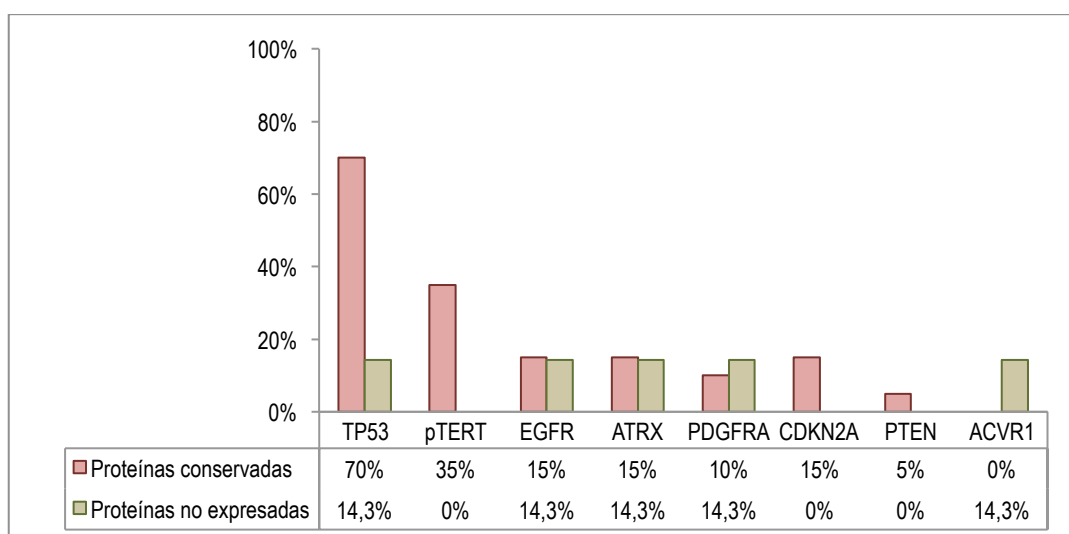


Figura IV.25. Frecuencia de mutación de los genes estudiados por NGS en los carcinomas sebáceos que conservan las proteínas MMR y los que no las expresan.

En el grupo de los carcinomas que conservan las proteínas MMR, el 80% (16 de 20) estaban mutados, detectándose un total de 33 mutaciones somáticas en 7 de los 14 genes estudiados: TP53 en un 70% de los casos (14 de 20), promotor de *TERT* en un 35% (7 de 20), EGFR, ATRX y CDKN2A en un 15% de los casos (3 de 20) cada uno, PDGFRA en un 10% (2 de 20) y PTEN en un 5% (1 de 20). No se detectaron mutaciones en ACVR1. La mediana fue de 2 mutaciones por lesión (rango: 1-3). Respecto a los tumores que no expresan proteínas MMR, se encontraban mutados el 42,8% (3 de 7). Presentaban un total de 5 mutaciones en 5 de los genes estudiados: TP53, EGFR, ATRX, PDGFRA y ACVR1 en un 14,3% de casos (1 de 7) cada uno. Cabe destacar que en este grupo no se detectaron mutaciones en el promotor de *TERT*. La mediana fue de 1 mutación por lesión (rango: 1-2). El estudio estadístico mostraba que había diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a las mutaciones totales encontradas (p-valor: 0,00001) y en la mutación de TP53 (p-valor: 0,0348).

V. DISCUSIÓN

1. CARACTERÍSTICAS DE LA SERIE DE NEOPLASIAS SEBÁCEAS

En nuestra serie, los adenomas sebáceos son más frecuentes en hombres, mientras que los sebaceomas se distribuyen de forma similar entre hombres y mujeres. La edad media en el momento del diagnóstico se sitúa en los 69 años para los adenomas y en los 72 para los sebaceomas. De acuerdo con la literatura, nuestros casos se localizan en su mayoría en la región de cabeza y cuello, en concreto, el 84,6% de los adenomas sebáceos y el 94,7% de los sebaceomas. Destaca la zona extraocular de cabeza y cuello (69,2% de los adenomas y 84,2% de los sebaceomas) frente a la periorcular (15,4% de los adenomas y 10,5% de los sebaceomas). Un paciente con sebaceoma presentó recidiva de la lesión, probablemente por extirpación incompleta de la misma.

Los carcinomas sebáceos de nuestra serie son más frecuentes en mujeres, 60,9%, que en hombres, 39,1%, y la edad media en el momento del diagnóstico es de 75 años. Los estudios epidemiológicos más recientes destacan una frecuencia ligeramente mayor en hombres, entre el 52,4 y el 60,3%, y una edad media de 70 años.^{44,46,47,51} En cuanto a la localización, la mayoría de los carcinomas de nuestra serie se ubican en la zona de cabeza y cuello, con un 34,8% en la zona periorcular y un 56,5%, en áreas extraoculares. Esta distribución es parecida a lo descrito en la literatura, que sitúa la frecuencia de la región periorcular entre el 25,8% y el 45,9% y la extraocular de cabeza y cuello entre el 40,7 y el 68,8%.^{44,46,47,51} Sólo un paciente de 17 (5,9%) presentó recidiva del carcinoma, resultado similar a lo reportado en la literatura reciente (4-28%).^{50,59,61,62} Ningún paciente sufrió metástasis ni falleció a consecuencia del tumor.

La pérdida de expresión nuclear de las proteínas MMR en el estudio inmunohistoquímico de nuestros casos ocurre en el 30,8% (20 de 65) de las neoplasias sebáceas, siendo más frecuente en áreas extraoculares de cabeza y cuello, 68,8% (11 de 16). Por grupos de tumores, la pérdida de tinción se observa en el 40% (6 de 15) de los adenomas, el 30,4% (7 de 23) de los sebaceomas y el 25,9% (7 de 27) de los carcinomas. El patrón más frecuente es MSH2 negativo/MSH6 negativo, observado en el 65% de las lesiones. En la literatura se identifica entre un 25 y un 66% de neoplasias sebáceas con alteraciones en el estudio inmunohistoquímico de proteínas MMR. La pérdida de MSH2 es más frecuente que la de MLH1 y las

alteraciones se presentan con más frecuencia en las neoplasias fuera de la región de cabeza y cuello.¹⁵³

Uno de nuestros pacientes con un adenoma sebáceo y otro con un sebaceoma se diagnosticaron de síndrome de Muir-Torre y habían desarrollado un carcinoma colorrectal cada uno. Ningún paciente con carcinoma sebáceo fue diagnosticado de este síndrome.

2. MUTACIÓN DEL PROMOTOR DE *TERT* EN NEOPLASIAS SEBÁCEAS

En nuestro trabajo se han analizado tanto tumores sebáceos benignos (adenoma y sebaceoma) como malignos (carcinoma sebáceo)

Se ha detectado la mutación en el promotor de *TERT* en el 27,6% de los carcinomas sebáceos estudiados (8 de 29). Por el contrario, en el grupo de tumores benignos, constituido por un total de 62 muestras (17 adenomas sebáceos y 45 sebaceomas) no se encontró ninguna mutación. La diferencia fue estadísticamente significativa entre el grupo de sebaceomas y el de carcinomas sebáceos (p-valor: 0,0008). Estos resultados nos indicarían que el análisis de la mutación del promotor de *TERT* puede ser útil para diferenciar los carcinomas sebáceos de los sebaceomas, que por su elevado porcentaje de células germinativas inmaduras (más de un 50% de la celularidad tumoral) pueden plantear dudas diagnósticas con los carcinomas.

Es relevante señalar también que la ausencia de mutaciones en los tumores sebáceos benignos está en consonancia con lo descrito en la literatura, ya que las mutaciones en el promotor de *TERT* están ausentes o son infrecuentes en neoplasias benignas. Un ejemplo son los adenomas hepatocelulares, en los que esta mutación no se ha identificado y, de hecho, se ha propuesto la mutación en el promotor de *TERT* como una ayuda diagnóstica para diferenciar los carcinomas hepatocelulares bien diferenciados de los adenomas hepatocelulares.¹³⁵ Otro ejemplo son los tumores benignos de tiroides, en los que tampoco se han detectado mutaciones.¹⁵⁴⁻¹⁵⁵ Sólo hay un caso en la literatura de adenoma folicular mutado, pero el paciente desarrolló más tarde un carcinoma folicular, por lo que se ha cuestionado la naturaleza benigna del tumor inicial.¹⁵⁶ Estos resultados también se han observado en tumores cutáneos benignos. En el estudio de Horn, se analizaron 25 nevus melanocíticos y sólo uno presentaba una mutación en el promotor de *TERT*, situada en la posición -101 pb del inicio de la traducción, pero se vio que no formaba nuevos sitios de reconocimiento para ETS/TCF.¹¹³ En el estudio de Scott se estudiaron 7 queratosis seborreicas, en las

que no se identificaron mutaciones.¹¹⁵ Heidenreich, por el contrario, halló la mutación en un 24% (6 de 25) de las queratosis seborreicas estudiadas, tres con la mutación C250T y otras tres con la CC242_243TT. La mutación se asociaba con mayor edad y se presentaba principalmente en lesiones de cabeza y cuello. Sin embargo, la mayoría de los casos no mostraba niveles detectables de expresión de *TERT*.¹⁵⁷

3. MUTACIÓN DEL PROMOTOR DE *TERT* EN CARCINOMAS SEBÁCEOS

Hasta la fecha, sólo se ha realizado un trabajo sobre mutaciones del promotor de *TERT* en carcinomas sebáceos.¹¹⁶ En él se estudia, mediante secuenciación Sanger, la presencia de esta mutación en un grupo de tumores perioculares, que incluye carcinomas de células basales, carcinomas epidermoides, carcinomas epidermoides *in situ*, neoplasias intraepiteliales conjuntivales y carcinomas sebáceos. En la muestra de carcinomas sebáceos perioculares, formada por 20 casos, ningún tumor mostraba mutación en el promotor de *TERT*.¹¹⁶

Como se ha comentado anteriormente, en nuestro estudio sí hemos detectado mutaciones en el promotor de *TERT* en los carcinomas sebáceos. En concreto, el 27,6% (8 de 29) de los tumores analizados estaban mutados. El 33,3% (2 de 6) eran perioculares y el 66,7% (4 de 6), extraoculares de cabeza y cuello. En los otros dos casos se desconocía la localización. En cuanto a las mutaciones encontradas, las más frecuentes fueron la C228T y la C250T, ambas con igual frecuencia, un 37,5% (3 de 8). Otras mutaciones detectadas con menor frecuencia fueron la C242T, en un 12,5% (1 de 8) de los casos y la CC242_243TT, en un 12,5% (1 de 8). Estos resultados son similares a los obtenidos en otros tipos de neoplasias cutáneas¹²⁵. Según lo reportado en la literatura, en los tumores cutáneos, en general, las mutaciones C228T y C250T tienen una frecuencia similar o la C250T supera a la C228T, a diferencia de otras neoplasias, en las que la mutación C228T tiene mayor prevalencia que la C250T.¹²⁵

En cuanto al melanoma (Figuras V.1 y V.2), el estudio de Horn¹¹³ detectó la mutación del promotor de *TERT* en un 74,4% (125 de 168) de las líneas de melanoma estudiadas, de las cuales, el 51,2% (64 de 125) eran la C250T y el 36,8% (46 de 125), la C228T. En el caso de los melanomas cutáneos primarios, la mutación se encontró en un 32,5% (25 de 77), siendo algo superior la C228T, 28% (7 de 25) que la C250T, 20% (5 de 25).¹¹³ Huang detectó la mutación en un 71,4% (50 de 70) de melanomas, con una frecuencia similar para la C228T, 50% (25 de 50), y la C250T, 46% (23 de 50).¹¹⁴ En el trabajo de Heidenreich, la mutación se observó en un 37,9% (109 de 287)

de melanomas cutáneos primarios, siendo la C250T más frecuente, 46,8% (51 de 109), que la C228T, 32,1% (35 de 109).¹⁴³ Los resultados obtenidos por Griewank fueron similares, con una frecuencia de mutación del promotor de *TERT* del 42,5% (154 de 362), correspondiendo a la C250T una frecuencia del 50% (77 de 154) y a la C228T, un 30,5% (47 de 154).¹⁴²

Respecto a los carcinomas basocelulares y epidermoides (Figuras V.1 y V.2), Scott encontró una frecuencia para la mutación del promotor de *TERT* del 78,3% (18 de 23) en carcinomas basocelulares esporádicos, del 68,4% (13 de 19) en carcinomas basocelulares del síndrome nevoide basocelular y del 50% (13 de 26) en carcinomas epidermoides.¹¹⁵ Por tipos de mutación, en los carcinomas basocelulares esporádicos mutados la frecuencia de la C250T fue del 38,9% (7 de 18) y la de la C228T del 16,7% (3 de 18); en los asociados al síndrome nevoide, la C250T suponía un 30,8% (4 de 13) y la C228T un 46,1% (6 de 13), mientras que en carcinomas epidermoides estas frecuencias fueron del 53,8% (7 de 13) para la C250T y del 30,8% (4 de 13) para la C228T.¹¹⁵ En el trabajo de Griewank se encontraban mutados el 56,2% (18 de 32) de los carcinomas basocelulares y el 50% (17 de 34) de los epidermoides.¹³⁸ La mutación C250T se identificaba en un 61,1% (11 de 18) de los carcinomas basocelulares mutados y la C228T en un 22,2% (4 de 18), mientras que en los epidermoides la C250T suponía el 29,4% (5 de 17) de los casos mutados y la C228T el 35,3% (6 de 17).¹³⁸

En el caso del fibroxantoma atípico y del sarcoma pleomórfico dérmico (Figuras V.1 y V.2), la frecuencia de mutación en el promotor de *TERT* detectada por Griewank fue del 92,6% (25 de 27) en el primero y del 76,5% (26 de 34) en el segundo. En el fibroxantoma atípico era mayor la mutación C228T, 36% (9 de 25), que la C250T, 28% (7 de 25). En el sarcoma pleomórfico dérmico, la frecuencia de mutación para la C250T era de 50% (13 de 26) y para la C228T, de 38,5% (10 de 26).¹³⁷

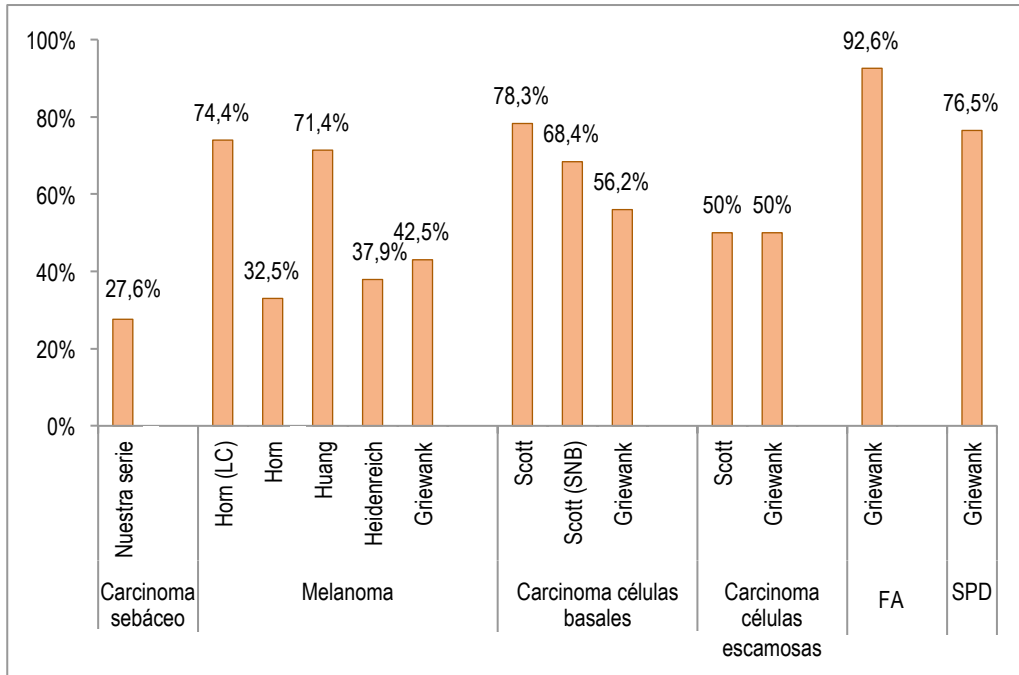


Figura V.1. Frecuencia de mutaciones en el promotor de *TERT* en tumores cutáneos. Se muestran las frecuencias en los carcinomas sebáceos de nuestra serie, melanomas, carcinomas de células basales, carcinomas de células escamosas, fibroxantoma atípico (FA) y sarcoma pleomórfico dérmico (SPD). LC: línea celular; SNB: síndrome nevoide basocelular.

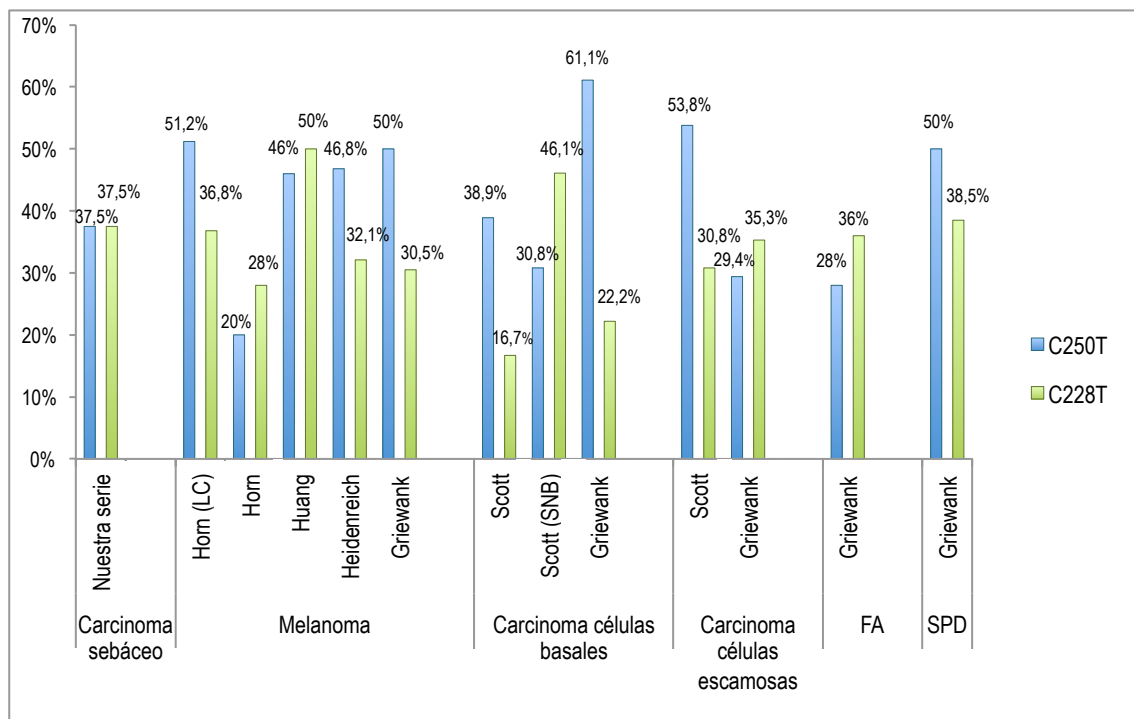


Figura V.2. Frecuencia de las mutaciones C228T y C250T en tumores cutáneos. Se muestran las frecuencias en los carcinomas sebáceos de nuestra serie, melanomas, carcinomas de células basales, carcinomas de células escamosas, fibroxantoma atípico (FA) y sarcoma pleomórfico dérmico (SPD). LC: línea celular; SNB: síndrome nevoide basocelular.

Respecto a las otras dos mutaciones encontradas en nuestro estudio, la CC242_243TT fue detectada en el trabajo de Horn en un 6,4% (8 de 125) de las líneas celulares de melanoma mutadas y en un 32% (8 de 25) de melanomas primarios mutados.¹¹³ En el estudio de Heidenreich, la mutación CC242_243TT se observó en un 6,4% (7 de 109) de melanomas mutados y la C242T en un 0,9% (1 de 109),¹⁴³ mientras que las frecuencias, en el trabajo de Griewank, fueron de 13% (20 de 154) y 0,6% (1 de 154), respectivamente.¹⁴² En los carcinomas de basocelulares, Griewank encontró la mutación CC242_243TT en un 11,1% (2 de 18) de los carcinomas mutados y Scott en un 33,3% (6 de 18) de los carcinomas basocelulares esporádicos y en un 7,7% (1 de 13) de los asociados a síndrome nevoide basocelular.¹³⁸ En el caso de los carcinomas epidermoides, la frecuencia de esta mutación fue del 23,5% (4 de 17) en el trabajo de Griewank y del 15,4% (2 de 13), en el de Scott.¹³⁸ Finalmente, en el fibroxantoma atípico la frecuencia de esta mutación fue del 12% (3 de 25) y en el sarcoma pleomorfo del 7,7% (2 de 26).¹³⁷

Los trabajos mencionados emplearon, en su mayoría, la secuenciación Sanger como única técnica de detección de la mutación.^{115,137,138,142,143} Horn y Huang utilizaron también técnicas de secuenciación masiva.^{113,114} En nuestro estudio hemos empleado tres técnicas para la detección de la mutación en el promotor de *TERT*: pirosecuenciación, secuenciación Sanger y secuenciación masiva o *Next generation sequencing* (NGS). Es importante destacar que no hubo diferencias significativas en cuanto a la detección de la mutación entre las técnicas (p-valor: 0,9714). Además, las tres técnicas mostraron un grado de acuerdo casi perfecto para las diferentes mutaciones (índice kappa de Fleiss de 0,9; intervalo de confianza al 95%: 0,41-1).

En uno de los casos, la secuenciación masiva no detectó una mutación C228T, lo que se ha atribuido a que la técnica se realizó tras repetidas extracciones de ADN de la muestra y probablemente ya no existieran células tumorales al secuenciar. La mutación compuesta CC242_243TT sólo fue detectada por NGS. La discordancia en este caso pudo deberse, en el caso de la secuenciación Sanger, a su menor sensibilidad y, en el caso de la pirosecuenciación, al diseño del programa de detección, que no contemplaba el análisis de dicha mutación.

4. DIFERENCIAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS ENTRE CARCINOMAS SEBÁCEOS MUTADOS Y NO MUTADOS

La mutación en el promotor de *TERT* se ha asociado con distintas variables clínico-patológicas en diversos tumores.^{125,146} En el caso de los melanomas,

Heidenreich ha encontrado que existe asociación entre la mutación y mayor edad de los pacientes, ulceración del tumor y mayor espesor de Breslow, además, las mutaciones del promotor de *TERT* tendían a ocurrir junto con mutaciones de *BRAF* y alteraciones en *CDKN2A*.¹⁴³ En el trabajo de Griewank, la mutación era significativamente más frecuente en melanomas no acrales que en los de localización acral y de mucosas, en los subtipos nodulares y de extensión superficial y en aquéllos con mayor espesor de Breslow. Además, su presencia se asociaba con una peor supervivencia en los melanomas no acrales. También observó que la mutación era significativamente más frecuente en tumores con mutación *BRAF* o *NRAS*.¹⁴² En los tumores del sistema nervioso central, las mutaciones en el promotor de *TERT* influyen en los resultados clínicos, ya que se han asociado a progresión tumoral y peor supervivencia.¹⁴⁶ En el trabajo de Labussière en gliomas, la mutación se observaba en el 60,8% (491 de 807) de los tumores y se asociaba con resultados clínicos desfavorables. Se establecieron cuatro grupos diagnósticos en función de la mutación en el promotor de *TERT* y en *IDH*. El grupo que presentaba menor supervivencia era el de los tumores con promotor de *TERT* mutado e *IDH* no mutado, que además mostraba alta asociación con la amplificación en *EGFR*.¹⁴⁷ En el trabajo de Eckel también se clasificó una serie de gliomas según la presencia de mutación del promotor de *TERT*, mutación *IDH* y la codelección 1p19q. Se observó que, en términos de supervivencia, la mutación en el promotor de *TERT* es, en general, desfavorable en ausencia de mutación en *IDH* y favorable en presencia de mutación en *IDH* y codelección 1p19q.¹⁴⁸ En el cáncer de tiroides se ha observado que la mutación se asocia con pacientes de edad más avanzada, mayor tamaño tumoral, recidiva, metástasis a distancia, estadio alto (III/IV) y mortalidad.¹⁵⁸ En cuanto a los tumores en el sistema urinario, la mutación se ha detectado con frecuencia similar en tumores en diferentes estadios o grados, por lo que se considera que tiene un valor pronóstico limitado.¹⁴⁹ Podría ser un biomarcador útil para la detección de recidivas en pacientes con carcinoma urotelial de vejiga.^{150,159,160} En tumores no invasivos, la mutación de *FGFR3* tiende a coexistir con las mutaciones del promotor de *TERT*.¹³⁴

En nuestro estudio, cabe destacar que la mutación del promotor de *TERT* se detecta en pacientes con una edad media mayor en el momento del diagnóstico (86 años en carcinomas mutados frente a 72 en no mutados) y con mayor frecuencia en mujeres (66,7% en el grupo de tumores mutados frente a 58,8% en los no mutados). Ambos grupos presentan una frecuencia similar de localización en la zona periocular (33,3% en mutados y 35,3% en no mutados), mientras que los mutados son más frecuentes en la región extraocular de cabeza y cuello (66,7%) frente a los no mutados (52,9%).

Respecto a la evolución clínica, se ha observado que los pacientes con carcinoma mutado desarrollaban neoplasias viscerales con una frecuencia algo menor (20%) que los pacientes con carcinoma no mutado (28,6%). En cuanto a la recidiva local, sólo se detectó en un paciente con un carcinoma no mutado (9,1%), mientras que los pacientes con carcinoma mutado no presentaron ninguna.

En relación a la expresión inmunohistoquímica de proteínas MMR, los carcinomas no mutados mostraban un mayor porcentaje de tumores con pérdida de tinción (31,6%) que los mutados (12,5%).

Respecto a las variables histopatológicas, no se observaron diferencias entre ambos grupos en el grado de diferenciación histológica, mientras que sí se detectó mayor porcentaje de carcinomas escamoides (75%) en el grupo mutado y basaloides (57,1%) en el no mutado. Los carcinomas sebáceos con mutación del promotor de *TERT* han mostrado, de forma significativa, una mayor frecuencia de patrón de crecimiento grado III, es decir, invasivo o medular en sábana (37,5%) que los no mutados (4,8%).

Otros datos histológicos asociados a mal pronóstico en los que hemos observado una mayor frecuencia en carcinomas mutados han sido el tamaño tumoral mayor de 10 mm (50% en mutados y 33,3% en no mutados), extensión pagetoide (37,5% en mutados y 23,8% en no mutados) e invasión linfovascular (12,5% en mutados y ninguno en los no mutados). Ninguno de los pacientes con estos factores de mal pronóstico sufrió recidiva de la lesión y no se identificó ningún otro signo de mala evolución clínica.

Hemos valorado la presencia de elastosis solar y su relación con la mutación para determinar el papel de la luz ultravioleta en la patogénesis de estos tumores. Hemos observado que la elastosis es más frecuente en los carcinomas mutados (62,5%) que en los no mutados (23,8%). Esta diferencia, aunque no alcanza la significación estadística, junto con la presencia en las mutaciones de las transiciones C>T y CC>TT, características de etiología por luz UV, sugiere su participación en el desarrollo de estas neoplasias.

Finalmente, hemos estudiado la relación entre la mutación y el estadio TNM. No encontramos asociación entre la mutación del promotor de *TERT* y estadios patológicos más altos de los tumores estudiados (estadios T2a y T2c en carcinomas sebáceos perioculares y estadio T2 y T3 en carcinomas sebáceos extraoculares de cabeza y cuello).

5. OTRAS MUTACIONES DETECTADAS EN CARCINOMAS SEBÁCEOS

Dos estudios recientes han analizado mediante NGS el perfil mutacional de los carcinomas sebáceos.

En el trabajo de Tetzlaff,¹⁰⁸ se analizaron 409 genes relacionados con cáncer en 27 carcinomas sebáceos. En los tumores perioculares primarios o con recidiva local (n=18), se detectaron un total de 81 mutaciones somáticas (mediana por lesión: 3; rango: 0-16), 12 de las cuales se producían en genes considerados susceptibles de tratamiento (NF1, IDH2, PDGFRB, TET2, PTEN, PI3KCA, AKT1 y BRAF). En los carcinomas extraoculares (n=4) se detectaron 77 mutaciones totales (mediana por lesión: 22,5; rango: 3-29), 18 de ellas en genes considerados susceptibles de tratamiento (ALK, BTK, FGFR2, PTEN, PDGFRB, MET, TSC, ERBB2, PIK3R2, CHEK2, ABL2, HRAS, NF1 y ABL1). En las metástasis de carcinomas perioculares (n=5) se encontraron 58 mutaciones (mediana por lesión: 8; rango: 2-23), 13 de las cuales ocurrían en genes considerados susceptibles de tratamiento (CHEK2, ERBB2, PIK3CA, NOTCH2, MAPK8, PTPN11, AKT2, AKT3, ABL2 Y JAK1).

En nuestro trabajo estudiamos un panel de 14 genes relacionados con cáncer y detectamos 40 mutaciones en 8 de ellos. El gen más frecuentemente mutado fue TP53 en un 55,2%, seguido de la mutación en el promotor de *TERT*, observada en un 24,1%. Otras mutaciones detectadas fueron en EGFR (17,2%), ATRX (13,8%), PDGFRA (10,3%), CDKN2A (10,3%), PTEN (3,4%) y ACVR1 (3,4%).

El 87,5% (7 de 8) de los carcinomas perioculares estaba mutado. Encontramos un número de mutaciones totales de 18 (mediana por lesión: 3; rango: 2-3), con 7 mutaciones en genes considerados susceptibles de tratamiento (EGFR, PDGFRA, CDKN2A y PTEN). En los extraoculares, el porcentaje de mutados fue de 73,3% (11 de 15). El número de mutaciones somáticas totales fue similar, 19 (mediana por lesión: 1; rango: 1-2), con 5 mutaciones en genes considerados susceptibles de tratamiento (EGFR, PDGFRA y CDKN2A).

Los genes más frecuentemente mutados en el estudio de Tetzlaff¹⁰⁸ fueron TP53 (51,8%) y RB1 (33,3%). Estas mutaciones sólo se observaban en los tumores de localización periorcular. Otros genes frecuentemente mutados fueron PIK3CA, PTEN, ERBB2 y NF1. Los tumores de ambas localizaciones mostraban mutaciones en genes relacionados con la vía de señalización PI3K: PTEN, PIK3CA, ERBB2, NF1, AKT y BRAF en los perioculares y FGFR2, ERBB2, PTEN, PIK3C2B, EGFR, NF1 y BRAF en los extraoculares, de manera que la activación de esta vía sería frecuente independientemente de la localización de la lesión.

Sólo los carcinomas perioculares mostraban mutación en el gen TP53 y ésta se correlacionaba con una expresión nuclear aumentada de proteína p53 en el estudio inmunohistoquímico. Se observó, también, que la mutación se detectaba en 5 lesiones de un mismo paciente (tumor periorcular primario, recidiva local y metástasis en parótida, hígado y pulmón). Además, como se comenta en el artículo, otros autores han reportado una elevada frecuencia de mutaciones en TP53 en carcinomas sebáceos perioculares. Hussain¹⁰³ analizó 14 carcinomas perioculares y el 50% estaba mutado. Kiyosaki¹⁰² estudió 15 carcinomas perioculares, de los cuales el 66,7% presentaba la mutación. Por otro lado, Shalin¹⁰⁴ reportó una mayor expresión inmunohistoquímica de p53 en tumores perioculares, 40% (4 de 10), frente a los de otra localización, 16% (4 de 25). Por todo ello, según Tetzlaff, los carcinomas sebáceos perioculares surgirían por alteración de las vías dependientes de TP53.¹⁰⁸

En los carcinomas sebáceos extraoculares se detectaron mutaciones que afectaban a genes relacionados con la reparación del ADN y remodelamiento de la cromatina, como FANCA, WRN, ARID2, MLH1, MSH2, CHECK2, SMARCB1, SMARCA4 y MLL3. Además, la mayoría de ellos mostraba una elevada mediana mutacional por lesión (22,5; rango 3-29), defectos en la expresión de las proteínas MMR y fenotipo de inestabilidad alta de microsatélites. Estos tumores se desarrollarían, por tanto, a partir de defectos en los genes reparadores MMR.¹⁰⁸

En el trabajo Harvey,¹⁰⁷ se analizaron 22 tumores sebáceos circunscritos, de los cuales 6 eran carcinomas sebáceos. El gen TP53 estaba mutado en todos los carcinomas, tanto perioculares como extraoculares. Otros genes mutados, también en ambas localizaciones, fueron CDKN2A (83,3%) y EGFR (33,3%); mientras que se observaba la mutación en KRAS y CTNNB1 sólo en los tumores de localización extraocular, con unas frecuencias de 50% y 16,7%, respectivamente.

Coincidimos con el trabajo de Tetzlaff en que en ambas localizaciones detectamos mutaciones en genes relacionados con la vía PI3K: EGFR y PDGFRA en extraoculares y EGFR, PDGFRA y PTEN en perioculares.

Al igual que Harvey y a diferencia de Tetzlaff, hemos encontrado mutaciones en TP53 en tumores de ambas localizaciones, en un 87,5% (7 de 8) de los carcinomas perioculares y en un 53,3% (8 de 15) de los extraoculares. Por otro lado, la afectación de ATRX, gen relacionado con la remodelación del ADN, no fue exclusiva de la localización extraocular, ya que se detectó en ambos grupos: 25% (2 de 8) de los perioculares y 13,3% (2 de 15) de los extraoculares. Además, observamos afectación de las proteínas MMR en el estudio inmunohistoquímico en ambos grupos, aunque con mayor porcentaje en los extraoculares, 28,6% (4 de 14), que en los perioculares, 12,5% (1 de 8). No se encontraron diferencias significativas en el estudio estadístico y

parece que tanto las alteraciones en la vía de TP53 como en los genes reparadores de ADN podrían influir en el desarrollo de los tumores en ambas localizaciones.

Hemos hallado también, en nuestra serie, mutaciones en el gen CDKN2A en un 10,3% (3 de 29) de los casos, porcentaje inferior al reportado por Harvey, que lo detectó en un 83,3% (5 de 6) de los carcinomas. El estudio de Liao¹⁶¹ encontró hipermetilación del promotor de CDKN2A en un 45,8% (11 de 24) de los carcinomas sebáceos perioculares estudiados y este resultado se correlacionaba con una edad más joven de los pacientes (47-79 años, con una media de 66 años). En nuestro caso, de los tres tumores mutados, uno era periorcular y dos extraoculares y los pacientes tenían unas edades comprendidas entre los 88 y los 91 años.

Detectamos una mutación en el gen ACVR1 en un caso de carcinoma sebáceo extraocular. Este gen codifica la proteína ACVR1 (también denominada ALK2), que interviene en la vía BMP (*bone morphogenic protein*), responsable del desarrollo y reparación del sistema esquelético. Además de estar relacionada con la fibrodisplasia osificante progresiva, la mutación de este gen está implicada en el glioma pontino intrínseco difuso¹⁶² A nivel cutáneo, en un trabajo reciente en el que se estudian modelos de ratón con sobreexpresión de la proteína ACVR1, se han observado alteraciones en la morfogénesis del folículo piloso.¹⁶³ Dada la relación entre el desarrollo del folículo piloso y la glándula sebácea y el resultado encontrado en nuestro estudio sería interesante analizar si la alteración de este gen está implicada en la patología de glándula sebácea.

Finalmente, mediante NGS hemos comparado los carcinomas que conservan las proteínas MMR en el estudio inmunohistoquímico con el grupo que las pierde, en los que cabría esperar mayor probabilidad de inestabilidad genómica en los estudios moleculares. En el grupo de carcinomas que las expresa hemos observado un 80% de carcinomas con mutaciones, detectando 33 mutaciones totales, con una mediana de 2 mutaciones por lesión (rango:1-3). El gen más frecuentemente mutado fue TP53 (70%), seguido del promotor de *TERT* (35%), EGFR (15%), ATRX (15%), CDKN2A (15%), PDGFRA (10%) y PTEN (5%). El porcentaje de tumores mutados en el grupo que pierde las proteínas MMR es menor (43,8%) y tienen menos mutaciones somáticas, 5 en total, con una mediana de 1 mutación por lesión (rango:1-2). En este grupo los cinco genes mutados (TP53, EGFR, ATRX, PDGFRA y ACVR1) muestran la misma frecuencia (14,3%) y no se observó ninguna mutación en el promotor de *TERT*. Se encontró que la diferencia entre ambos grupos fue significativa en las mutaciones totales (p-valor: 0,00001) y en la mutación de TP53 (p-valor: 0,0348). Cabría esperar que el grupo que pierde las proteínas MMR mostrase mayor carga mutacional, ya que tienen más probabilidad de presentar alteraciones en los estudios

genéticos que los que mantienen las proteínas. Esto podría explicarse por la diferencia de tamaño muestral entre ambos grupos (7 carcinomas con proteínas alteradas y 20 con proteínas normales).

En cuanto a la diferencia observada en TP53, una posible explicación es que en los tumores que conservan las proteínas MMR las alteraciones de la vía molecular TP53 tendrían más relevancia que en los tumores que las pierden, en los que destacarían las alteraciones de la vía MMR. Aunque habría que realizar más estudios para confirmarlo.

VI. CONCLUSIONES

1.- La mutación del promotor de *TERT* se ha detectado en el 27,6% de los carcinomas sebáceos de nuestra serie. La mutación no se ha identificado en tumores sebáceos benignos.

2.- La diferencia en la mutación del promotor de *TERT* entre carcinomas sebáceos y sebaceomas ha resultado significativa, por lo que su presencia apoyaría un diagnóstico de malignidad.

3.- El perfil histopatológico de los carcinomas sebáceos mutados se caracteriza, de manera significativa, por una mayor frecuencia de patrón de crecimiento invasivo, respecto a los carcinomas no mutados.

4.- Se han detectado mutaciones en otros genes en los carcinomas sebáceos. El gen más frecuentemente mutado fue TP53, seguido del promotor de *TERT*. Otros genes afectados con menor frecuencia han sido EGFR, ATRX, PDGFRA, CDKN2A, PTEN y ACVR1. Los carcinomas sebáceos que conservan la expresión nuclear de proteínas MMR en el estudio inmunohistoquímico han mostrado, de forma significativa, un mayor porcentaje de mutaciones en el gen TP53, respecto a los carcinomas sebáceos con proteínas alteradas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Lázaro Ochaita P. *Dermatología. Texto y Atlas*, 3ª ed. Madrid: Gráficas Reunidas, SA; 2003.
2. Fitzpatrick TB, Johnson RA, Polano MK, Suurmond D, Wolff K. *Atlas de Dermatología Clínica*. 3ª ed. Ed Interamericana, 1998.
3. Ferrándiz C, *Dermatología*. 3ª ed. Elsevier, 2009.
4. Simón R.S, de Eusebio E, Alvarez Viéitez A, Sánchez Yus, E. *Proliferaciones con diferenciación sebácea I: Hiperplasias y neoplasias. Actas Dermosifiliogr*. 1998;89:577-590.
5. Nelson BR, Hamlet KR, Gillard M, Railan D, Johnson TM. *Sebaceous carcinoma*. J Am Acad Dermatol. 1995 Jul;33(1):1-15.
6. Shields JA, Demirci H, Marr BP, Eagle RC Jr, Shields CL. *Sebaceous carcinoma of the ocular region: a review*. Surv Ophthalmol. 2005 Mar-Apr;50(2):103-22.
7. Young, B., Heath, J. W., Stevens, A., Lowe, J. S., Wheater, P. R., & Burkitt, H. G. (2000). *Wheater's functional histology: A text and colour atlas*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
8. Schneider MR, Paus R. *Sebocytes, multifaceted epithelial cells: lipid production and holocrine secretion*. Int J Biochem Cell Biol. 2010 Feb;42(2):181-5.
9. Iacobelli J, Harvey NT, Wood BA. *Sebaceous lesions of the skin*. Pathology. 2017 Dec;49(7):688-697.
10. Requena L. *Neoplasias Anexiales Cutáneas*. 1ª ed. Aula Médica, 2004.
11. Smith KR, Thiboutot DM. *Thematic review series: skin lipids. Sebaceous gland lipids: friend or foe?* J Lipid Res. 2008 Feb;49(2):271-81.
12. Ireland AM, Harvey NT, Berry BD, Wood BA. *Paediatric cutaneous adnexal tumours: a study of 559 cases*. Pathology. 2017 Jan;49(1):50-54.
13. Niemann C. *Differentiation of the sebaceous gland*. Dermato-endocrinology. 2009;1(2):64-67.
14. Thiboutot, D. *Regulation of Human Sebaceous Glands*. J Invest Dermatol. 2004 Jul;123(1):1-12.
15. Niemann C, Horsley V. *Development and homeostasis of the sebaceous gland*. Seminars in cell & developmental biology. 2012;23(8):928-936.
16. Frances D, Niemann C. *Stem cell dynamics in sebaceous gland morphogenesis in mouse skin*. Dev Biol. 2012 Mar 1;363(1):138-46.
17. Takeda H, Lyle S, Zouboulis CC, et al. *Human sebaceous tumours harbor inactivating mutations in LEF1*. Nat Med 2006;12:395-7.

18. Niemann C, Owens DM, Hülsken J, Birchmeier W, Watt FM. *Expression of DeltaNlcf1 in mouse epidermis results in differentiation of hair follicles into squamous epidermal cysts and formation of skin tumours*. Development. 2002 Jan;129(1):95-109.
19. Niemann C, Owens DM, Schettina P, Watt FM. *Dual role of inactivating Lef1 mutations in epidermis: tumor promotion and specification of tumor type*. Cancer Res. 2007 Apr1;67(7):2916-21.
20. Steffen Ch, Ackerman AB. *Neoplasms with sebaceous differentiation*. Philadelphia: Lea & Febige; 1994.
21. Kass LG, Hornblass A. *Sebaceous carcinoma of the ocular adnexa*. Surv Ophtalmol. 1989; 33:477-90.
22. Hagedoorn A et al. *Adenocarcinoma of a meibomian gland*. Arch Ophtalmol. 1934;12(6):850-867.
23. Straatsma BR. *Meibomian gland tumors*. Arch Ophtalmol. 1956;56:71-93.
24. Beach A, Severance AO. *Sebaceous gland carcinoma*. Ann Surg.1942;115:258.
25. Warren S, Warvi WN. *Tumors of sebaceous glands*. Am J Pathol. 1943;19:441.
26. Lever WF. *Histopathology of the skin*. Philadelphia. J.B. Lipincott. 1949:273.
27. Troy JL, Ackerman AB. *Sebaceoma. A distinctive benign neoplasm of adnexal epithelium differentiating toward sebaceous cells*. Am J Dermatopathol. 1984 Feb;6(1):7-13.
28. Ansai SI. *Topics in histopathology of sweat gland and sebaceous neoplasms*. J Dermatol. 2017 Mar;44(3):315-326.
29. Nussen S, Ackerman A. *Sebaceous "adenoma" is sebaceous carcinoma*. Dermatopathol: Pract Conc. 1998;4:5-14.
30. Harvey NT, Budgeon CA, Leecy T, et al. *Interobserver variability in the diagnosis of circumscribed sebaceous neoplasms of the skin*. Pathology 2013;45:581-6.
31. Kazakov DV, Kutzner H, Spagnolo DV et al. *Discordant architectural and cytologic features in cutaneous sebaceous neoplasms - a classification dilemma: report of 5 cases*. Am J Dermatopathol. 2009;31:31-36.
32. Misago N, Mihara I, Ansai S, Narisawa Y. *Sebaceoma and related neoplasms with sebaceous differentiation*. Am J Dermatopathol. 2002;24:294-304.
33. Kaminska ECN, Iyengar V, Tsoukas M, Shea CR. *Borderline sebaceous neoplasm in a renal transplant patient without Muir-Torre syndrome*. J Cutan Pathol. 2013;40:336-340.
34. Schez Yus E, Requena L, Simon P, del Rio E. *Sebomatricoma: an unifying term that encompasses all benign neoplasms with sebaceous differentiation*. Am J Dermatopathol. 1995;17:213-21.

35. Rutten AWM, Sanguenza OP, Wallace C. *Tumours with sebaceous differentiation*. In: LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A, editors. *World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics: Skin Tumours*. Lyon: IARC Press, 2006.
36. Flux K. *Sebaceous Neoplasms*. *Surg Pathol Clin*. 2017 Jun;10(2):367-382.
37. Bhaijee F, Brown AS. *Muir-Torre syndrome*. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Dec;138(12):1685-9.
38. Rubin, Adam I., Geoffrey Stratton, and David Weedon. *Weedon's Skin Pathology*. 2, 2. [London]: Churchill Livingstone Elsevier, 2010.
39. Kazakov DV, Michal M, Kacerovska D, McKee PH. *Cutaneous Adnexal Tumours*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2012.
40. Prieto V, Shea CR, Celebi JT, et al. *Adnexal tumors*. En: Busam K, editor. *Dermatopathology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2016.
41. Shalin SC, Lyle S, Calonje E, Lazar AJ. *Sebaceous neoplasia and the Muir-Torre syndrome: important connections with clinical implications*. *Histopathology*. 2010 Jan;56(1):133-147.
42. Flux K, Kutzner H, Rütten A, Plaza JA, Gasparov S, Michal M, Guenova E, Kazakov DV. *Infundibulocystic Structures and Prominent Squamous Metaplasia in Sebaceoma. A Rare Feature. A Clinicopathologic Study of 10 Cases*. *Am J Dermatopathol*. 2016 Sep;38(9):678-82.
43. Knackstedt T, Samie FH. *Sebaceous Carcinoma: A Review of the Scientific Literature*. *Curr Treat Options Oncol*. 2017 Aug;18(8):47.
44. Dasgupta T, Wilson LD, Yu JB. *A retrospective review of 1349 cases of sebaceous carcinoma*. *Cancer* 2009;115:158-65.
45. Xu Y, Li F, Jia R, Fan X. *Updates on the clinical diagnosis and management of ocular sebaceous carcinoma: a brief review of the literatura*. *Onco Targets Ther*. 2018 Jun 27;11:3713-3720.
46. Tryggvason G, Bayon R, Pagedar NA. *Epidemiology of sebaceous carcinoma of the head and neck: implications for lymph node management*. *Head Neck* 2012;34:1765-8.
47. Dores GM, Curtis RE, Toro JR, Devesa SS, et al. *Incidence of cutaneous sebaceous carcinoma and risk of associated neoplasms: insight into Muir-Torre syndrome*. *Cancer* 2008;113:3372-81.
48. Mirzamani N, Sundram UN. *A case of sebaceous carcinoma diagnosed in an adolescent male*. *J Cutan Pathol*. 2011 May;38(5):435-8.
49. Stacey SK, Moss TA, Kobayashi TT. *Sebaceous carcinoma on the arm of a 10-year-old girl*. *Dermatol Online J*. 2017 Jun 15;23(6).

50. Kyllö RL, Brady KL, Hurst EA. *Sebaceous carcinoma: review of the literature*. *Dermatol Surg*. 2015 Jan;41(1):1-15.
51. Tripathi R, Chen Z, Li L, Bordeaux JS. *Incidence and survival of sebaceous carcinoma in the United States*. *J Am Acad Dermatol*. 2016 Dec;75(6):1210-1215.
52. Mulay K, Aggarwal E, White VA. *Periocular sebaceous gland carcinoma: A comprehensive review*. *Saudi J Ophthalmol*. 2013;27(3):159-65.
53. Shields JA, Saktanasate J, Lally SE, Carrasco JR, Shields CL. *Sebaceous Carcinoma of the Ocular Region: The 2014 Professor Winifred Mao Lecture*. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2015 Jul-Aug;4(4):221-7.
54. Mn R, Sr D, Thulasi V, Shenoy KM. *Extraocular sebaceous carcinoma on the chest wall - a case report*. *J Clin Diagn Res*. 2014;8(6):ND05-7.
55. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *UICC TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th Ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2017.
56. Esmaeli B, Nasser QJ, Cruz H, Fellman M, Warneke CL, Ivan D. *American Joint Committee on Cancer T category for eyelid sebaceous carcinoma correlates with nodal metastasis and survival*. *Ophthalmology* 2012; 119:1078-82.
57. Ford J, Thakar S, Thuro B, Esmaeli B. *Prognostic Value of the Staging System for Eyelid Tumors in the 7th Edition of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual*. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2017 Sep/Oct;33(5):317-324.
58. Kaliki S, Gupta A, Ali MH, Ayyar A, Naik MN. *Prognosis of the eyelid sebaceous gland carcinoma based on the tumor (T) category of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) classification*. *Int Ophthalmol*. 2016 Oct;36(5):681-90.
59. Dowd MB, Kumar RJ, Sharma R, Murali R. *Diagnosis and management of sebaceous carcinoma: an Australian experience*. *ANZ J Surg*. 2008 Mar;78(3):158-63.
60. Kaliki S, Ayyar A, Dave TV, Ali MJ, Mishra DK, Naik MN. *Sebaceous gland carcinoma of the eyelid: clinicopathological features and outcome in Asian Indians*. *Eye (Lond)*. 2015 Jul;29(7):958-63.
61. Erovic BM, Goldstein DP, Kim D, Al Habeeb A, Waldron J, Ghazarian D, Irish JC. *Sebaceous gland carcinoma of the head and neck: The Princess Margaret Hospital experience*. *Head Neck*. 2013 Mar;35(3):316-20.
62. Song A, Carter KD, Syed NA, Song J, Nerad JA. *Sebaceous cell carcinoma of the ocular adnexa: clinical presentations, histopathology, and outcomes*. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*. 2008 May-Jun;24(3):194-200.
63. Rulon DB, Helwig EB. *Cutaneous sebaceous neoplasms*. *Cancer*. 1974 Jan;33(1):82-102.

64. Ni C, Searl SS, Kuo PK, Chu FR, Chong CS, Albert DM. *Sebaceous cell carcinomas of the ocular adnexa*. Int Ophthalmol Clin. 1982 Spring;22(1):23-61.
65. Doxanas MT, Green WR. *Sebaceous gland carcinoma. Review of 40 cases*. Arch Ophthalmol. 1984 Feb;102(2):245-9.
66. Muqit MM, Roberts F, Lee WR, Kemp E. *Improved survival rates in sebaceous carcinoma of the eyelid*. Eye (Lond). 2004 Jan;18(1):49-53.
67. Moreno C, Jacyk WK, Judd MJ, Requena L. *Highly aggressive extraocular sebaceous carcinoma*. Am J Dermatopathol. 2001 Oct;23(5):450-5.
68. Bongu A, Lee ES, Peters SR, Chokshi RJ. *Locally aggressive and multicentric recurrent extraocular sebaceous carcinoma: case report and literature review*. Eplasty. 2013 Aug 21;13:e44.
69. Milman T, Shear MJ, Eagle RC, Jr. *Diagnostic utility of adipophilin immunostain in periocular carcinomas*. Ophthalmology. 2014; 121(4):964.
70. Plaza JA, Mackinnon A, Carrillo L, Prieto VG, Sanguenza M, Suster S. *Role of immunohistochemistry in the diagnosis of sebaceous carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study*. Am J Dermatopathol. 2015; 37(11):809.
71. Ansai S, Takeichi H, Arase S, Kawana S, Kimura T. *Sebaceous carcinoma: an immunohistochemical reappraisal*. Am J Dermatopathol. 2011;33(6): 579.
72. Ostler DA, Prieto VG, Reed JA, Deavers MT, Lazar AJ, Ivan D. *Adipophilin expression in sebaceous tumors and other cutaneous lesions with clear cell histology: an immunohistochemical study of 117 cases*. Mod Pathol. 2010; 23(4): 567.
73. Muthusamy K, Halbert G, Roberts F. *Immunohistochemical staining for adipophilin, perilipin and TIP47*. J Clin Pathol. 2006; 59(11):1166.
74. Boussahmain C, Mochel MC, Hoang MP. *Perilipin and adipophilin expression in sebaceous carcinoma and mimics*. Hum Pathol. 2013; 44(9):1811.
75. Straub BK, Herpel E, Singer S, Zimbelmann R, Breuhahn K, Macher-Goeppinger S, Warth A, Lehmann-Koch J, Longerich T, Heid H, Schirmacher P. *Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic steatogenesis*. Mod Pathol. 2010 Mar;23(3):480-92.
76. Straub BK, Gyoengyoesi B, Koenig M, Hashani M, Pawella LM, Herpel E, Mueller W, Macher-Goeppinger S, Heid H, Schirmacher P. *Adipophilin/perilipin-2 as a lipid droplet-specific marker for metabolically active cells and diseases associated with metabolic dysregulation*. Histopathology. 2013 Mar;62(4):617-31.
77. Chen WS, Chen PL, Li J, Lind AC, Lu D. *Lipid synthesis and processing proteins ABHD5, PGRMC1 and squalene synthase can serve as novel*

- immunohistochemical markers for sebaceous neoplasms and differentiate sebaceous carcinoma from sebaceoma and basal cell carcinoma with clear cell features.* J Cutan Pathol. 2013 Jul;40(7):631-8.
78. Tetzlaff MT. *Immunohistochemical markers informing the diagnosis of sebaceous carcinoma and its distinction from its mimics: Adipophilin and Factor XIIIa to the rescue?* J Cutan Pathol 2018 Jan;45(1):29-32.
79. Uhlenhake EE, Clark LN, Smoller BR, Shalin SC, Gardner JM. *Nuclear factor XIIIa staining (clone AC-1A1 mouse monoclonal) is a sensitive and specific marker to discriminate sebaceous proliferations from other cutaneous clear cell neoplasms.* J Cutan Pathol. 2016 Aug;43(8):649-56.
80. Clark LN, Elwood HR, Uhlenhake EE, Smoller BR, Shalin SC, Gardner JM. *Nuclear factor XIIIa staining (clone AC-1A1 mouse monoclonal) is a highly sensitive marker of sebaceous differentiation in normal and neoplastic sebocytes.* J Cutan Pathol. 2016; 43(8):657.
81. Tjarks BJ, Pownell BR, Evans C, et al. *Evaluation and comparison of staining patterns of factor XIIIa (AC-1A1), adipophilin and GATA3 in sebaceous neoplasia.* J Cutan Pathol. 2017 Sep 5.
82. Muir EG, Bell AJ, Barlow KA. *Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, and larynx associated with keratoacanthoma of the face.* Br J Surg. 1967;54(3):191-195.
83. Torre D. *Multiple sebaceous adenomas.* Arch Dermatol. 1968;98(5):549-551.
84. Mahalingam M. *MSH6, Past and Present and Muir-Torre Syndrome-Connecting the Dots.* Am J Dermatopathol. 2017 Apr;39(4):239-249.
85. John AM, Schwartz RA. *Muir-Torre syndrome (MTS): An update and approach to diagnosis and management.* J Am Acad Dermatol. 2016 Mar;74(3):558-66.
86. Okan G, Vural P, Ince Ü, Yazar A, Uras C, Saruç M. *Muir-Torre syndrome: a case report and review of the literature.* Turk J Gastroenterol. 2012 Aug;23(4):394-8.
87. Jessup CJ, Redston M, Tilton E, Reimann JD. *Importance of universal mismatch repair protein immunohistochemistry in patients with sebaceous neoplasia as an initial screening tool for Muir-Torre syndrome.* Hum Pathol. 2016 Mar;49:1-9.
88. Everett JN, Raymond VM, Dandapani M, Marvin M, Kohlmann W, Chittenden A, Koeppe E, Gustafson SL, Else T, Fullen DR, Johnson TM, Syngal S, Gruber SB, Stoffel EM. *Screening for germline mismatch repair mutations following diagnosis of sebaceous neoplasm.* JAMA Dermatol. 2014 Dec;150(12):1315-21.
89. Chhibber V, Dresser K, Mahalingam M. *MSH-6: extending the reliability of immunohistochemistry as a screening tool in Muir-Torre syndrome.* Mod Pathol. 2008 Feb;21(2):159-64.

90. Orta L, Klimstra DS, Qin J, Mecca P, Tang LH, Busam KJ, Shia J. *Towards identification of hereditary DNA mismatch repair deficiency: sebaceous neoplasm warrants routine immunohistochemical screening regardless of patient's age or other clinical characteristics.* Am J Surg Pathol. 2009 Jun;33(6):934-44.
91. Lee JB, Litzner BR, Vidal CI. *Review of the current medical literature and assessment of current utilization patterns regarding mismatch repair protein immunohistochemistry in cutaneous Muir-Torre syndrome-associated neoplasms.* J Cutan Pathol. 2017 Nov;44(11):931-937.
92. Ponti G, Ponz de Leon M. *Muir-Torre syndrome.* Lancet Oncol. 2005 Dec;6(12):980-7.
93. Singh RS, Grayson W, Redston M, Diwan AH, Warneke CL, McKee PH, Lev D, Lyle S, Calonje E, Lazar AJ. *Site and tumor type predicts DNA mismatch repair status in cutaneous sebaceous neoplasia.* Am J Surg Pathol. 2008 Jun;32(6):936-42.
94. Lazar AJ, Lyle S, Calonje E. *Sebaceous neoplasia and Torre-Muir syndrome.* Curr Diagn Pathol. 2007 Aug;13(4):301-319.
95. Woo JY, Suhng EA, Choi YW, Choi HY, Byun JY. *Cystic sebaceous tumour with no evidence of Muir-Torre syndrome.* J Eur Acad Dermatol Venereol. 2016 Jun;30(6):1038-9.
96. Abbas O, Mahalingam M. *Cutaneous sebaceous neoplasms as markers of Muir-Torre syndrome: a diagnostic algorithm.* J Cutan Pathol. 2009;36:613-619.
97. Cornejo KM, Hutchinson L, Deng A, Tomaszewicz K, Welch M, Lyle S, Dresser K, Cosar EF. *BRAF/KRAS gene sequencing of sebaceous neoplasms after mismatch repair protein analysis.* Hum Pathol. 2014 Jun;45(6):1213-2.
98. Boennelycke M, Thomsen BM, Holck S. *Sebaceous neoplasms and the immunoprofile of mismatch-repair proteins as a screening target for syndromic cases.* Pathol Res Pract. 2015 Jan;211(1):78-82.
99. Qiu W, Lei M, Li J, Wang N, Lian X. *Activated hair follicle stem cells and Wnt/ β -catenin signaling involve in pathogenesis of sebaceous neoplasms.* Int J Med Sci. 2014 Jul 30;11(10):1022-8.
100. Kim N, Kim JE, Choung HK, Lee MJ, Khwarg SI. *Expression of Shh and Wnt signaling pathway proteins in eyelid sebaceous gland carcinoma: clinicopathologic study.* Invest Ophthalmol Vis Sci. 2013 Jan 14;54(1):370-7.
101. Kumar A, Kumar Dorairaj S, Prabhakaran VC, Prakash DR, Chakraborty S. *Identification of genes associated with tumorigenesis of meibomian cell carcinoma by microarray analysis.* Genomics. 2007 Nov;90(5):559-66.

102. Kiyosaki K, Nakada C, Hijiya N, et al. *Analysis of p53 mutations and the expression of p53 and p21WAF1/CIP1 protein in 15 cases of sebaceous carcinoma of the eyelid.* Invest Ophthalmol Vis Sci 2010; 51:7-11.
103. Hussain RM, Matthews JL, Dubovy SR, et al. *UV-independent p53 mutations in sebaceous carcinoma of the eyelid.* Ophthal Plast Reconstr Surg 2014;30:392-395.
104. Shalin SC, Sakharpe A, Lyle S, Lev D, Calonje E, Lazar AJ. *p53 staining correlates with tumor type and location in sebaceous neoplasms.* Am J Dermatopathol. 2012 Apr;34(2):129-35.
105. Kwon MJ, Shin HS, Nam ES, et al. *Comparison of HER2 gene amplification and KRAS alteration in eyelid sebaceous carcinomas with that in other eyelid tumors.* Pathol Res Pract. 2015;211:349-355.
106. Lee MJ, Kim N, Choung HK, Choe JY, Khwarg SI, Kim JE. *Increased gene copy number of HER2 and concordant protein overexpression found in a subset of eyelid sebaceous gland carcinoma indicate HER2 as a potential therapeutic target.* J Cancer Res Clin Oncol. 2016 Jan;142(1):125-33.
107. Harvey NT, Tabone T, Erber W, Wood BA. *Circumscribed sebaceous neoplasms: a morphological, immunohistochemical and molecular analysis.* Pathology. 2016 Aug;48(5):454-62.
108. Tetzlaff MT, Singh RR, Seviour EG, Curry JL, Hudgens CW, Bell D, Wimmer DA, Ning J, Czerniak BA, Zhang L, Davies MA, Prieto VG, Broaddus RR, Ram P, Luthra R, Esmali B. *Next-generation sequencing identifies high frequency of mutations in potentially clinically actionable genes in sebaceous carcinoma.* J Pathol. 2016 Sep;240(1):84-95.
109. Tetzlaff MT, Curry JL, Yin V, et al. *Distinct pathways in the pathogenesis of sebaceous carcinomas implicated by differentially expressed microRNAs.* JAMA Ophthalmol 2015;133:1109-1116.
110. Kivelä T, Asko-Seljavaara S, Pihkala U, Hovi L, Heikkonen J. *Sebaceous carcinoma of the eyelid associated with retinoblastoma.* Ophthalmology. 2001 Jun;108(6):1124-8.
111. Olsen SH, Su LD, Thomas D, Fullen DR. *Telomerase expression in sebaceous lesions of the skin.* J Cutan Pathol. 2007 May;34(5):386-91.
112. Bell RJ, Rube HT, Xavier-Magalhães A, Costa BM, Mancini A, Song JS, Costello JF. *Understanding TERT Promoter Mutations: A Common Path to Immortality.* Mol Cancer Res. 2016 Apr;14(4):315-23.
113. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll I, Nagore E, Hemminki K, Schadendorf D, Kumar R. *TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma.* Science. 2013 Feb 22;339(6122):959-61.

114. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. *Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma*. Science. 2013 Feb 22;339(6122):957-9.
115. Scott GA, Laughlin TS, Rothberg PG. *Mutations of the TERT promoter are common in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma*. Mod Pathol. 2014 Apr;27(4):516-23.
116. Lin SY, Liao SL, Hong JB, Chu CY, Sheen YS, Jhuang JY, Tsai JH, Liao JY. *TERT promoter mutations in periocular carcinomas: implications of ultraviolet light in pathogenesis*. Br J Ophthalmol. 2016 Feb;100(2):274-7.
117. Cong YS, Wright WE, Shay JW. *Human telomerase and its regulation*. Microbiol Mol Biol Rev. 2002 Sep;66(3):407-25.
118. Venkatesan S, Khaw AK, Hande MP. *Telomere Biology - Insights into an Intriguing Phenomenon*. Cells. 2017;6(2):15.
119. O'Sullivan RJ, Karlseder J. *Telomeres: protecting chromosomes against genome instability*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Mar;11(3):171-81.
120. Yamada O, Kawachi K. *The role of the JAK-STAT pathway and related signal cascades in telomerase activation during the development of hematologic malignancies*. JAKSTAT. 2013 Oct 1;2(4):e25256.
121. Lu W, Zhang Y, Liu D, Songyang Z, Wan M. *Telomeres-structure, function, and regulation*. Exp Cell Res. 2013;319:133-41.
122. Shay JW, Wright WE. *Role of telomeres and telomerase in cancer*. Seminars in Cancer Biology. 2011;21(6):349-353.
123. Eastley N, Ottolini B, Garrido C, et al. *Telomere maintenance in soft tissue sarcomas*. Journal of Clinical Pathology. 2017;70(5):371-377.
124. Akincilar SC, Unal B, Tergaonkar V. *Reactivation of telomerase in cancer*. Cellular and Molecular Life Sciences. 2016;73:1659-1670.
125. Heidenreich B, Kumar R. *TERT promoter mutations in telomere biology* Mutat Res. 2017 Jan - Mar;771:15-31.
126. Kyo S, Takakura M, Fujiwara T, Inoue M. *Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers*. Cancer Sci. 2008 Aug;99(8):1528-38.
127. Zhang Y, Toh L, Lau P, Wang X. *Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) is a novel target of the Wnt/ β -catenin pathway in human cancer*. J Biol Chem. 2012 Sep 21;287(39):32494-511.
128. Vinagre J, Pinto V, Celestino R, Reis M, Pópulo H, Boaventura P, Melo M, Catarino T, Lima J, Lopes JM, Máximo V, Sobrinho-Simões M, Soares P.

- Telomerase promoter mutations in cancer: an emerging molecular biomarker?* Virchows Arch. 2014 Aug;465(2):119-33.
129. Heidenreich B, Rachakonda PS, Hemminki K, Kumar R. *TERT promoter mutations in cancer development*. Curr Opin Genet Dev. 2014 Feb;24:30-7.
130. Simon M, Hosen I, Gousias K, Rachakonda S, Heidenreich B, Gessi M, Schramm J, Hemminki K, Waha A, Kumar R. *TERT promoter mutations: a novel independent prognostic factor in primary glioblastomas*. Neuro Oncol. 2015 Jan;17(1):45-52.
131. Heidenreich B, Rachakonda PS, Hosen I, Volz F, Hemminki K, Weyerbrock A, Kumar R. *TERT promoter mutations and telomere length in adult malignant gliomas and recurrences*. Oncotarget. 2015 Apr 30;6(12):10617-33.
132. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz Jr LA, Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovanella BC, Grollman AP, He TC, He Y, Hruban RH, Jallo GI, Mandahl N, Meeker AK, Mertens F, Netto GJ, Rasheed BA, Riggins GJ, Rosenquist TA, Schiffman M, Shih le M, Theodorescu D, Torbenson MS, Velculescu VE, Wang TL, Wentzensen N, Wood LD, Zhang M, McLendon RE, Bigner DD, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Yan H. *TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal*. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Apr 9;110(15):6021-6.
133. Rachakonda PS, Hosen I, de Verdier PJ, Fallah M, Heidenreich B, Ryk C, Wiklund NP, Steineck G, Schadendorf D, Hemminki K, Kumar R. *TERT promoter mutations in bladder cancer affect patient survival and disease recurrence through modification by a common polymorphism*. Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Oct 22;110(43):17426-31.
134. Hosen I, Rachakonda PS, Heidenreich B, de Verdier PJ, Ryk C, Steineck G, Hemminki K, Kumar R. *Mutations in TERT promoter and FGFR3 and telomere length in bladder cancer*. Int J Cancer. 2015 Oct 1;137(7):1621-9.
135. Quaas A, Oldopp T, Tharun L, Klingensfeld C, Krech T, Sauter G, Grob TJ. *Frequency of TERT promoter mutations in primary tumors of the liver*. Virchows Arch Int J Pathol. 2014 Dec;465(6):673-7.
136. Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, Laurent A, Cherqui D, Balabaud C, Rossi JZ. *High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions*. Nat Commun. 2013;4:2218.
137. Griewank KG, Schilling B, Murali R, Bielefeld N, Schwamborn M, Sucker A, Zimmer L, Hillen U, Schaller J, Brenn T, Schadendorf D, Mentzel T. *TERT promoter*

- mutations are frequent in atypical fibroxanthomas and pleomorphic dermal sarcomas.* Mod Pathol. 2014 Apr;27(4):502-8.
138. Griewank KG, Murali R, Schilling B, Schimming T, Moller I, Moll I, Schwamborn M, Sucker A, Zimmer L, Schadendorf D, Hillen U. *TERT promoter mutations are frequent in cutaneous basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma.* PLoS One. 2013 Nov 18;8(11):e80354.
139. Campanella NC, Celestino R, Pestana A, Scapulatempoeto C, de Oliveira AT, Brito MJ, Gouveia A, Lopes JM, Guimaraes DP, Soares P, Reis RM. *Low frequency of TERT promoter mutations in gastrointestinal stromal tumors (GISTs).* Eur J Hum Genet. 2015 Jun;23(6):877-9.
140. Ma X, Gong R, Wang R, Pan Y, Cai D, Pan B, Li Y, Xiang J, Li H, Zhang J, Sun Y, Chen H. *Recurrent TERT promoter mutations in non-small cell lung cancers.* Lung Cancer. 2014 Dec;86(3):369-73.
141. Yuan P, Cao JL, Abuduwufuer A, Wang LM, Yuan XS, Lv W, Hu J. *Clinical Characteristics and Prognostic Significance of TERT Promoter Mutations in Cancer: A Cohort Study and a Meta-Analysis.* PLoS One. 2016 Jan 22;11(1):e0146803.
142. Griewank KG, Murali R, Puig-Butille JA, Schilling B, Livingstone E, Potrony M, Carrera C, Schimming T, Möller I, Schwamborn M, Sucker A, Hillen U, Badenas C, Malvey J, Zimmer L, Scherag A, Puig S, Schadendorf D. *TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma.* J Natl Cancer Inst. 2014 Sep 13;106(9).
143. Heidenreich B, Nagore E, Rachakonda PS, Garcia-Casado Z, Requena C, Traves V, Becker J, Soufir N, Hemminki K, Kumar R. *Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in primary cutaneous melanoma.* Nat Commun. 2014 Feb 26;5:3401.
144. Pópulo H, Boaventura P, Vinagre J, Batista R, Mendes A, Caldas R, Pardal J, Azevedo F, Honavar M, Guimarães I, Manuel Lopes J, Sobrinho-Simões M, Soares P. *TERT promoter mutations in skin cancer: the effects of sun exposure and X-irradiation.* J Invest Dermatol. 2014 Aug;134(8):2251-2257.
145. Macerola E, Loggini B, Giannini R, Garavello G, Giordano M, Proietti A, Niccoli C, Basolo F, Fontanini G. *Coexistence of TERT promoter and BRAF mutations in cutaneous melanoma is associated with more clinicopathological features of aggressiveness.* Virchows Arch. 2015 Aug;467(2):177-84.
146. Gaspar TB, Sá A, Lopes JM, Sobrinho-Simões M, Soares P, Vinagre J. *Telomere Maintenance Mechanisms in Cancer.* Genes (Basel). 2018 May 3;9(5).

147. Labussière M, Di Stefano AL, Gleize V, Boisselier B, Giry M, Mangesius S, Bruno A, Paterra R, Marie Y, Rahimian A, Finocchiaro G, Houlston RS, Hoang-Xuan K, Idbaih A, Delattre JY, Mokhtari K, Sanson M. *TERT promoter mutations in gliomas, genetic associations and clinico-pathological correlations.* Br J Cancer. 2014 Nov 11;111(10):2024-32.
148. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, Walsh KM, Decker PA, Sicotte H, Pekmezci M, Rice T, Kosel ML, Smirnov IV, Sarkar G, Caron AA, Kollmeyer TM, Praska CE, Chada AR, Halder C, Hansen HM, McCoy LS, Bracci PM, Marshall R, Zheng S, Reis GF, Pico AR, O'Neill BP, Buckner JC, Giannini C, Huse JT, Perry A, Tihan T, Berger MS, Chang SM, Prados MD, Wiemels J, Wiencke JK, Wrensch MR, Jenkins RB. *Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors.* N Engl J Med. 2015 Jun 25;372(26):2499-508.
149. Kinde I, Munari E, Faraj SF, Hruban RH, Schoenberg M, Bivalacqua T, Allaf M, Springer S, Wang Y, Diaz LA Jr, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Netto GJ. *TERT promoter mutations occur early in urothelial neoplasia and are biomarkers of early disease and disease recurrence in urine.* Cancer Res. 2013 Dec 15;73(24):7162-7.
150. Pietzak EJ, Bagrodia A, Cha EK, Drill EN, Iyer G, Isharwal S, Ostrovnaya I, Baez P, Li Q, Berger MF, Zehir A, Schultz N, Rosenberg JE, Bajorin DF, Dalbagni G, Al-Ahmadie H, Solit DB, Bochner BH. *Next-generation Sequencing of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Reveals Potential Biomarkers and Rational Therapeutic Targets.* Eur Urol. 2017 Dec;72(6):952-959.
151. Alzahrani AS, Qasem E, Murugan AK, Al-Hindi HN, AlKhafaji D, Almohanna M, Xing M, Alhomaidah D, AlSwaillem M. *Uncommon TERT Promoter Mutations in Pediatric Thyroid Cancer.* Thyroid. 2016 Feb;26(2):235-41.
152. R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
153. Lee BA, Yu L, Ma L, Lind AC, Lu D. *Sebaceous neoplasms with mismatch repair protein expressions and the frequency of co-existing visceral tumors.* J Am Acad Dermatol. 2012 Dec;67(6):1228-34.
154. Vinagre J, Almeida A, Pópulo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, Coelho R, Celestino R, Prazeres H, Lima L, Melo M, da Rocha AG, Preto A, Castro P, Castro L, Pardal F, Lopes JM, Santos LL, Reis RM, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M, Lima J, Máximo V, Soares P. *Frequency of TERT promoter mutations in human cancers.* Nat Commun. 2013;4:2185.

155. Liu X, Bishop J, Shan Y, Pai S, Liu D, Murugan AK, Sun H, El-Naggar AK, Xing M. *Highly prevalent TERT promoter mutations in aggressive thyroid cancers.* *Endocr Relat Cancer.* 2013 Jul 12;20(4):603-10.
156. Wang N, Liu T, Sofiadis A, Juhlin CC, Zedenius J, Höög A, Larsson C, Xu D. *TERT promoter mutation as an early genetic event activating telomerase in follicular thyroidadenoma (FTA) and atypical FTA.* *Cancer.* 2014 Oct 1;120(19):2965-79.
157. Heidenreich B, Denisova E, Rachakonda S, Sanmartin O, Dereani T, Hosen I, Nagore E, Kumar R. *Genetic alterations in seborrheic keratoses.* *Oncotarget.* 2017 May 30;8(22):36639-36649.
158. Liu R, Xing M. *TERT promoter mutations in thyroid cancer.* *Endocr Relat Cancer.* 2016 Mar;23(3):R143-55.
159. Hurst CD, Platt FM, Knowles MA. *Comprehensive mutation analysis of the TERT promoter in bladder cancer and detection of mutations in voided urine.* *Eur Urol.* 2014 Feb;65(2):367-9.
160. Descotes F, Kara N, Decaussin-Petrucci M, Piaton E, Geiguer F, Rodriguez-Lafrasse C, Terrier JE, Lopez J, Ruffion A. *Non-invasive prediction of recurrence in bladder cancer by detecting somatic TERT promoter mutations in urine.* *Br J Cancer.* 2017 Aug 8;117(4):583-587.
161. Liao JY, Liao SL, Hsiao CH, Lin MC, Chang HC, Kuo KT. *Hypermethylation of the CDKN2A gene promoter is a frequent epigenetic change in periocular sebaceous carcinoma and is associated with younger patient age.* *Hum Pathol.* 2014 Mar;45(3):533-9.
162. Pacifici M, Shore EM. *Common mutations in ALK2/ACVR1, a multi-faceted receptor, have roles in distinct pediatric musculoskeletal and neural orphan disorders.* *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016 Feb;27:93-104.
163. Sorkin M, Agarwal S, Ranganathan K, Loder S, Cholok D, Fireman D, Li J, Li S, Zhao B, Mishina Y, Cederna P, Levi B. *Hair follicle specific ACVR1/ALK2 critically affects skin morphogenesis and attenuates wound healing.* *Wound Repair Regen.* 2017 May;25(3):521-525.

