

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Identificación de alteraciones moleculares y nuevos marcadores
tumoraes en pacientes con melanoma metastásico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Leyla Patricia Blanco García

DIRECTORES

Dr. José Luis Rodríguez Peralto

Dra. Yolanda Ruano Domínguez

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas



TESIS DOCTORAL

**Identificación de alteraciones moleculares y nuevos marcadores
tumorales en pacientes con melanoma metastásico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Leyla Patricia Blanco García

DIRECTORES

Dr. José Luis Rodríguez Peralto

Dra. Yolanda Ruano Domínguez

Madrid

A mis padres, que nunca pusieron límite a mis sueños

A mis tíos y suegros, que me ayudaron a cumplirlos

Y a ti, Álvaro, por ser siempre mi pilar

AGRADECIMIENTOS

Escribir esta tesis doctoral no ha sido fácil, ha supuesto varios años de esfuerzo y dedicación, pero he tenido la suerte de estar rodeada de personas que con su granito de arena han hecho posible que pudiera cumplir este reto profesional, y por eso quiero agradecerles su inestimable apoyo.

En primer lugar, a la Dra. Yolanda Ruano, que no solo ha sido mi directora de tesis, ayudándome desde el principio a que este proyecto saliera adelante con su paciencia, dedicación y sabiduría; sino que además ha sido mi jefa durante más de 7 años en el laboratorio de Biología Molecular, transmitiéndome sus amplios conocimientos, no solo de ciencia, sino también de la vida. “Gracias” se queda corto.

En segundo lugar, al Dr. José Luis Rodríguez Peralto, tutor y director de esta tesis doctoral, pero también jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre, a quien agradezco la confianza en mí año tras año, permitiéndome crecer profesionalmente en este gran servicio. Gracias por tu inestimable apoyo, paciencia y enseñanzas.

Me gustaría agradecer también al grupo de investigación en Oncología cutánea, del que tengo suerte de formar parte, por su ayuda en la realización de este trabajo. En especial a la Dra. María Garrido y al Dr. Víctor Sánchez-Arévalo por haber contribuido con sus conocimientos y amplia experiencia. Así como también, a Raquel Blanco por su ayuda en el análisis estadístico, y a la Dra. Erica Riveiro por plantar la primera semilla para que este proyecto diera sus frutos.

Además, quiero agradecer al Instituto de Investigación del Hospital 12 de Octubre por facilitar los medios y recursos para poder realizar este trabajo. También a los servicios de Oncología Médica y Dermatología del H12O, así como al Grupo de Melanoma de la Dra. Soengas del CNIO, por su colaboración en este proyecto al facilitar las muestras necesarias para ampliar el estudio. Y a la Unidad de Investigación Clínica de Cáncer de Pulmón del Imas12 por su asistencia con la PCR digital.

Por su puesto, no puedo dejar de agradecer a todas las personas que forman parte del Servicio de Anatomía Patológica del H12O (patólogos, técnicos, secretarios y celadores) porque de una forma u otra han contribuido a mi crecimiento personal y profesional todos estos años. Pero en especial, quiero

agradecer profundamente a mis compañeros y excompañeros del Laboratorio de Biología molecular por su complicidad, apoyo, paciencia y amistad todos estos años. A Diana Cantero, a quien tengo el placer de conocer desde la universidad, por darme la oportunidad de emprender este camino laboral, gracias por tu experiencia (y conocimientos), pero sobre todo por tu amistad. A Rocío Cubo, por ser mi “partner in crime”, gracias por poder contar con tu apoyo y amistad todos estos años. Al resto de mis compañeros durante todos estos años: Lidia (por cuidar de mí), Borja, Álvaro y Roxana (por esos ratos de risas y descanso), Denisse (por las conversaciones y el chocolate), Fátima, Rocío, Vera, Nuria, Alicia (por hacer de patito de goma), Marta, Jacqueline, Susana, Samuel y muchos más. No me olvido de los alumnos en prácticas y rotantes, porque también me han enseñado a ser mejor profesional y han colaborado en este proyecto; en especial a mis patitos Íñigo, Patricia y Paula, gracias por seguir en mi vida.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a todas las personas que sin formar parte de mi entorno laboral han supuesto un gran apoyo durante el proceso de esta tesis doctoral.

A mis padres, Mariely y Francisco, que desde pequeña me han impulsado a creer en mis capacidades y buscar mis sueños. Su esfuerzo, dedicación y amor han hecho que me convierta en lo que soy y me inspiran a nunca rendirme en la búsqueda de ser una mejor persona. A mis hermanos, Sergio y Erika, por su cariño y apoyo durante toda mi vida, por esa complicidad que nos caracteriza.

A mis tíos, Priscila y Antonio, a los que debo el poder emprender una nueva vida aquí. Quienes hicieron de padres cuando los míos estaban lejos, y con su esfuerzo y sacrificio fueron artífices de que hoy sea quien soy personal y profesionalmente. A mi abuela Felisa y los que ya no están conmigo, Isidoro y Elia, quienes con su generosidad, sabiduría y amor han sido el mejor ejemplo de vida posible.

A Álvaro, mi compañero de vida, porque sin él no hubiera sido posible llegar hasta aquí. Porque es mi pilar día a día con su apoyo, amor, respeto y confianza. Gracias también a sus padres, Maribel y Manolo, que me acogieron con cariño en su familia y me han ayudado a cumplir este reto.

A mis cuñados, primos, sobrinos y amigos, aunque me quede sin espacio para nombraros, sabéis que os llevo en el corazón y os agradezco por el apoyo incondicional que me habéis dado durante este proyecto profesional y durante toda mi vida. “Lo esencial es invisible a los ojos”

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	15
ÍNDICE DE TABLAS.....	17
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	19
RESUMEN.....	23
SUMMARY	31
INTRODUCCIÓN.....	37
1. TUMORES MELANOCÍTICOS	37
2. MELANOMA.....	38
2.1 <i>Incidencia y mortalidad.....</i>	38
2.2 <i>Factores de Riesgo</i>	39
2.3 <i>Diagnóstico</i>	41
2.4 <i>Clasificación clínica e histológica</i>	47
2.5 <i>Alteraciones genéticas.....</i>	49
2.6 <i>Técnicas inmunofenotípicas y moleculares</i>	57
2.7 <i>Tratamiento</i>	67
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	73
1. JUSTIFICACIÓN	73
2. HIPÓTESIS	74
3. OBJETIVOS	74
MATERIAL Y MÉTODOS.....	79
1. SELECCIÓN DE CASOS Y CONTROLES	79
2. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS	80
2.1 <i>A partir de muestras de tejido</i>	80
2.2 <i>A partir de muestras de sangre periférica.....</i>	81
3. PIROSECUENCIACIÓN	81
4. SECUENCIACIÓN SANGER.....	84
5. PCR A TIEMPO REAL	85
6. PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN (MS-PCR)	86

7. PCR CUANTITATIVA DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT-QPCR).....	88
8. PCR DIGITAL (ddPCR)	89
9. MICROARRAYS DE SNPs	90
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DE SUPERVIVENCIA.....	93
RESULTADOS.....	97
1. DATOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS.....	97
2. MUTACIÓN DEL PROMOTOR DE <i>TERT</i> EN MELANOMA	99
2.1 Estado mutacional.....	99
2.2 Mutación de <i>pTERT</i> en muestras pareadas de melanoma primario y metástasis	101
2.3 Coexistencia de mutaciones en <i>BRAF</i> o <i>NRAS</i> y <i>pTERT</i>	102
3. METILACIÓN DEL PROMOTOR DE <i>TERT</i> EN MELANOMA.....	103
3.1 Estado de metilación	103
3.2 Estado de metilación en muestras pareadas de melanoma primario y metástasis.....	105
3.3 Estado de metilación en muestras <i>BRAF</i> o <i>NRAS</i> y/o <i>pTERT</i> mutadas.....	105
4. EXPRESIÓN DE <i>TERT</i> EN MELANOMA.....	106
4.1 Niveles de ARN mensajero (ARNm)	106
4.2 Niveles de expresión en muestras pareadas de melanoma primario y sus metástasis	108
4.3 Efecto de la mutación y/o metilación de la región promotora en los niveles de expresión.....	108
4.4 Efecto de la mutación en <i>BRAF</i> o <i>NRAS</i> en los niveles de expresión de <i>TERT</i>	110
5. RELACIÓN DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES EN <i>TERT</i> CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DE LOS PACIENTES CON MELANOMA.....	111
5.1 Sexo de los pacientes.....	112
5.2 Espesor de Breslow del tumor primario.....	113
6. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.....	114
6.1 Variables clínicas e histológicas.....	114
6.2 Variables moleculares.....	117
6.3 Ajuste del análisis de regresión de Cox por el método de Benjamini & Hochberg.....	122
7. NUEVOS BIOMARCADORES EN BIOPSIA LÍQUIDA PARA LA MONITORIZACIÓN DE LOS PACIENTES CON MELANOMA	122

7.1 Mutación de <i>pTERT</i>	122
7.2 Alteraciones cromosómicas.....	124
7.3 Mutación de <i>pTERT</i> vs alteraciones cromosómicas en plasma.....	129
DISCUSIÓN.....	133
1. LA MUTACIÓN DEL PROMOTOR DE <i>TERT</i> COMO EVENTO TEMPRANO EN LA PROGRESIÓN METASTÁSICA DEL MELANOMA.....	133
2. PAPEL DE LA HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR EN LA REGULACIÓN DE <i>TERT</i> Y LA PROGRESIÓN DEL MELANOMA	134
3. LA SOBREPRESIÓN DE <i>TERT</i> EN EL MELANOMA AVANZADO Y SU RELACIÓN CON LA MUTACIÓN DEL PROMOTOR	135
4. RELACIÓN DE LAS MUTACIONES CONDUCTORAS DE <i>BRAF</i> Y <i>NRAS</i> CON LAS ALTERACIONES EN <i>TERT</i>	136
5. ASOCIACIÓN DE LAS ALTERACIONES EN <i>TERT</i> CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS	137
6. EFECTO DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES EN <i>TERT</i> EN LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON MELANOMA	139
7. LA MUTACIÓN DE <i>pTERT</i> COMO BIOMARCADOR EN PLASMA PARA LA MONITORIZACIÓN DE PACIENTES CON MELANOMA METASTÁSICO.....	142
8. LAS ALTERACIONES CROMOSÓMICAS COMO BIOMARCADOR ALTERNATIVO EN PLASMA PARA LA MONITORIZACIÓN DE PACIENTES CON MELANOMA METASTÁSICO.....	143
9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	145
CONCLUSIONES.....	149
BIBLIOGRAFÍA.....	153
ANEXOS	167
<i>Anexo 1: Recopilación de los datos clínicos, histológicos y moleculares de los 53 pacientes con melanoma avanzado incluidos en el estudio.....</i>	<i>167</i>
<i>Anexo 2: Publicación científica relacionada con los resultados de la tesis doctoral</i>	<i>168</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Tipos de tumores melanocíticos	37
Figura 2: Criterios ABCDE para el diagnóstico precoz del melanoma y su diferenciación con los nevos melanocíticos benignos	42
Figura 3: Tinción con hematoxilina-eosina (H&E) que permite el diagnóstico diferencial de lesiones benignas y malignas, así como caracterizar histológicamente y estratificar los diferentes subtipos de melanoma cutáneo ...	43
Figura 4: Comparativa entre el índice de Breslow y los niveles de Clark como factores para medir la invasión tumoral del melanoma en la piel	44
Figura 5: Sistema TNM de estadificación del melanoma según la Octava Edición del Manual de Estadificación del Cáncer, desarrollado por el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC)	46
Figura 6: Subtipos principales de melanoma cutáneo según diversos criterios clínicos e histológicos	48
Figura 7: Principales vías de señalización molecular en melanoma	51
Figura 8: Localización de las principales mutaciones y elementos reguladores presentes en el <i>pTERT</i>	54
Figura 9: Localización de la Región Oncológica Hipermetilada de <i>TERT</i> (THOR).....	56
Figura 10: Imágenes de hematoxilina-eosina y marcadores inmunohistoquímicos en tumores melanocíticos ...	58
Figura 11: Imágenes de Hematoxilina-eosina y marcadores inmunohistoquímicos en tumores melanocíticos ..	59
Figura 12: Alteraciones cromosómicas en melanoma y nevus	60
Figura 13: Hibridación in situ fluorescente (FISH) en el diagnóstico de tumores melanocíticos ambiguos	62
Figura 14: Criterios comúnmente utilizados en la interpretación del FISH de melanoma.....	63
Figura 15: Alteraciones genéticas detectables en el ADN tumoral circulante	65
Figura 16: Esquema ilustrado del procedimiento de la pirosecuenciación	84
Figura 17: Secuencia de <i>pTERT</i> con las 4 islas CpG incluidas en el análisis de metilación.....	86
Figura 18: Ensayo de microarrays basado en sondas de inversión molecular	91
Figura 19: Ejemplo de mutaciones en <i>pTERT</i> detectadas mediante pirosecuenciación y secuenciación Sanger.....	100
Figura 20: Detección del estado de metilación del <i>pTERT</i> mediante PCR específica de metilación y electroforesis en gel de agarosa	103
Figura 21: Niveles de metilación de <i>pTERT</i> en muestras control y de melanoma.....	104
Figura 22: Estratificación de pacientes con <i>pTERT</i> hipermetilado e hipometilado.....	104
Figura 23: Asociación entre el estado mutacional y de metilación de <i>pTERT</i> en el melanoma.....	105

Figura 24: Asociación entre la metilación de <i>pTERT</i> y el estado mutacional de <i>BRAF</i> y <i>NRAS</i> en melanoma.	106
Figura 25: Niveles de expresión del ARNm de <i>TERT</i> en muestras control y de melanoma.	107
Figura 26: Estratificación de pacientes según los niveles de expresión del ARNm de <i>TERT</i> en melanoma	108
Figura 27: Asociación entre los niveles de expresión del ARNm de <i>TERT</i> y el estado mutacional de <i>pTERT</i> .	109
Figura 28: Asociación entre la expresión del ARNm de <i>TERT</i> y la metilación del promotor en melanoma.	110
Figura 29: Asociación entre las mutaciones conductoras de <i>NRAS</i> y <i>BRAF</i> y los niveles de expresión del ARNm de <i>TERT</i> .	111
Figura 30: Asociación entre las alteraciones en <i>TERT</i> , <i>BRAF</i> o <i>NRAS</i> y el sexo de los pacientes	112
Figura 31: Asociación entre las alteraciones en <i>TERT</i> y el espesor de Breslow del melanoma primario	113
Figura 32: Efecto de la edad al diagnóstico en la supervivencia de los pacientes con melanoma	115
Figura 33: Efecto de la ulceración en la supervivencia de los pacientes con melanoma	115
Figura 34: Efecto del espesor de Breslow del melanoma primario en la supervivencia de los pacientes	116
Figura 35: Efecto de la mutación del promotor de <i>TERT</i> en la supervivencia de pacientes con melanoma	118
Figura 36: Efecto de la expresión del ARNm de <i>TERT</i> en la supervivencia de pacientes con melanoma	119
Figura 37: Efecto de la coexistencia de mutaciones en <i>pTERT</i> y <i>BRAF</i> o <i>NRAS</i> en la supervivencia de los pacientes con melanoma	121
Figura 38: Efecto combinado de las alteraciones en el <i>pTERT</i> en la supervivencia de los pacientes	122
Figura 39: Detección de mutaciones en el promotor de <i>TERT</i> mediante PCR digital.	123
Figura 40: Genoma completo de la muestra de plasma del caso 41 obtenida a partir del análisis por microarrays de SNP.	126
Figura 41: Análisis comparativo de las aberraciones cromosómicas detectadas en tejido y plasma de un paciente con melanoma a partir de microarrays de SNP (caso 15).	126
Figura 42: Análisis comparativo de las aberraciones cromosómicas detectadas en tejido y plasma de un paciente con melanoma a partir de microarrays de SNP (caso 43).	127
Figura 43: Análisis comparativo de las aberraciones cromosómicas detectadas en tejido y plasma de un paciente con melanoma a partir de microarrays de SNP (caso 46)	128
Figura 44: Análisis comparativo de las aberraciones cromosómicas detectadas en tejido y plasma de un paciente con melanoma a partir de microarrays de SNP (caso 2).	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Diseño del ensayo de pirosecuenciación para la detección de mutaciones de pTERT.	82
Tabla 2: Diseño del ensayo de la PCR específica de metilación para el análisis de metilación de <i>pTERT</i>	87
Tabla 3: Datos clínicos e histológicos de 53 pacientes con melanoma metastásico	97
Tabla 4: Frecuencias de mutación del promotor de TERT en muestras de melanoma (primario y metástasis) y muestras control (piel normal, nevus y líneas celulares) analizadas por pirosecuenciación.	99
Tabla 5: Frecuencias de mutación del promotor de TERT en muestras pareadas en muestras de tejido de tumores primarios y sus metástasis pertenecientes a 35 pacientes de melanoma.	101
Tabla 6: Coexistencia de mutaciones del promotor de TERT y mutaciones de BRAF/NRAS en muestras de tejido de 44 pacientes con melanoma.....	102
Tabla 7: Análisis de regresión de Cox univariante incluyendo las variables clínicas e histológicas de 53 pacientes con melanoma.	117
Tabla 8: Análisis de regresión de Cox univariable incluyendo las variables moleculares de 53 pacientes con melanoma.	119
Tabla 9: Frecuencia de mutación del promotor de TERT en muestras pareadas de tumores de tejido primario o metástasis, y plasma de 25 pacientes con melanoma analizadas por PCR digital (ddPCR).....	124

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico	MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos
ADNet: ADN circulante tumoral	MS PCR: PCR específica de metilación
AJCC: American Joint Committee on Cancer	NFκB: factor nuclear kappaB
ARNm: ARN mensajero	NGS: secuenciación de nueva generación
BRAF: protooncogén B-Raf, serina/treonina quinasa	NRAS: homólogo del oncogén viral RAS del neuroblastoma (v-ras)
CDKN2A: inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
cfDNA: ADN circulante libre de células	pTERT: región promotora de <i>TERT</i>
CNV: variaciones en el número de copias cromosómicas	qPCR: PCR cuantitativa
CpG: pares de citosina y guanina enlazados por fosfatos	RT-qPCR: PCR cuantitativa de transcripción inversa
CTCs: células tumorales circulantes	SG: supervivencia global
ddPCR: PCR digital	SLP: supervivencia libre de progresión
ETS/TC: E-twenty-six/ternary complex factors	SNP: polimorfismos de nucleótido único
FFPE: fijado con formal y embebido en parafina	TCGA: Atlas del genoma del cáncer
FISH: Hibridación in situ fluorescente	THOR: Región Oncológica Hipermetilada de <i>TERT</i>
GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	TERT: Transcriptasa reversa de la telomerasa
H&E: hematoxilina-eosina	TNM: tamaño tumoral, ganglios y metástasis (sistema de estadificación en cáncer)
IHC: Inmunohistoquímica	UV o UVR: radiación ultravioleta
LDH: Lactato deshidrogenasa	WT: <i>wild-type</i> o tipo salvaje

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El melanoma es la forma más agresiva de cáncer de piel y la principal causa de muerte por tumores cutáneos, debido a su alta resistencia al tratamiento clásico y su tendencia intrínseca a metastatizar. Las mutaciones frecuentes *BRAF*^{V600} (40-60%) y *NRAS*^{Q61} (15-20%) son mutaciones conductoras que persisten durante la diseminación metastásica y que son de gran utilidad en la monitorización de la enfermedad incluso en muestras de plasma. Sin embargo, una proporción considerable de pacientes carecen de estas mutaciones, por lo que existe la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas.

En la última década, se han detectado mutaciones en la región promotora del gen *TERT* (*pTERT*) en un alto porcentaje de melanomas (70%) que generan un aumento de la expresión de la telomerasa. Esta sobreexpresión se ha asociado con un carácter agresivo de la enfermedad y una peor supervivencia. Además, otras alteraciones moleculares parecen estar implicadas en la sobreexpresión de *TERT* durante el desarrollo tumoral, como la hipermetilación del promotor, que se ha asociado con una peor supervivencia en cáncer. Sin embargo, se han publicado resultados contradictorios sobre el efecto de estas alteraciones en la regulación de *TERT* y su papel en melanoma.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Dada su alta frecuencia en melanoma y la existencia de diferencias entre unas investigaciones y otras, entre los objetivos de este estudio se encuentra analizar el efecto de las mutaciones del promotor de *TERT* (*pTERT*) en la expresión del ARNm en las diferentes etapas del melanoma y su relación con otras alteraciones como la hipermetilación del promotor, la presencia o no de mutaciones conductoras (*BRAF* y *NRAS*) y las características clínicas e histológicas de los pacientes; con el fin de esclarecer el papel de *TERT* en la progresión y supervivencia del melanoma metastásico, así como confirmar su posible utilidad como un biomarcador pronóstico y/o predictivo de la enfermedad tanto en muestras de tejido como de plasma.

Por otro lado, existen pacientes con melanoma que carecen de mutaciones en *BRAF*, *NRAS* o *TERT* y que demandan el desarrollo de nuevas herramientas para el seguimiento de la enfermedad. Dado que casi la totalidad de los melanomas presentan aberraciones cromosómicas, otro objetivo adicional de este estudio es valorar las ganancias y pérdidas cromosómicas como nuevos biomarcadores potencialmente útiles en la monitorización del melanoma avanzado mediante su análisis con microarrays tanto en muestras de tejido como de plasma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron un total de 88 muestras de tejido FFPE pertenecientes a 53 pacientes diagnosticados con melanoma avanzado (estadios III y IV) en el Hospital Universitario 12 de Octubre, entre los años 2002 y 2020. De estos pacientes, 35 participaron con muestras pareadas de melanoma primario y metástasis. Además, se recogieron muestras de sangre periférica de 25 de los 53 pacientes incluidos en el estudio antes del inicio del tratamiento sistémico.

El estado mutacional de *pTERT* se analizó mediante pirosecuenciación y secuenciación Sanger en el ADN extraído de las muestras de tejido FFPE; y por PCR digital (ddPCR) en las muestras de ADN circulante obtenido a partir de muestras de plasma. Las mutaciones (*BRAF* y *NRAS*) se detectaron mediante PCR a tiempo real. Por su parte, el estado de metilación de *pTERT* se evaluó mediante PCR específica de metilación (MS-PCR) y los niveles de expresión de ARNm de *TERT* se determinaron con una PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR). Por último, las aberraciones cromosómicas se analizaron con microarrays de SNP en muestras de tejido y de plasma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran frecuencias de mutación (69%) e hipermetilación (48%) para *pTERT* similares a las reportadas previamente, siendo la mutación C250T la más frecuente. Además, el estado mutacional y de metilación de *pTERT* se mantuvo en el 77% y el 81% de los pacientes con muestras pareadas de melanoma primario y metástasis, respectivamente, lo

que sugiere que las alteraciones de *pTERT* podrían aparecer de forma temprana durante la expansión clonal de las células tumorales, siendo importantes para la progresión metastásica.

Asimismo, los niveles de expresión de ARNm de *TERT* también tendían a mantenerse en el 65,5% de los pacientes con muestras pareadas de melanoma primario y metástasis. En esta serie, se observaron niveles altos de expresión de ARNm de *TERT* en tumores que carecen de mutaciones en *pTERT*, lo que puede deberse a la presencia de otras alteraciones como la hipermetilación. Al estratificar los pacientes según el tipo de mutación de *pTERT*, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la mutación C250T y una mayor expresión de ARNm de *TERT* en comparación con la mutación C228T, a diferencia de estudios previos en los que observaron lo contrario.

Por otro lado, se observaron altos niveles de metilación en el 68% de los melanomas que carecían de mutaciones de *pTERT* en comparación con el 40% de las muestras con mutación de *pTERT*. Sin embargo, a diferencia de estudios previos, este hallazgo no se asoció estadísticamente con mayores niveles de expresión de ARNm, probablemente debido a la baja proporción de muestras *wild type* (WT) en nuestra serie de pacientes con melanoma avanzado.

Por otra parte, se observó que la mutación C250T de *pTERT* era más frecuente en los pacientes con mutación de *NRAS*, pero ambas se asociaban de manera independiente con altos niveles de expresión del ARNm de *TERT*. Por lo tanto, parece existir una sinergia entre las mutaciones conductoras *BRAF/NRAS* y *TERT* en pacientes con melanoma, explicada por la activación del gen *TERT* promovida por la señalización de la vía MAPK.

Del mismo modo, se evaluó la asociación entre las alteraciones de *TERT* y las características clínico-patológicas, confirmándose que la mutación C250T fue más frecuente en melanomas con alto grosor de Breslow (>4 mm) que a su vez mostraron niveles más altos de expresión de *TERT*. Este aumento de actividad de la telomerasa podría desempeñar un papel en el crecimiento e invasión tumoral. También se observó que los varones mostraron una mayor frecuencia de mutación de *pTERT* y de *BRAF* que las mujeres, pero las mujeres mostraron una mayor proporción de la mutación C250T, así como

mayores niveles de expresión de ARNm de *TERT*. Esta asociación entre el sexo de los pacientes y las alteraciones en *TERT* puede deberse a que su activación es sensible a los estrógenos y andrógenos, lo que podría tener relevancia en el enfoque de nuevas estrategias terapéuticas.

Los análisis de supervivencia revelaron que la mutación C250T estaba significativamente relacionada con una peor supervivencia global (SG) y una peor supervivencia libre de progresión (SLP) en los pacientes con melanoma. Además, los pacientes con altos niveles de expresión de ARNm de *TERT* mostraron una peor SG y SLP que los pacientes con niveles bajos. Sin embargo, el ajuste de los valores de *P* por el método de comparaciones múltiple de Benjamini & Hochberg reveló que solo el estado de mutación de *pTERT* se asoció significativamente con la SG y la SLP, donde la mutación C250T mostró el mayor efecto sobre la progresión y el desenlace en pacientes con melanoma avanzado. Por tanto, los resultados de este estudio confirman que las mutaciones C250T y C228T no son funcionalmente redundantes como indicaban los primeros estudios sobre *TERT* y la presencia de la mutación C250T podría ser un predictor significativo de una peor supervivencia y un peor pronóstico en pacientes con melanoma avanzado (estadios III y IV).

Finalmente, se evaluaron las mutaciones de *pTERT* y las aberraciones cromosómicas como biomarcadores potenciales en plasma para la monitorización de los pacientes con melanoma. Se detectaron mutaciones en *pTERT* en el 52% de las muestras de plasma. Además, el estado de mutación de *pTERT* se mantuvo en el 56% de las muestras pareadas de tejido y plasma. Por su parte, se detectaron alteraciones cromosómicas en el 25% de los plasmas analizados, observándose alteraciones en común con las detectadas en tejido. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que las mutaciones de *pTERT* y las aberraciones cromosómicas podrían servir como un valioso biomarcador en plasma, además de la mutación V600 de *BRAF*, para la monitorización de pacientes con melanoma avanzado.

CONCLUSIONES

Nuestros hallazgos confirman la amplia prevalencia de mutaciones en *pTERT* en el melanoma metastásico y sugieren que la mutación C250T es más agresiva que la mutación C228T ya que se asocia con niveles más altos de expresión de ARNm de *TERT*, un mayor espesor de Breslow y una peor supervivencia en estadios avanzados de la enfermedad, lo que parece indicar que ambas mutaciones no son funcionalmente redundantes y tienen un papel diferente en la activación transcripcional de *TERT*. A su vez, la hipermetilación de la región promotora parece desempeñar un papel en la progresión de los pacientes que carecen de mutaciones en *pTERT*.

Además, se detectó una correlación positiva entre las muestras pareadas de tumor primario y metastásico en el estado de mutación y de metilación de *pTERT*, lo que indica que las alteraciones de *TERT* aparecen de forma temprana durante la expansión clonal de las células tumorales. También se observó una asociación entre el estado mutacional de *BRAF* y *NRAS* y las alteraciones en *TERT*, lo que sugiere la existencia de una sinergia entre las mutaciones conductoras en la regulación de *TERT* en el melanoma. En particular, las mutaciones de *pTERT*, así como las aberraciones cromosómicas, podrían utilizarse como biomarcadores en tejido o plasma para monitorizar pacientes en estadios avanzados que son negativos para *BRAF*, *NRAS* y *TERT*.

SUMMARY

INTRODUCTION

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer and the leading cause of death from skin tumors, due to its high resistance to classical treatment and its intrinsic tendency to metastasize. The frequent mutations *BRAF*^{V600} (40-60%) and *NRAS*^{Q61} (15-20%) are driver mutations that persist during metastatic dissemination and they are useful for monitoring disease even in plasma samples. However, a significant proportion of patients lack these mutations, so there is a need to find new biomarkers and therapeutic targets.

In the last decade, *TERT* promoter (*pTERT*) mutations have been detected in a high percentage of melanomas (70%), which generate an increase in telomerase expression. This overexpression has been associated with aggressive disease and worse survival. In addition, other molecular alterations appear to be involved in *TERT* overexpression during tumor development, such as promoter hypermethylation, which has been associated with worse survival in cancer. However, conflicting results have been published on the effect of these alterations on *TERT* regulation and its role in melanoma.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

Given its high frequency in melanoma and the existence of differences between some studies, among the objectives of this study is to analyze the effect of *TERT* promoter mutations in mRNA expression at different stages of melanoma and its relationship with other alterations such as promoter hypermethylation, the presence or absence of driver mutations (*BRAF* and *NRAS*), and the clinical and histological characteristics of patients; in order to clarify the role of *TERT* in the progression and survival of metastatic melanoma, as well as to confirm its possible usefulness as a prognostic and/or predictive biomarker of the disease in both tissue and plasma samples.

On the other hand, there are melanoma patients who lack mutations in *BRAF*, *NRAS* or *TERT* and who demand the development of new tools to monitor the disease. Since almost all melanomas present chromosomal aberrations, another additional objective of this study is to evaluate chromosomal

gains and losses as new biomarkers potentially useful in the monitoring of advanced melanoma through microarrays analysis in both tissue and plasma samples.

MATERIALS AND METHODS

A total of 88 FFPE tissue samples were analyzed from 53 patients diagnosed with advanced melanoma (stages III and IV) at Hospital Universitario 12 de Octubre between 2002 and 2020. Of these patients, 35 participated with paired samples of primary melanoma and metastasis. In addition, plasma samples were collected from 25 of the 53 patients included in the study before systemic treatment.

pTERT mutational status was analyzed by pyro-sequencing and Sanger sequencing in DNA extracted from FFPE tissue samples; and by digital PCR (ddPCR) in circulating DNA samples obtained from plasma samples. *BRAF* and *NRAS* mutations were detected by real-time PCR. On the other hand, *pTERT* methylation status was evaluated by methylation-specific PCR (MS-PCR) and *TERT* mRNA expression levels were determined with a quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). Finally, chromosomal aberrations were detected by SNP microarrays in tissue and plasma samples.

RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained in this study show *pTERT* mutation (69%) and hypermethylation (48%) frequencies similar to those previously reported, showing that C250T is the most frequent mutation. In addition, *pTERT* mutation and methylation status was maintained in 77% and 81% of patients with paired samples of primary melanoma and metastases, respectively, suggesting that *pTERT* alterations may appear early during clonal expansion of tumor cells, being important for metastatic progression.

Likewise, *TERT* mRNA expression levels also tended to be maintained in 65.5% of patients with paired samples of primary melanoma and metastases. In this series, high *TERT* mRNA expression levels were observed in tumors that lack *pTERT* mutations, which may be due to the presence of other alterations such as hypermethylation. When patients were stratified according to the *pTERT* mutation type, a significant association was found between the C250T mutation and a higher expression of *TERT* compared to the C228T mutation, unlike previous studies in which they observed the opposite.

Moreover, high methylation levels were observed in 68% of melanomas lacking *pTERT* mutations compared to 40% of *pTERT* mutated samples. However, unlike previous studies, this finding was not statistically associated with higher mRNA expression levels, probably due to the low proportion of wild-type (WT) samples in the series of patients with advanced melanoma.

On the other hand, *pTERT* C250T mutation was more frequent in combination with *NRAS* mutations, but both were independently associated with high *TERT* mRNA expression levels. Therefore, there appears to be a synergy between *BRAF/NRAS* and *TERT* in patients with melanoma, explained by *TERT* gene activation promoted by MAPK signaling.

Likewise, the association between *TERT* alterations and clinical-pathological characteristics was evaluated, confirming that the C250T mutation was more frequent in melanomas with high Breslow thickness (>4 mm) that in turn showed higher *TERT* expression levels. This increased telomerase activity could play a role in tumor growth and invasion. It was also observed that men showed a higher frequency of *pTERT* and *BRAF* mutations than women, but women showed a higher proportion of the C250T mutation, as well as higher *TERT* mRNA expression levels. This association between the sex of the patients and *TERT* alterations may be due to its activation being sensitive to estrogens and androgens, which could have relevance in the approach of new therapeutic strategies.

Survival analyses revealed that the C250T mutation was significantly associated with worse overall survival (OS) and worse progression-free survival (PFS) in melanoma patients. In addition, patients with high *TERT* mRNA expression levels showed worse OS and PFS than patients with low levels. However, *P* values adjustment by the Benjamini & Hochberg multiple comparison method revealed that only *pTERT* mutational status was significantly associated with OS and PFS, where the C250T mutation showed the greatest effect on progression and outcome in patients with advanced melanoma. Therefore, the results of this study confirm that the C250T and C228T mutations are not functionally redundant as indicated by the first studies on *TERT* and the presence of the C250T mutation could be a significant predictor of worse survival and worse prognosis in patients with advanced melanoma (stages III and IV).

Finally, *pTERT* mutations and chromosomal aberrations were evaluated as potential plasma biomarkers for monitoring melanoma patients. *pTERT* mutations were detected in 52% of plasma samples. In addition, *pTERT* mutation status was maintained in 56% of paired tissue and plasma samples. Chromosomal alterations were detected in 25% of the plasmas analyzed, showing alterations in common with those detected in tissue. These findings support the hypothesis that *pTERT* mutations and chromosomal aberrations could be used as valuable plasma biomarkers, in addition to the *BRAF* V600 mutation, for monitoring patients with advanced melanoma.

CONCLUSIONS

Our findings confirm the high prevalence of *pTERT* mutations in metastatic melanoma and suggest that the C250T mutation is more aggressive than the C228T mutation as it shows higher *TERT* mRNA expression levels, higher Breslow thickness and poorer survival in advanced stages of the disease, suggesting that both mutations are not functionally redundant and have a different role in *TERT* transcriptional activation. In turn, *pTERT* hypermethylation appears to play a role in the progression of patients lacking *pTERT* mutations.

In addition, a positive correlation was detected between paired primary and metastatic tumor samples in the *pTERT* mutational and methylation status, indicating that *TERT* alterations appear early during clonal expansion of tumor cells. An association was also observed between the *BRAF* and *NRAS* mutational status and *TERT* alterations, suggesting the existence of a synergy between the driver mutations and *TERT* regulation in melanoma. In particular, *pTERT* mutations, as well as chromosomal aberrations, could be used as biomarkers in tissue or plasma for monitoring patients in advanced stages that are negative for *BRAF*, *NRAS* and *TERT* alterations.

INTRODUCCIÓN

1. TUMORES MELANOCÍTICOS

Los tumores melanocíticos son un tipo de neoplasia originada en los melanocitos, que son células pigmentadas con función protectora que se localizan en la epidermis (1–4). Los melanocitos pueden proliferar de forma ordenada y controlada, generando lesiones benignas conocidas como *nevus*, o de manera descontrolada, dando lugar a lesiones malignas denominadas melanomas (Figura 1) (5,6).

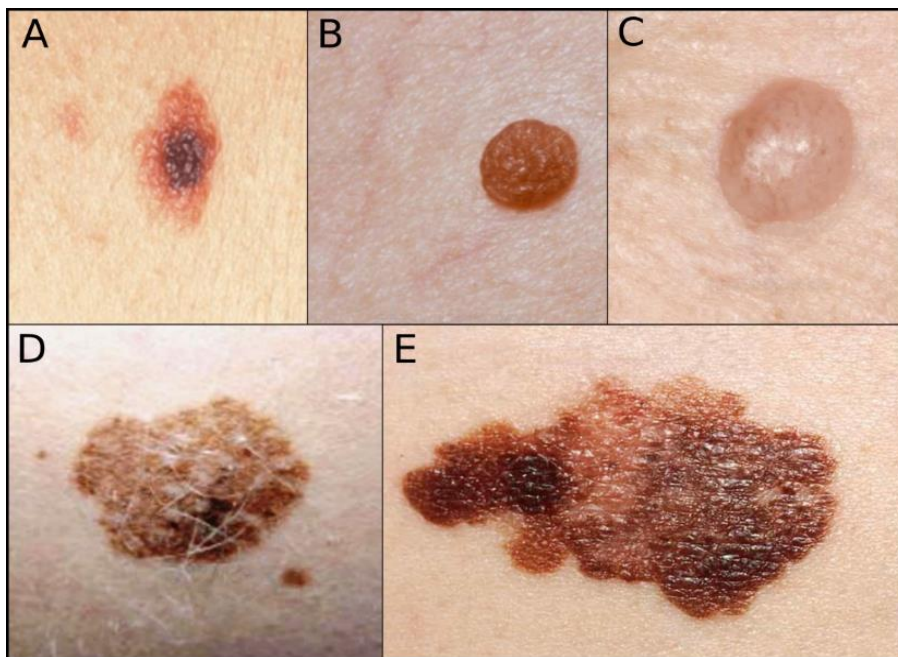


Figura 1: Tipos de tumores melanocíticos. A. *Nevus* melanocítico adquirido de tipo juntural. B. *Nevus* melanocítico adquirido compuesto. C. *Nevus* melanocítico adquirido intradérmico. D. *Nevus* melanocítico congénito. E. Tumor melanocítico maligno o melanoma (Imágenes obtenidas de AIM at Melanoma Foundation en www.aimatmelanoma.org y de Garnacho y Moreno, Fotoprotección. *Pediatría Integral*, 2012)(7,8)

Los *nevus* melanocíticos son las neoplasias benignas más comunes en el ser humano, por lo que cada vez son más frecuentes las consultas relacionadas con su potencial de malignidad, así como sobre la necesidad de tratamiento. Se ha comprobado que la exposición solar intermitente provoca mutaciones en las células madre melanocíticas de la unión dermoepidérmica, dando lugar a los *nevus* cuando estas células mutadas proliferan. A lo largo de su desarrollo podrán experimentar cambios e incluso malignizar, pero en general la mayoría de los *nevus* melanocíticos no precisan tratamiento y un buen seguimiento es más que suficiente para estar tranquilos y convencidos de su benignidad (8–10).

Los *nevus* melanocíticos se clasifican según el momento de su aparición en *nevus* adquiridos y en *nevus* congénitos. Los *nevus* adquiridos comienzan a aparecer habitualmente a partir de los 2 años. Luego aumentan en tamaño y número durante la infancia y adolescencia, hasta alcanzar un máximo en la tercera o cuarta década de la vida. Los *nevus* melanocíticos adquiridos se producen por la proliferación de células névicas o nevocitos, que son melanocitos modificados que pierden su forma dendrítica y tienden a retener pigmento melánico. Pueden ser de tres tipos diferentes según como se distribuyan dichas células: junturales (lesión plana), compuestos (lesión verrugosa o papular) o intradérmicos (lesión cupuliforme) (Figura 1A, 1B y 1C). Por su parte, los *nevus* congénitos son aquellos que se encuentran presentes en el momento del nacimiento o que aparecen antes de los dos años de vida. Aumentan de tamaño con el tiempo, pudiendo ocupar grandes superficies de la piel, y tienden a engrosarse y arrugarse. Dentro de ellos pueden aparecer nódulos proliferativos benignos (Figura 1D) (7,8,10).

Por su parte, el desarrollo de melanoma surge como resultado de una transformación de carácter maligno de los melanocitos, debido a la acumulación de mutaciones génicas que alteran diferentes vías de señalización celular, favoreciendo características tumorales como la proliferación y la supervivencia (Figura 1E). Desde el punto de vista clínico y de salud pública, los melanomas son el grupo más importante entre los cánceres de piel, ya que, aunque son menos comunes que los tumores malignos epiteliales, son mucho más mortales debido a su tendencia intrínseca a metastatizar. La radiación ultravioleta intermitente en dosis altas es el principal factor de riesgo medioambiental, a menudo en combinación con factores endógenos, incluida la susceptibilidad genética (6).

2. MELANOMA

2.1 Incidencia y mortalidad

El melanoma afecta predominantemente a los caucásicos de piel clara, aunque también puede presentarse en grupos étnicos caracterizados por una piel más pigmentada. Se ha observado un crecimiento considerable en las tasas de incidencia de este tipo de cáncer asociado principalmente al aumento de la exposición solar de tipo vacacional, aunque los datos recientes indican que esta tendencia

podría estar estabilizándose debido a la concienciación de la población. Por tanto, la prevención primaria y la detección de lesiones tempranas se consideran el enfoque más prometedor para la reducción de la mortalidad por melanoma (11,12).

Según datos recientes, en la actualidad se diagnostican más de 320 mil casos de melanoma al año en todo el mundo, de los cuales 150 mil ocurren en mujeres y 170 mil en hombres. La edad promedio del diagnóstico es a los 65 años, aunque también pueden desarrollarse en personas más jóvenes, incluso en menores de 30 años. En pacientes jóvenes, es más común en mujeres que en hombres (11,12).

El melanoma representa alrededor del 1% de todos los tipos de cáncer de piel diagnosticados, pero es el que produce la mayor cantidad de muertes. Durante el año 2020, el melanoma fue la causa de más de 50 mil muertes en todo el mundo. La tasa de supervivencia a 5 años es del 93%; esto se debe a que la mayoría de los pacientes se curan con cirugía inicial. Sin embargo, esta tasa disminuye al 68% en aquellos en los que el melanoma se disemina a los ganglios linfáticos cercanos; y hasta alrededor de un 30%, si se ha diseminado a distancia. No obstante, estos datos varían en función de las características del melanoma primario y de diferentes factores de riesgo (11,12).

2.2 Factores de Riesgo

Actualmente el melanoma se considera una enfermedad multifactorial en la que se da una interacción entre la susceptibilidad genética y la exposición medioambiental, y ambos factores juegan un papel importante en su etiología. Entre los componentes familiares y genéticos se incluyen la edad, el fototipo de piel, el número de *nevus* y si estos son atípicos; así como los antecedentes familiares de cáncer de piel. Dichos factores predictivos son los más importantes para estimar el riesgo de sufrir un melanoma, pero son los factores externos o medioambientales, los que han tenido un mayor peso en el aumento de la incidencia de melanoma en los últimos 50 años (13).

2.2.1 Factores genéticos

La edad es uno de los principales factores en el desarrollo de la enfermedad. El melanoma afecta en mayor medida a la población de edad media. En niños es raro que aparezca y, si lo hace, su

comportamiento suele ser benigno. Se ha podido comprobar, según estudios estadísticos, que la localización cutánea en la que se desarrolla la enfermedad puede venir determinada por la edad. Las localizaciones de exposición solar crónica se ven afectadas a edades tardías (cabeza y cuello), mientras que las de exposición solar intermitente lo hacen a edades más tempranas (tronco y extremidades) (6,13).

Los antecedentes personales son también un factor a considerar. De manera que toda persona que haya padecido un cáncer de piel es más propensa a desarrollar otro, debido a que las células de su piel presentan daños solares irreversibles. Además, las personas con algunas enfermedades de la piel como la denominada xeroderma pigmentosum, la epidermodisplasia verruciforme o el albinismo, tienen mayor riesgo de desarrollar un melanoma en edades tempranas. Asimismo, la infección por el papiloma virus puede aumentar todavía más este riesgo. Las personas con sistemas inmunes debilitados tienen también más probabilidades de desarrollar melanoma; como por ejemplo las personas con inmunodeficiencia por trasplantes de órganos o las infectadas con virus (11,12,14).

También pueden tener importancia las lesiones precursoras, ya que tienen también más riesgo de desarrollar un melanoma a posteriori; por ejemplo, las personas que tienen múltiples lunares (*nevus*) o las personas con un *nevus* congénito gigante. En estos casos es obligatorio realizar revisiones periódicas y extirpar toda lesión sospechosa (6,11,13).

Por último, nos encontramos los antecedentes familiares. En el melanoma, la herencia juega un papel muy importante. El riesgo es mayor si un pariente próximo (madre, padre, hermano o hijo) ha padecido melanoma. Aproximadamente el 10% de los pacientes con melanoma tienen antecedentes en la familia, según datos recientes de la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). En contrapartida, otros tipos de tumores cutáneos no presentan carácter hereditario (6,11,12).

2.2.2 Factores ambientales

Aunque los factores genéticos pueden tener una mayor influencia en el riesgo de padecer melanoma, prácticamente todos los cánceres de piel están relacionados, al menos en parte, con la exposición a los rayos ultravioleta. La exposición intermitente a la radiación ultravioleta, UVR en sus

siglas en inglés, es el principal factor de riesgo ambiental para desarrollar un melanoma, especialmente si se combina con los factores endógenos como el tipo de piel o la predisposición genética (13,14).

La luz solar es la principal fuente de rayos UV, pero también las lámparas solares. La exposición a los rayos UV estimula a los melanocitos a producir más melanina lo que puede iniciar un daño en las células de la piel y en el ADN, por la formación de dímeros de pirimidina. Exposiciones más intensas a dicha radiación pueden provocar quemaduras solares, lo que indicaría muerte celular. Sin embargo, la relación entre la radiación ultravioleta y el melanoma es ambigua, de manera que existen diferencias en los riesgos asociados con la cantidad y forma en que se administra y el período (13,14). Otras causas exógenas menos frecuentes son las radiaciones ionizantes, los virus, la exposición a ciertas sustancias químicas como el arsénico o el alquitrán, el tabaquismo, la hipertermia o la irritación crónica (11).

2.3 Diagnóstico

Ante una lesión sospechosa, el primer paso que realizan los dermatólogos es una exploración visual de la piel. Por lo general, se siguen los criterios ABCDE, que se desarrollaron en 1985 para la identificación precoz de melanomas. El acrónimo ABCDE atiende a las características físicas que pueden distinguirse en una lesión maligna: A (asimetría), B (bordes irregulares), C (color no homogéneo), D (diámetro ≥ 6 mm) y E (evolución o cambios con el paso del tiempo) (Figura 2). Al adoptar estos criterios, la sensibilidad del examen oscila entre 57% y 90%. Otra herramienta parecida es la lista de verificación de 7 puntos de Glasgow, que incluye varios criterios en los que se evalúan cambios de tamaño, forma, color y tacto; pero, debido a su sofisticación, ha sido menos adoptada (13,15,16).

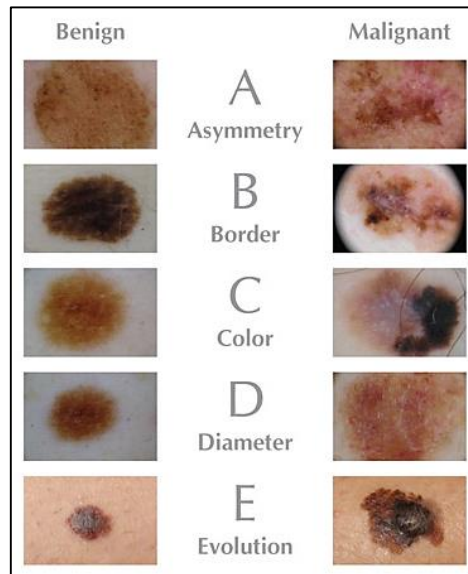


Figura 2: Criterios ABCDE para el diagnóstico precoz del melanoma y su diferenciación con los nevos melanocíticos benignos. El acrónimo ABCDE atiende a las características físicas que pueden distinguirse en una lesión maligna, siendo A la asimetría, B los bordes irregulares, C el color no homogéneo, D el diámetro ≥ 6 mm y E la evolución o cambios con el paso del tiempo (Imagen obtenida y modificada de AIM at Melanoma Foundation en www.aimatmelanoma.org)(7)

También se suele apoyar el diagnóstico en técnicas como la dermatoscopia, la microscopía confocal de reflectancia (RCM) o la fotografía longitudinal. Estos son métodos no invasivos basados en toma de imágenes que permiten la visualización de estructuras morfológicas que no son visibles a simple vista, así como posibles variaciones en la lesión que ayudan al seguimiento de su evolución (13,15,16).

Una vez que se ha detectado la presencia de una lesión melanocítica presuntamente maligna, se requiere una confirmación diagnóstica del melanoma, así como la posterior estadificación del mismo. Para ello, se lleva a cabo una biopsia escisional, incluyendo la totalidad de la lesión. Se debe efectuar con márgenes ajustados, lo que sirve también como tratamiento básico, al extirparse quirúrgicamente el tumor por completo (17,18).

Posteriormente, en aquellos casos en los que no exista evidencia clínica o pruebas de imagen que sugieran la presencia de metástasis, podría llevarse a cabo la biopsia del ganglio linfático centinela (BGLC). Se llama centinela al primer ganglio linfático de drenaje del territorio donde se localiza el tumor. Este ganglio se extirpa selectivamente tras su marcaje con Tc-99. Si se encuentran células tumorales en el análisis histológico de la pieza, se realiza un análisis exhaustivo del pronóstico del

paciente, antes de decidir si se efectúa una linfadenectomía regional, ya que esta puede aumentar la morbilidad (17,18).

2.3.1 Examen anatomopatológico, factores pronósticos y estadificación

Tras la obtención de la muestra de tejido, esta se fija con formalina para preservar la estructura proteica y del citoesqueleto, y después se embebe en parafina (tejido FFPE) para que pueda cortarse mediante un microtomo. La valoración diagnóstica por parte de un dermatopatólogo se basa en el análisis histológico, a partir de su visualización al microscopio en preparaciones de hematoxilina-eosina (H&E) que tiñen el tejido del corte histológico. En cuanto a sus características histológicas, el melanoma es una lesión asimétrica, constituida por melanocitos atípicos, de tamaño y morfología variable, con figuras mitóticas, núcleos hiper cromáticos y extensión pagetoidea (Figura 3) (17–19).

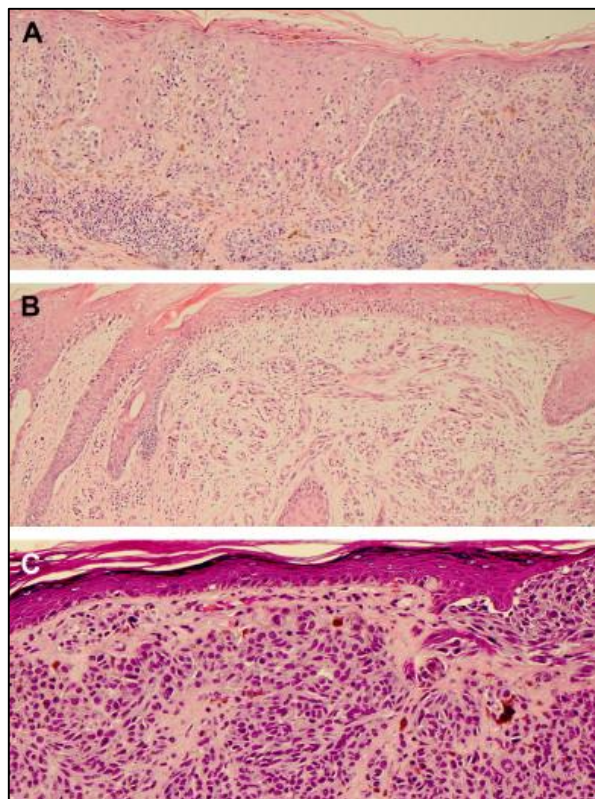


Figura 3: Tinción con hematoxilina-eosina (H&E) que permite el diagnóstico diferencial de lesiones benignas y malignas, así como caracterizar histológicamente y estratificar los diferentes subtipos de melanoma cutáneo. **A.** Melanoma de extensión superficial. **B.** Léntigo maligno melanoma. **C.** Melanoma nodular (Imágenes obtenidas de Duncan LMD, Oncology Clinics of North America, 2009)(20)

Una parte del estadiaje del tumor se establece en base a las características histológicas observadas durante el examen anatomopatológico. Además de los factores clínicos específicos de cada paciente (edad, sexo, entre otros), las características específicas del tumor son consideradas factores pronósticos que pueden ser predictivos de la progresión tumoral y la supervivencia del paciente (17–19). El más importante de estos factores pronósticos es el espesor o índice de Breslow, que mide el grado de invasión vertical del tumor. La profundidad se mide en milímetros desde el estrato granuloso hasta la célula melánica tumoral más profunda (Figura 4). Dependiendo del valor de este índice, existe menor o mayor riesgo de progresión y, por lo tanto, está directamente relacionado con la supervivencia de los pacientes (1,19,21):

- **< 1 mm:** riesgo bajo, muy buen pronóstico de supervivencia (96% a los 5 años).
- **1-4 mm:** riesgo medio de metástasis, pronóstico entre el 87-70%.
- **> 4 mm:** riesgo alto, muy mal pronóstico (inferior al 50%).

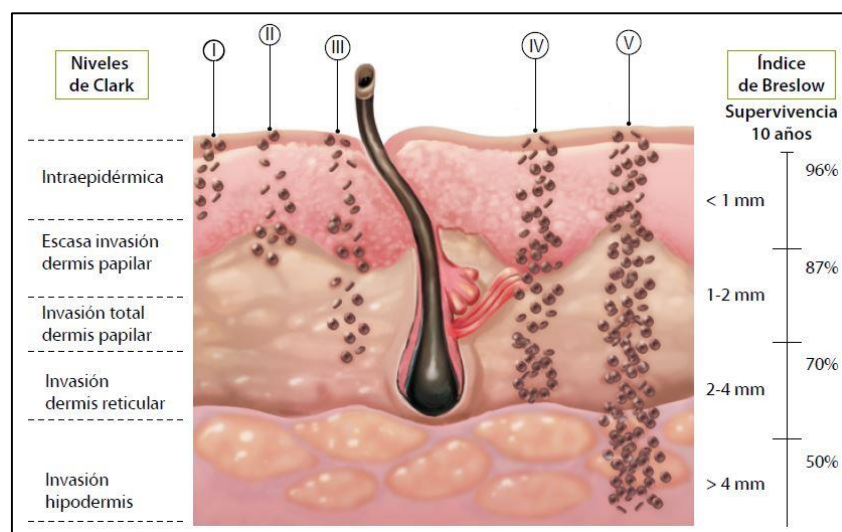


Figura 4: Comparativa entre el índice de Breslow y los niveles de Clark como factores para medir la invasión tumoral del melanoma en la piel (Imagen obtenida de Andrés-Lencina *et al.*, Manual CTO de Medicina y Cirugía 11a Edición) (1)

Otra forma de medir la invasión tumoral es mediante la clasificación de Clark, que la relaciona con la profundidad del tumor a nivel anatómico y se mide en niveles, tomando en cuenta las capas de la piel que se ven afectadas o invadidas (Figura 4) (1,16):

- **I:** Región intraepidérmica o *in situ*, supervivencia a 10 años muy alta (99%).
- **II:** Atraviesan la membrana basal e invaden fácilmente la dermis papilar (pronóstico del 96%).
- **III:** Rellenan la dermis papilar de forma completa. Muy buen pronóstico (90%).
- **IV:** Infiltran la dermis reticular, supervivencia a 10 años con riesgo elevado (67%).
- **V:** Infiltran la hipodermis y sistema vascular. Muy mal pronóstico (35-25%).

Entre ambas clasificaciones, el índice de Breslow es actualmente el más utilizado como indicador local de pronóstico, siendo el más importante, ya que, a diferencia del nivel de Clark, es una variable continua y por tanto más precisa y fiable (16,19,21–24).

Otros factores pronósticos histológicos son la ulceración y la tasa mitótica. La ulceración se define como la pérdida de continuidad del epitelio o la ausencia total de espesor de la piel como consecuencia del crecimiento tumoral. Está relacionada con mayor agresividad tumoral y por tanto, se asocia con un mal pronóstico. Por su parte, la tasa o índice mitótico es una variable continua que indica el número de mitosis por milímetro cuadrado en la porción invasiva del tumor. Aquellos pacientes con una tasa mitótica alta tienen mayor riesgo de desarrollar una metástasis, por lo que es un factor predictivo no solo de supervivencia, sino también de la afectación de los ganglios linfáticos centinela. También tienen relevancia en el diagnóstico histopatológico y la estadificación tumoral otros factores como: el subtipo histológico, la localización tumoral, la infiltración linfocitaria, la invasión linfo-vascular, presencia de satelitosis, y la afectación ganglionar y/o visceral (1,16,19,23).

La estadificación se basa en el sistema TNM, que ayuda a describir el cáncer de forma detallada y está íntimamente relacionado con los factores de riesgo y pronósticos observados en los exámenes clínicos e histopatológicos. En este sistema la T se refiere al tamaño y extensión del tumor primario, la N indica la diseminación a los ganglios linfáticos cercanos y la M se refiere a la presencia de metástasis a distancia. En el caso del melanoma, según la octava edición del manual de estadificación del cáncer, desarrollado por el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC, por sus siglas en inglés), publicado en 2016 e implementado en 2018; además de tomarse en cuenta la presencia de afectación

ganglionar o metástasis a distancia, también tienen relevancia factores pronósticos como el espesor de Breslow y la ulceración, así como otros marcadores de mal pronóstico como los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) en sangre (Figura 5) (24–27).

TNM del AJCC para el melanoma (8.ª ed)				
T	TX	Tumor primario no puede ser determinado (tras curetaje...)		
	T0	Sin evidencia de tumor primario		
	Tis	melanoma <i>in situ</i>		
	T1	≤ 1 mm	a (< 0,8 sin ulceración)	
			b (< 0,8 mm con ulceración o 0,8-1 mm con o sin ulceración)	
	T2	> 1 mm-2 mm	a (sin ulceración)	
			b (con ulceración)	
	T3	> 2 mm-4 mm	a (sin ulceración)	
			b (con ulceración)	
	T4	> 4 mm	a (sin ulceración)	
b (con ulceración)				
N	NX	Afectación ganglionar no puede determinarse (extirpación previa por otro motivo, hábito corporal...)		
	N0	Ausencia de afectación ganglionar clínica/radiológica		
	N1	N1a: micrometástasis en un ganglio linfático (clínicamente oculto)	N1b: ganglio linfático clínicamente detectado	
			N1c: metástasis en tránsito, satélites o microsátélites sin afectación ganglionar	
			N2	
	N2	N2a: micrometástasis en 2 o 3 ganglios (clínicamente ocultos)	N2b: metástasis en 2 o 3 ganglios linfáticos	
			N2c: metástasis en un ganglio (oculta o clínica) y metástasis en tránsito, satélites o microsátélites	
N3				
N3	N3a: 4 o más micrometástasis en ganglios linfáticos	N3b: 4 o más metástasis en ganglios linfáticos, al menos una de ella clínicamente evidente o presencia de conglomerado adenopático		
		N3c: 2 o más micrometástasis o metástasis ganglionares clínicamente detectables o presencia de conglomerado adenopático y metástasis en tránsito, satélites o microsátélites		
		M		
M0	M1	M1a: metástasis a distancia en piel, tejidos blandos (Incluyendo músculo) y/o ganglios linfáticos no regionales		
		M1b: metástasis pulmonares con/sin M1a		
Sistema de estadificación TNM del AJCC para el melanoma (8.ª ed.)	Tis	N0	M0	Estadio 0
	T1a-T1b	N0	M0	Estadio IA
	T2a	N0	M0	Estadio IB
	T2b-T3a	N0	M0	Estadio IIA
	T3b-T4a	N0	M0	Estadio IIB
	T4b	N0	M0	Estadio IIC
	T0	N1b/1c	M0	Estadio IIIB
	T0	N2b/2c, N3b/3c	M0	Estadio IIIC
	T1a/b-T2a	N1a, N2a	M0	Estadio IIIA
	T1a/b-T2a	N1b/1c, N2b	M0	Estadio IIIB
T2b/T3a	N1a-N2b	M0	Estadio IIIB	
T1a/T3a	N2c/N3a,b,c	M0	Estadio IIIC	
T3b/T4a	N1-N3	M0	Estadio IIIC	
T4b	N1a-N2c	M0	Estadio IIIC	
T4b	N3a/b/c	M0	Estadio IIID	
Cualquier T, Tis	Cualquier N	M1	Estadio IV	

Figura 5: Sistema TNM de estadificación del melanoma según la Octava Edición del Manual de Estadificación del Cáncer, desarrollado por el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC). En el sistema TNM, las letras corresponden a los términos en inglés: tumor (T), node (N) y metástasis (M). La T indica el tamaño y la extensión del tumor primario, la N indica el número de ganglios linfáticos afectados y la M indica la presencia de metástasis hacia otras partes del cuerpo (Tabla obtenida de Cañueto *et al.*, *Actas Dermosifiliogr.* 2017)(26)

2.4 Clasificación clínica e histológica

La forma clínica en que se presenta un melanoma depende principalmente de su patrón de crecimiento. La gran mayoría de los melanomas presenta inicialmente una fase de crecimiento radial u horizontal, y posteriormente, una fase de crecimiento vertical. En la primera ocurre una proliferación celular intraepidérmica o dérmica focal, que se extiende lateralmente observándose como una lesión plana. Por su parte, en la fase vertical, el crecimiento se da hacia la dermis, y por tanto hacia los vasos sanguíneos y linfáticos, de manera que aumenta la probabilidad de metástasis. La relación entre la duración de ambas fases determinará la forma clínica.

En relación a estos criterios clínicos e histológicos, el melanoma suele clasificarse en 4 subtipos principales (6,13,28):

2.4.1 Melanoma de extensión superficial (MES)

Es el subtipo de melanoma más frecuente en los caucásicos, con una prevalencia del 70% y un pronóstico relativamente favorable. Suele aparecer en pacientes que tienen entre 40-50 años. Se caracteriza por ser una lesión pigmentada con múltiples tonalidades y que presenta un crecimiento lento y de forma horizontal o radial (Figura 6A). Se localiza principalmente en zonas de exposición intermitente al sol, como las piernas en el caso de las mujeres o la espalda en los hombres; y pueden estar asociados a un *nevus* ya existente (13,20,28).

2.4.2 Melanoma nodular (MN)

Es el segundo subtipo más común y representa aproximadamente el 15 % de los melanomas. A diferencia de los otros subtipos, no posee fase de crecimiento horizontal, sino que se manifiesta como un nódulo polipoide de crecimiento rápido, con tendencia a ulcerarse y sangrar. Es el tipo más agresivo de melanoma, ya que se desarrolla en pocos meses. Suele ser una lesión pigmentada, aunque ocasionalmente algunos pueden ser amelanóticos (Figura 6B). A menudo se presenta en sitios del cuerpo con exposición intermitentemente a la luz solar como el tronco, la cabeza y el cuello; y en promedio aparece en personas de entre 50-60 años (13,20,28).

2.4.3 Melanoma lentiginoso acral (MLA)

Es una variante distinta del melanoma cutáneo, que ocurre en las palmas de las manos, las plantas de los pies y los sitios subungueales, y tiene un cuadro histológico característico. Su prevalencia es mucho mayor en la raza negra, hispana o asiática. Se presenta como una lesión pigmentada con diferentes tonos de marrón, negro y azul; y con algunas zonas despigmentadas (Figura 6C). Su frecuencia oscila entre el 5 y el 10% de los casos totales de melanoma, y aparece generalmente en pacientes mayores. Tienen un crecimiento lento y por tanto se suelen detectar tarde (13,28).

2.4.4 Léntigo maligno melanoma (LMM)

Es también un subtipo frecuente en la población caucásica, con una frecuencia de un 5% en general. Se desarrolla cuando surge una invasión dérmica por melanocitos atípicos en un lentigo maligno. El lentigo maligno (LM) es una lesión generalmente de gran tamaño que se da en la piel con exposición crónica al sol, principalmente en la cara (Figura 6D). Es más común en personas de edad avanzada y tiene un pronóstico relativamente favorable. Posee un crecimiento muy lento, de alrededor de 20 años, y por tanto su detección suele ser tardía (11,13,28).

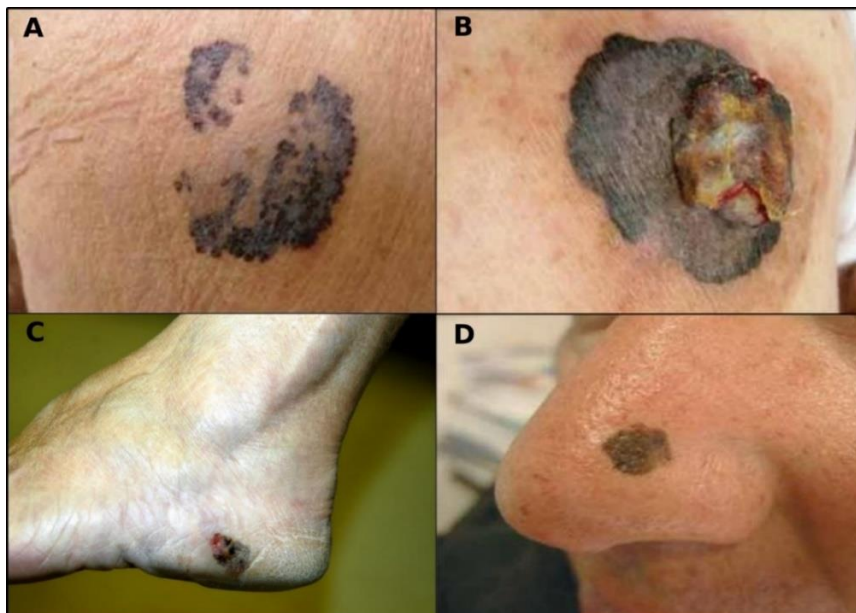


Figura 6: Subtipos principales de melanoma cutáneo según diversos criterios clínicos e histológicos. **A.** Melanoma de extensión superficial. **B.** Melanoma nodular. **C.** Melanoma lentiginoso acral. **D.** Léntigo maligno melanoma (Imágenes obtenidas de AIM at Melanoma Foundation en www.aimatmelanoma.org y de Rodrigo Schwartz, Revista Médica Clínica Las Condes, 2011) (7,28)

Sin embargo, se puede diferenciar otros tipos de melanoma no convencionales y poco frecuentes como el **melanoma desmoplásico (MD)**. Tiene una frecuencia de alrededor de un 2% y se suele localizar en áreas con daño solar como la cabeza o el cuello. Su prevalencia es mayor en hombres y la media de edad al momento del diagnóstico es de entre 60-70 años. Se caracteriza por altas tasas de recidiva debido a su crecimiento altamente infiltrante y tiene una propensión escasa a metastatizar a los pulmones. Además, suele ser amelanótico (13).

Otras categorías de melanomas que tienen características clínicas o histopatológicas diferentes son: el **melanoma nevoide**, el **melanoma que surge sobre un *nevus* azul**, el **melanoma que surge de un *nevus* congénito gigante** y el **melanoma infantil**. Además, los melanomas pueden originarse en zonas extracutáneas como el epitelio mucoso de las regiones anogenital, orofaríngea o conjuntiva (**melanoma mucoso**), o en los melanocitos de la úvea, abarcando estructuras intraoculares como el iris, el cuerpo ciliar y la coroides (**melanoma uveal**). Sin embargo, la mayoría de estos subtipos que han sido descritos como extremadamente raros, podrían encajar en uno de los cuatro subtipos principales (6,20).

Por último, existen una serie de lesiones melanocíticas difíciles de diagnosticar denominadas **tumores de Spitz** que abarcan un espectro de proliferaciones melanocíticas que poseen un conjunto de características citológicas y moleculares distintas a las de los *nevus* melanocíticos convencionales y el melanoma. Dentro de las lesiones spitzoides se incluyen tumores benignos (***nevus* de Spitz**), intermedios o indeterminados (**tumor de Spitz atípico**) y malignos (**melanoma de Spitz**). Existe una gran dificultad en el diagnóstico diferencial de estas variantes, pero debido a que suelen darse con mayor frecuencia en edades tempranas, o como variante del melanoma infantil, la eficacia en su diagnóstico es de gran relevancia (29,30).

2.5 Alteraciones genéticas

La mayoría de las alteraciones genéticas que se asocian al desarrollo de melanoma son de tipo somático y se producen de forma aleatoria en los melanocitos. Algunos de los genes que se encuentran

frecuentemente mutados son: *BRAF*, *NRAS*, *NFI*, *C-KIT* y *PTEN*. Asimismo, la presencia de mutaciones en algunos de los genes de predisposición al melanoma de alta penetrancia son un componente importante de la aparición de la enfermedad de carácter hereditario; entre los que se incluyen *CDKN2A*, *CDK4*, *BAP1* y *TERT* (31).

Las mutaciones, somáticas o germinales, generan pérdidas y ganancias de función, afectando a genes supresores de tumores y oncogenes, respectivamente. La acumulación de estas mutaciones conlleva un daño genético, que incrementa la susceptibilidad de los melanocitos para convertirse en células tumorales, debido a la alta tasa proliferativa y la resistencia a muerte por apoptosis ante una exposición a radiación UV. Asimismo, las alteraciones en la línea germinal no condicionan el desarrollo de melanoma, pero incrementan notablemente el riesgo de aparición (31,32).

Existen varias vías de señalización que se encuentran desreguladas en el melanoma debido a la presencia de estas mutaciones; y por lo tanto están involucradas en el inicio, proliferación, supervivencia, progresión e invasión tumoral (Figura 7). Destacan entre ellas: la cascada de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK), la vía de señalización de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K/AKT) y la vía de la proteína del retinoblastoma (pRb), que regula el ciclo celular a través de quinasas dependientes de ciclina (CDK). También están relacionadas con el melanoma las vías del factor de transcripción asociado a la microftalmia (MITF) y del factor nuclear-kappaB (NFκB) (20,33).

El programa “Atlas del genoma del cáncer” (TCGA, en sus siglas en inglés) estableció una clasificación en cuatro subtipos genómicos basados en el patrón de los genes con las mutaciones significativas más prevalentes: *BRAF* mutado, *NRAS* mutado, *NFI* mutado y triple-wild type o tipo salvaje (WT); donde las mutaciones en *C-KIT* son las más características del subtipo salvaje (34,35).

Las mutaciones en *BRAF* y *NRAS* aparecen generalmente en etapas tempranas, siendo detectables en la fase de crecimiento radial, y persisten a lo largo de la diseminación metastásica. Son mutuamente excluyentes y se han asociado con un carácter agresivo de la enfermedad y un mal pronóstico. Además, se les ha identificado como mutaciones impulsoras o “drivers” (mutaciones necesarias para promover el proceso maligno), lo que ha contribuido al desarrollo de terapias inhibitorias específicas de esta vía, con buenas respuestas en la práctica clínica. Sin embargo, se ha observado también la presencia de estas mutaciones en lesiones benignas, como los *nevus* melanocíticos o los congénitos; lo que sugiere que, aunque se active la vía de señalización MAPK, no es suficiente para desarrollar un melanoma (6,20,37–39).

2.5.2 Mutaciones en *C-KIT*

C-KIT es un receptor tirosina quinasa, responsable de la unión a factores de crecimiento y la activación de las vías MAPK y PI3K-AKT (Figura 7). Se ha observado la presencia de mutaciones en el gen *C-KIT* asociadas con el subtipo triple-wild establecido por la TCGA. Aunque estas mutaciones son mucho menos frecuentes en los melanomas cutáneos que las que ocurren en los genes *BRAF* y *NRAS*, son más comunes en el melanoma de tipo mucoso (frecuencia entre el 20-30%) y el melanoma acral (10-15%). Además, a veces van acompañadas de un aumento en el número de copias (33,40).

C-KIT es diana terapéutica en los tumores de estroma gastrointestinal (GIST) que presentan mutaciones activadoras, por lo que actualmente se están realizando estudios para aplicar los inhibidores de *CKIT* como un posible tratamiento de estos subtipos de melanoma (33,40).

2.5.3 Alteraciones en *CDKN2A* y *CDK4*

A diferencia de las mutaciones somáticas descritas con anterioridad, las alteraciones que se dan en *CDKN2A* y *CDK4* son de tipo hereditario, es decir, de línea germinal. Aunque, también se han observado mutaciones somáticas en estos genes en algunos melanomas esporádicos (menos del 5%). Se considera al inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A (*CDKN2A*) como un gen de alta penetrancia en el melanoma familiar, con una predisposición de entre el 20-40% de los casos. Además,

también se ha identificado como un gen de baja penetrancia, ya que confiere un mayor riesgo de melanoma en la población general (24,31,33).

CDKN2A, localizado en el cromosoma 9p21, codifica para las proteínas p16 y p14. Estas tienen una función supresora de tumores al interferir con la actividad de los complejos ciclina/CDK, inhibiéndolos, y por tanto están relacionadas con el control del ciclo celular (Figura 7). Entre las alteraciones que puede presentar el gen *CDKN2A* en el melanoma están las deleciones cromosómicas, las mutaciones o la hipermetilación del promotor. Por su parte, *CDK4* puede encontrarse mutado o amplificado. Todas estas alteraciones conducen a una disminución de la función supresora y por tanto a una progresión sin control a través del ciclo celular, lo que se asocia con un mayor potencial de proliferación e invasión tumoral. Por tanto, podría ser posible la orientación terapéutica de estas alteraciones a partir del desarrollo de nuevos inhibidores selectivos de *CDK4* (31,33,39).

2.5.4 Alteraciones en *TERT*

La transcriptasa reversa de la telomerasa (*TERT*) es un gen localizado en el cromosoma 5 (p15.33) que codifica la subunidad catalítica de la telomerasa, proteína que se encarga del mantenimiento de la longitud de los telómeros cromosómicos. La longitud telomérica y la inmortalidad celular están directamente relacionadas. Aunque en las células somáticas normales *TERT* se mantiene silenciado, en el 90% de los tumores de carácter agresivo este adquiere una expresión aberrante. Las mutaciones presentes en la región promotora del gen (*pTERT*) son las alteraciones genéticas más frecuentes que se producen, y se asocian con un incremento entre el doble y el cuádruple de la actividad de la telomerasa. Esto se debe a que dichas mutaciones crean sitios de unión CCGGAA/T para factores de transcripción ETS/TCF (del inglés: E-twenty-six/ternary complex factors), que promueven la expresión de *TERT*, de manera que la regulación de la proteína y su actividad se ven alteradas, confiriendo a las células tumorales una capacidad proliferativa ilimitada (41–44).

Algunas de las mutaciones en *pTERT* aparecen en la línea germinal asociadas al melanoma familiar. La más importante se detectó en la posición -57pb (chr5:1,295,161 A>C) del sitio de inicio de

la transcripción, siendo poco frecuente, pero de alta penetrancia. Aquellos pacientes que poseen dicha mutación desarrollan melanoma a edad temprana y sufren un rápido avance de la enfermedad. Sin embargo, en el melanoma esporádico, las mutaciones somáticas más habituales están localizadas en las posiciones -124pb (chr5:1,295,228 C>T) y -146pb (chr5:1,295,250 C>T), denominadas C228T y C250T respectivamente. Estas mutaciones son mutuamente excluyentes y se ven favorecidas por factores ambientales como la radiación UV (41,42). Además, también se han detectado, con menor frecuencia (10% de los casos), mutaciones en tándem en las posiciones -124/-125pb (chr5:1,295,228 y chr5:1,295,229 CC>TT) y -138/-139pb (chr5:1,295,242 y chr5:1,295,243 CC>TT), sugiriendo como etiología la radiación ultravioleta (44–46). Por otra parte, se ha observado la presencia de un polimorfismo dentro de *pTERT* a -245 pb del sitio de inicio ATG. Dicho polimorfismo rs2853669 provoca la desaparición de un sitio de unión preexistente para el factor de transcripción ETS2 y está asociado con un mayor riesgo de susceptibilidad general al cáncer. Algunos estudios han identificado un posible efecto modificador de rs2853669 sobre las mutaciones en *pTERT*, lo que sugiere que podría ser importante para evaluar el valor pronóstico de las mismas (Figura 8) (44,47).

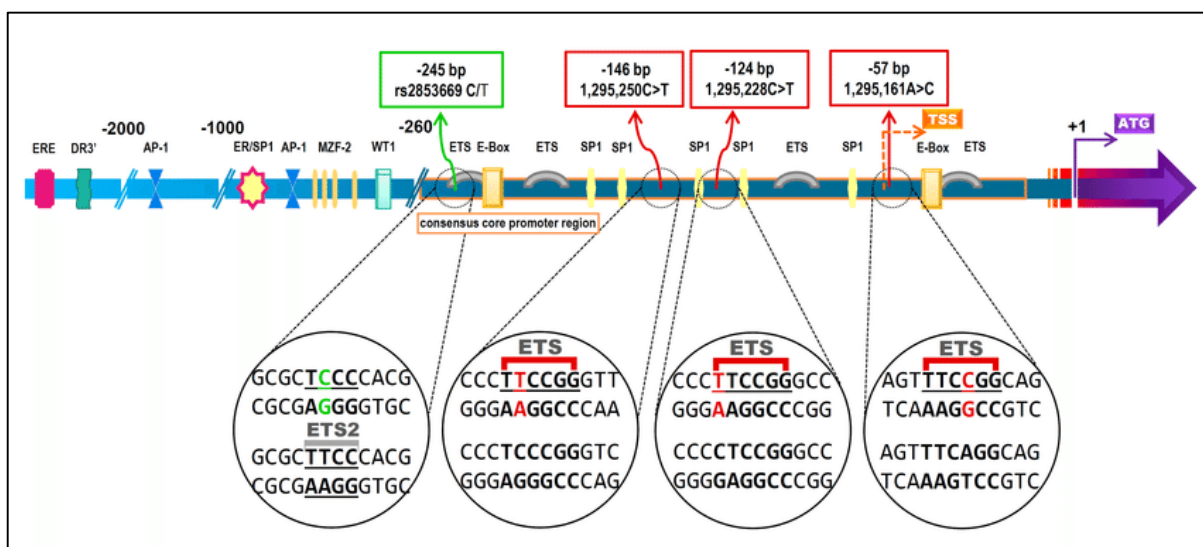


Figura 8: Localización de las principales mutaciones y elementos reguladores presentes en el promotor de *TERT*. En naranja se representa la región promotora central de *TERT* que engloba varios sitios de unión a factores de transcripción. En rojo se incluyen las 2 mutaciones más comunes en el melanoma esporádico (C228T y C250T) y la más común en el melanoma familiar (A161C). Estas mutaciones crean sitios de unión CCGGAA/T para factores de transcripción ETS/TCF. En verde se observa el polimorfismo rs2853669 que genera la desaparición de un sitio de unión preexistente para el factor de transcripción ETS2. En naranja se resalta el sitio TSS, que marca el lugar de comienzo de la transcripción del gen (Imagen obtenida de Heidenreich y Kumar, Mutat Res, 2017)(46)

En el melanoma, las mutaciones en *pTERT* presentan una alta prevalencia (entre 50-70%) y se relacionan con formas adversas de la enfermedad. Por ejemplo, se les asocia con estadios avanzados, pacientes de mayor edad y marcadores de mal pronóstico, tales como el aumento del grosor de Breslow, la ulceración y la tasa mitótica (43,45,46,48). Asimismo, dichas mutaciones se relacionan con una mayor agresividad tumoral, pues son más frecuentes en melanomas de rápido crecimiento, y están asociados con una peor supervivencia (45,48,49). Además, aunque presentan una mayor prevalencia que las mutaciones en otros genes, es más probable que se den en combinación con mutaciones en *BRAF*, *NRAS* o *CDKN2A*, que de forma aislada (41,44,45,48). Incluso, se ha detectado que aquellos sujetos que poseen alteraciones en *pTERT* y en *BRAF* o *NRAS* simultáneamente presentan parámetros clínicos e histopatológicos de peor pronóstico, además de una menor tasa de supervivencia (49–52).

En la actualidad, existen varias publicaciones en las que se ha analizado el papel de *TERT* en relación a la progresión del melanoma (43–45,53,54). No obstante, algunos de estos estudios presentan resultados controvertidos al respecto. Por un lado, algunos estudios han indicado que parece existir una relación entre la presencia de mutaciones en *pTERT* y un estadio avanzado de la enfermedad, asociado a un mal pronóstico (43–45). Sin embargo, otros estudios translacionales en tumores primarios y melanomas *in situ* han determinado que la presencia de las mutaciones en *pTERT* es un evento temprano en la progresión del melanoma, ocurriendo en fases bastantes iniciales de la enfermedad (53,54). La existencia de diferencias entre unas investigaciones y otras, sugiere la necesidad de nuevos estudios en melanoma que profundicen en el papel que tienen las mutaciones de *pTERT* en relación a la progresión tumoral y a las características clínicas e histológicas de los pacientes.

Además de las mutaciones en *pTERT*, existen otros mecanismos genéticos y epigenéticos que pueden estar implicados en la sobreexpresión del gen en pacientes con cáncer. Algunos de los que se han descrito son: hipermetilación del promotor, reordenamientos cromosómicos, amplificación en el número de copias de ADN, fusiones transcripcionales, entre otros. Además, la acetilación y la desacetilación de histonas pueden contribuir a la regulación de la expresión del ARNm; así como también pueden estar implicados los mecanismos de "splicing" del ARNm y los microARN (55–57).

Varios estudios recientes se han centrado en el papel que tiene la hipermetilación de la región *pTERT* en la sobreexpresión génica. A diferencia de la mayoría de los genes, *TERT* se expresa cuando una región específica del promotor está hipermetilada, pues esto evita la unión del factor represor de unión CCCTC (CTFC) (58). Esta región genómica, que tiene 433 pares de bases, está ubicada inmediatamente antes del promotor y cubre 52 sitios CpG. Se le definió como la Región Oncológica Hipermetilada de *TERT* (THOR) y se observó que la metilación estaba incrementada en muestras procedentes de varios tipos de cáncer en comparación con las muestras normales, lo que se asoció a su vez con una peor supervivencia (Figura 9) (57,59–61).

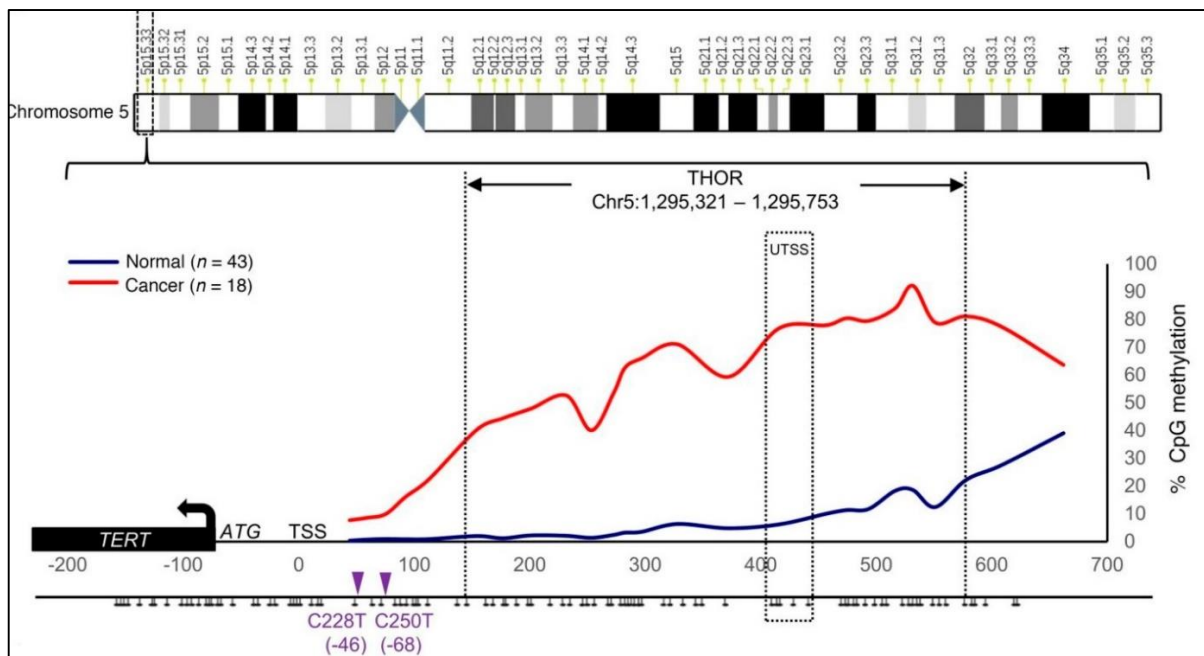


Figura 9: Localización de la Región Oncológica Hipermetilada de *TERT* (THOR). La región THOR abarca 433 bp que comprende 52 sitios CpG (chinchetas negras) y se ubica aguas arriba de las mutaciones más comunes C228T y C250T (triángulos púrpuras). La región delimitada como UTSS abarca 5 sitios CpG dentro de THOR en donde se ha observado una relación entre la hipermetilación del promotor de *TERT* y la expresión elevada del gen en varios tipos de cáncer. La metilación promedio del promotor *TERT* en células normales se muestra en azul y la de las células cancerosas en rojo (Imagen obtenida de Lee DD *et al.*, Int J Cancer, 2019)(61)

En base a esto, algunos autores han tratado de entender el mecanismo de metilación de *pTERT* en el cáncer y su interacción con otros mecanismos reguladores, como la presencia de mutaciones, pero los resultados no han sido concluyentes (62,63). Esto resalta la necesidad de continuar la investigación sobre la regulación del gen *TERT* y su importancia en el desarrollo y progresión tumoral, especialmente en el melanoma metastásico.

2.6 Técnicas inmunofenotípicas y moleculares

Aunque el diagnóstico inicial de las lesiones melanocíticas se basa principalmente en los exámenes histológicos realizados por los dermatopatólogos, en la mayoría de casos se requiere de técnicas complementarias que permitan una mejor comprensión de la patogénesis molecular del tumor. Esto no solo mejora el diagnóstico diferencial del melanoma, sino también la estadificación del mismo, la evaluación del pronóstico de la enfermedad y el establecimiento de nuevos enfoques terapéuticos.

2.6.1 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHC por sus siglas en inglés) es la herramienta más utilizada para apoyar el diagnóstico histológico de las lesiones melanocíticas, debido a su amplia disponibilidad y mayor rentabilidad, en comparación con otras técnicas (64,65).

Los marcadores inmunohistoquímicos que se adoptan con mayor frecuencia para el diagnóstico del melanoma son: S100, CD34/SOX10, HMB-45, Melan A/MART-1, Ki67/Mib-1, PRAME, p53, p16 entre otros (Figura 10). Algunos de estos marcadores se utilizan en general en la dermatopatología para determinar la estirpe o diferenciación de una neoplasia (epitelial, mesenquimal, neuroectodérmica o hematopoyética). Otros se emplean para diferenciar procesos neoplásicos benignos de malignos, ya que a veces no es posible guiarse solo por los criterios morfológicos del examen histológico. Otra utilidad de algunos de estos marcadores es la identificación de subtipos histológicos específicos que son difíciles de diagnosticar, como los melanomas desmoplásicos o los tumores de Spitz (23,24,65–67).

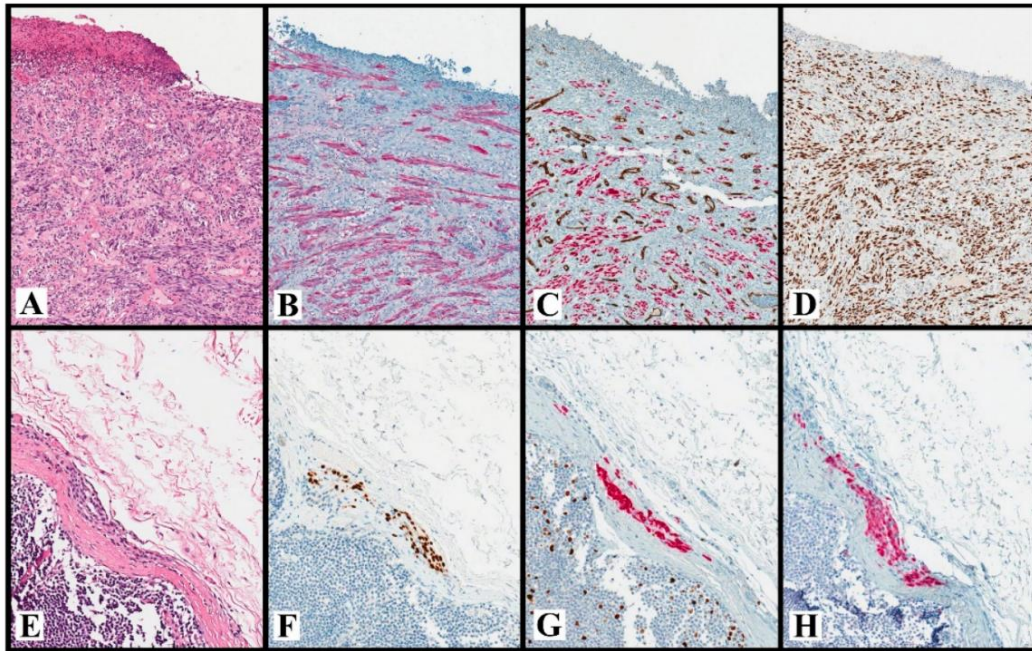


Figura 10: Imágenes de hematoxilina-eosina (H&E) y marcadores inmunohistoquímicos en tumores melanocíticos. **A.** H&E de un melanoma desmoplásico con desmoplasia marcada, células fusiformes atípicas y mitosis raras. **B.** Doble tinción inmunohistoquímica con CD34/SOX10 (CD34: marrón, SOX10: rojo), positivo para SOX10 y ausencia de invasión linfo-vascular. **C.** Marcaje positivo con S100. **D.** Marcaje positivo con p53. **E.** H&E de un nevus ganglionar intra-capsular que se asemeja histológicamente a un melanoma, con núcleos blandos y ausencia de mitosis. **F.** Marcaje positivo para SOX10. **G.** Doble tinción inmunohistoquímica con MART-1/Ki67 (Ki67: marrón, MART-1: rojo), positivo para MART-1 que muestra ausencia de células melanocíticas proliferantes y presencia de linfocitos proliferantes positivos para Ki67 dentro de los folículos linfoides. **H.** Marcaje positivo con p16. (Imágenes obtenidas de Ricci *et al.*, Int J Mol Sci, 2022)(65)

Por último, la IHC también puede utilizarse para la identificación de subtipos histológicos que están caracterizados por alteraciones moleculares específicas (expresión excesiva y/o aberrante de una proteína), y que, a su vez, pueden ser posibles dianas terapéuticas. Algunos ejemplos de estos marcadores son: BRAF V600E, c-KIT/CD117, ROS1, ALK, NTRK, BAP-1, β -catenina y NF1 (Figura 11). Sin embargo, la IHC se adopta de manera general solo como técnica de detección rápida, y son las técnicas de biología molecular las que se utilizan para confirmar y ampliar la información, pudiendo detectar mutaciones específicas en estos genes, así como reordenamientos cromosómicos, amplificaciones, deleciones, fusiones y demás alteraciones que pueden ser útiles en el tratamiento y el pronóstico de los pacientes (22,65,68).

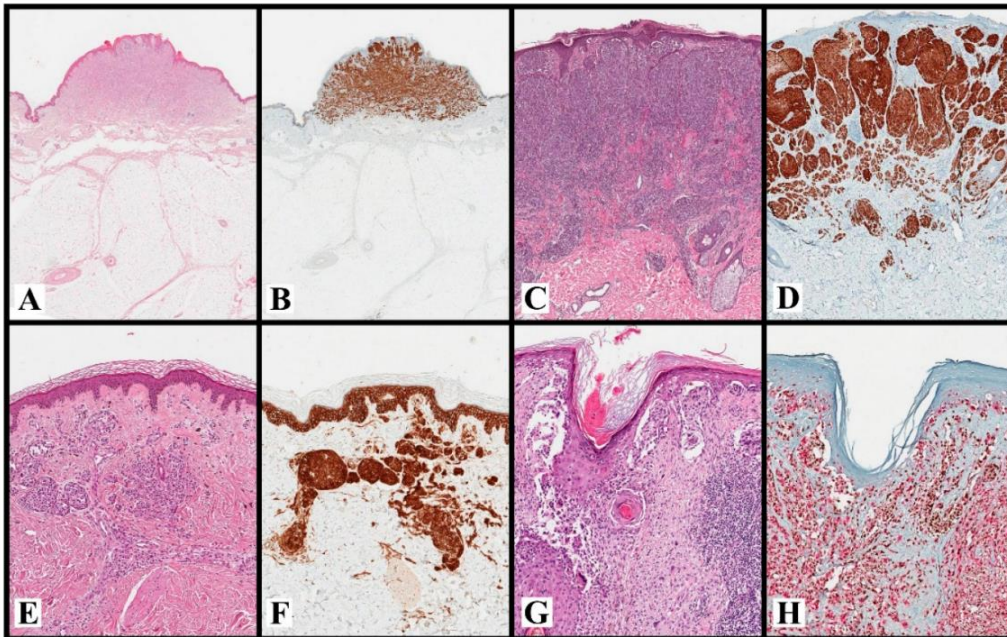


Figura 11: Imágenes de Hematoxilina-eosina (H&E) y marcadores inmunohistoquímicos en tumores melanocíticos. **A.** H&E de un *nevus de Spitz* con una morfología plexiforme característica que sugiere una translocación de ALK. **B.** Marcaje positivo con ALK. **C.** H&E de un *nevus de Spitz* con crestas y nidos lobulados que sugiere una translocación NTRK1. **D.** Marcaje positivo con NTRK1. **E.** H&E de un *nevus cutáneo* con morfología que sugiere una penetración profunda. **F.** Marcaje positivo (citoplasmático y nuclear) para β -catenina. **G.** H&E de un *lentigo maligno melanoma* con melanocitos atípicos únicos y anidados **H.** Doble tinción inmunohistoquímica con HMB-45/PRAME (PRAME: marrón, HMB-45: rojo), positivo para HMB-45 (citoplasmático) y PRAME (nuclear) (Imágenes obtenida de Ricci *et al.*, Int J Mol Sci, 2022)(65)

2.6.2 Técnicas moleculares y citogenéticas

Las técnicas de biología molecular y citogenética pueden servir como método complementario para la diferenciación entre lesiones melanocíticas malignas tipo melanoma, y benignas tipo *nevus*. Para ello se utilizan técnicas como microarrays, la hibridación *in situ* fluorescente (FISH, por sus siglas en inglés), la PCR cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés) o la secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés). Además, las técnicas moleculares también pueden servir como pruebas pronósticas en pacientes con melanoma, permitiendo predecir el riesgo de metástasis. No obstante, al ser métodos complementarios, siempre deben interpretarse en conjunto con los datos clínicos e histopatológicos (22,23).

- Arrays de SNPs: Microarrays basados en la detección de sondas localizadas en polimorfismos de nucleótido único (SNPs, por sus siglas en inglés) que permiten el análisis a gran escala del genoma para detectar variaciones en el número de copias cromosómicas (CNV, por sus siglas en inglés). Es de gran

utilidad en el diagnóstico diferencial de melanomas y *nevus*, cuando el examen histopatológico no es concluyente. Esto se debe a que las aberraciones cromosómicas están presentes en más del 90% de los melanomas, pero se observan con muy baja frecuencia en los *nevus* melanocíticos. Además, también tiene especial utilidad en el diagnóstico de tumores de spitz benignos o malignos, debido a sus características histológicas ambiguas (23,69–72).

Las CNV más comúnmente detectadas en el melanoma incluyen pérdidas de material genético en las regiones 9p, 9q, 10q, 6q, 11q, 13q y 10p; y ganancias en las regiones 6p, 7p, 7q, 1q, 8q, 17q y 20q; con frecuencias que oscilan entre el 20 y el 50%, siendo la pérdida de la región 9p la más habitual, observándose en casi el 60% de los pacientes con melanoma (Figura 12). En algunos casos puede detectarse una delección homocigota en la citobanda 9p21, en la que se localiza el gen *CDKN2A* (p16), lo que supone la pérdida de su función supresora tumoral y, por tanto, es un indicativo de mal pronóstico. También pueden observarse aberraciones cromosómicas en citobandas que contienen otros genes supresores u oncogenes implicados en el desarrollo y progresión tumoral, como *MYB* (6q23.3), *MYC* (8q24.21), *RREB1* (6p24.3) y *CDK4* (12q14.1) (70,71,73,74).

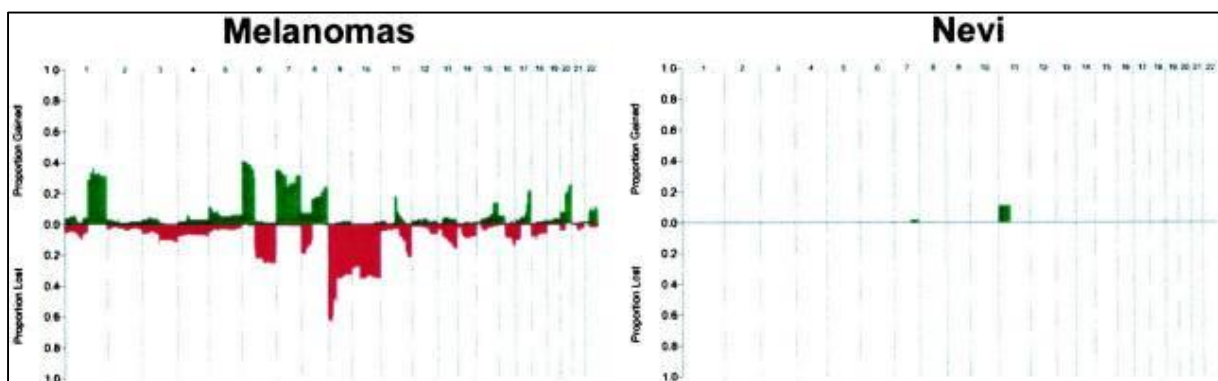


Figura 12: Alteraciones cromosómicas en melanoma y *nevus*. En el eje Y se muestra la proporción de ganancias en verde y de pérdidas en rojo en el número de copias de cada cromosoma. En el eje X se muestran 22 pares de cromosomas, sin incluir los sexuales (X e Y). En los melanomas se puede observar como las alteraciones más comunes son la ganancia de los cromosomas 1p, 6p, 7, 8q, 17q y 20q, y la pérdida de los cromosomas 6q, 8p, 9 (9p en homocigosis), 10 y 11q. En los nevi solo se observa como alteración más común la ganancia en la región 11p (Imagen obtenida de Bastian *et al.*, American Journal of Pathology, 2003)(74)

En los *nevus* no suelen observarse CNVs, detectándose en ellos menos de 3 alteraciones cromosómicas. Las principales alteraciones observadas son la pérdida de la citobanda 3p21 y la ganancia de la región 11p (Figura 12). La ganancia del brazo corto del cromosoma 11 puede estar asociada con

la presencia de mutaciones en el gen *HRAS*, localizado en la citobanda 11p15.5, y se le relaciona más específicamente con los *nevus* de Spitz. Por su parte, la pérdida de material genético en 3p21 supone la deleción del gen *BAP1*, y está relacionada con tumores melanocíticos epitelioides esporádicos (asociada con la presencia de mutaciones *BRAF^{V600E}*) o con tumores epitelioides familiares de Spitz, también llamados bapomas o *nevus* de Wiesner (asociada con mutaciones germinales en *BAP1*) (29,70,71,73,74).

- FISH: La hibridación *in situ* fluorescente también se utiliza para detectar alteraciones en el número de copias cromosómicas, pero a diferencia de los microarrays de SNPs solo analiza *loci* genómicos específicos, por lo que su sensibilidad y especificidad es menor, sobre todo en lesiones con aberraciones poco comunes. Sin embargo, tiene algunas ventajas en comparación con los microarrays, al tener una mayor disponibilidad, un tiempo de respuesta más rápido y un menor coste. Además, permite analizar zonas concretas dentro de un tumor heterogéneo, mientras que con los microarrays se requiere una mayor pureza, por lo que se suelen seleccionar previamente las zonas a estudiar a partir de preparaciones de H&E (23).

En 2009, Gerami *et al.* diseñaron y validaron un panel de sondas de FISH para su uso en rutina en el diagnóstico diferencial del melanoma a partir de muestras de tejido FFPE. El panel se basó en los datos existentes sobre alteraciones recurrentes en el número de copias de ADN detectadas por Hibridación Genómica Comparada (HGC) o arrays de SNPs; incluyéndose 4 sondas dirigidas a 6p25 (*RREB1*), 6q23 (*MYB*), Cep6 y 11q13 (*CCND1*) (Figura 13) (75,76).

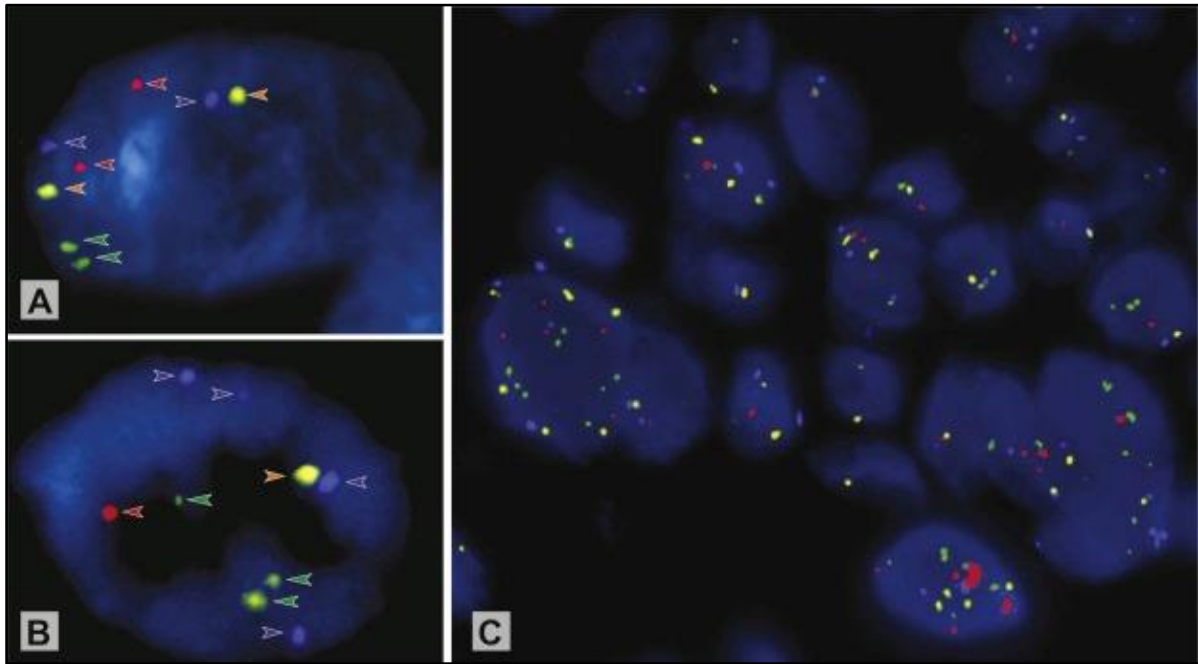


Figura 13: Hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en el diagnóstico de tumores melanocíticos ambiguos. A. Existen 4 sondas fluorescentes comúnmente utilizadas en el diagnóstico de melanoma que se unen a regiones cromosómicas específicas: 6p25 (RREB1, rojo), 6q23 (MYB, naranja), Cep6 (cyan) y 11q13 (CCND1, verde). Se observa una célula normal sin pérdidas y ganancias cromosómicas al detectarse 2 señales de cada sonda. **B.** Se observa una célula con aberraciones cromosómicas que afectan a las regiones de unión a las sondas FISH. Se distinguen 4 señales cyan pertenecientes a Cep6 que sirven como control, 1 señal roja (6p25), 3 señales verdes (CCND1) y 1 señal naranja (6q23). **C.** Ejemplo de FISH de un melanoma que muestra varios núcleos celulares con un número variable de sondas, lo que indica la presencia de aberraciones cromosómicas (Imágenes obtenidas Wiesner *et al.*, Pathology, 2016)(73)

Existen dos conjuntos de criterios y puntos de corte para el diagnóstico positivo de melanoma por FISH mediante estas sondas: el de Gerami y el del fabricante Abbott (Wiesbaden, Alemania) (Figura 14). Ambos criterios se basan en contar y registrar señales individuales en al menos 30 núcleos en diferentes áreas clonales de una muestra tumoral; y permiten diagnosticar melanomas y *nevus* benignos con una alta sensibilidad y especificidad. Con la combinación de ambos se detectan el 78% de los melanomas, disminuyéndose así la tasa de falsos negativos, pero aumentando los falsos positivos entre las lesiones de carácter ambiguo. Para mejorar este aspecto, se está estudiando combinar los criterios clásicos con la detección por sondas de 9p21 (*CDKN2A*) y 8q24 (*MYC*), ya que son regiones comúnmente alteradas en el melanoma (77,78).

	Gain in RREB1 (6p25) (>2 Signals per Nucleus)	Gain in RREB1 (6p25) Relative to CEP6 (No. RREB1 Signals Greater Than CEP6 Signals)	Nuclei Abnormal for RREB1 (6p25) Signals (<2 or >2 Signals per Nucleus)	Average MYB (6q23) Signals per Nucleus	Loss in MYB (6q23) Relative to CEP6 (No. MYB Signals Lesser Than CEP6 Signals)	Average CCND1 (11q13) Signals per Nucleus	Gain in CCND1 (11q13) (>2 Signals per Nucleus)
Gerami et al ⁶ and others	>29%	>55%	—	—	>40%	—	>38%
Abbott/Germany	—	—	≥63%	≥2.5	≥31%	≥2.5	—

Figura 14: Criterios comúnmente utilizados en la interpretación del FISH de melanoma. Ambos criterios se basan en contar y registrar señales individuales en al menos 30 núcleos anormales en diferentes áreas clonales de una muestra de piel sospechosa de tumor. Para considerar una muestra de melanoma positiva por FISH deben cumplirse al menos 1 de los 4 criterios propuestos por el fabricante Abbott (Wiesbaden, Alemania) o al menos 1 de los 4 criterios propuestos por Gerami *et al.*, indicados en la tabla (Tabla obtenida de Kerl *et al.*, American Journal of Dermatopathology, 2012)(79)

- qPCR: La PCR cuantitativa se utiliza para la identificación de mutaciones somáticas que pueden tener importancia en el diagnóstico y pronóstico del melanoma. Las mutaciones en el codón V600 de *BRAF* son las más importantes, ya que están asociadas con una mayor sensibilidad al tratamiento con inhibidores de *BRAF* y *MEK*, por separado o combinados. En concreto, la mutación más común, V600E, es la que tiene mejor respuesta (1,22,33,37). Por lo tanto, suele ser la primera en estudiarse por técnicas de detección rápida como la IHC, para posteriormente ser confirmada por métodos basados en qPCR, como los sistemas COBAS o Idylla; o en su defecto, por técnicas de secuenciación como Sanger, pirosecuenciación o NGS. Sin embargo, el análisis de mutaciones en *BRAF* solo está indicado para pacientes en estadios avanzados de la enfermedad, ya que son los que pueden beneficiarse de las terapias dirigidas (22,23,33,68). En pacientes con estadios avanzados de la enfermedad, y que no tienen mutaciones en el codón V600 de *BRAF*, la última actualización de las guías de la National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recomienda un estudio genómico más amplio en el que se incluyan otros codones de *BRAF* y otros genes como *C-KIT* y *NRAS*, el cual debe orientarse según las características clínicas del tumor (22,40).

- NGS: La secuenciación de nueva generación permite realizar un estudio de mutaciones más amplio en los pacientes sin mutaciones *BRAF*^{V600}, ya que es capaz de secuenciar muchos genes simultáneamente, lo que disminuye el tiempo de respuesta. Además, también puede detectar alteraciones en el número de copias cromosómicas, inserciones, deleciones, fusiones y reordenamientos, por lo que es probable que tenga cada vez más relevancia en el diagnóstico y el pronóstico del melanoma. Algunas de las

alteraciones poco frecuentes en melanoma que puede detectar la NGS son las fusiones en NTRK1, NTRK 2, NTRK 3, ALK y ROS1, las cuales pueden relacionarse con una buena respuesta al tratamiento con diferentes inhibidores (22,23).

2.6.3 Biopsia líquida

La biopsia de tejido es el procedimiento estándar en el diagnóstico de melanoma, ya que permite realizar el estudio histopatológico, y a su vez proporciona el material necesario para llevar a cabo las pruebas moleculares y de IHC. Sin embargo, su uso puede tener ciertas limitaciones a la hora de evaluar el desarrollo y pronóstico de la enfermedad, debido a la heterogeneidad tumoral y al dinamismo de su perfil molecular. Además, es una técnica invasiva para el paciente, lo que supone una mayor dificultad para obtener suficiente cantidad de muestra y para realizar muestreos de manera seriada que permitan llevar un seguimiento de la evolución del tumor (80,81).

En los últimos años, diversos estudios han demostrado que la sangre de los pacientes con cáncer contiene varios componentes asociados con el tumor, como células tumorales circulantes (CTCs), células epiteliales del órgano donde se localiza el tumor, células endoteliales y ácidos nucleicos (ADN, ARNm y microARN). Estos últimos pueden estar formando un complejo con proteínas (nucleosomas), incluidos en vesículas circulantes (exosomas) o pueden circular libres, habiendo sido liberados al torrente sanguíneo por células necróticas o apoptóticas (Figura 15). Estos ácidos nucleicos circulantes contienen alteraciones genéticas y epigenéticas específicas relacionadas con el tumor (mutaciones, metilación y CNVs) y que, por tanto, son relevantes para el desarrollo y progresión de la enfermedad. De hecho, las CTCs y los ácidos nucleicos circulantes tienen un papel fundamental en la diseminación metastásica del tumor a órganos distantes (81–86).

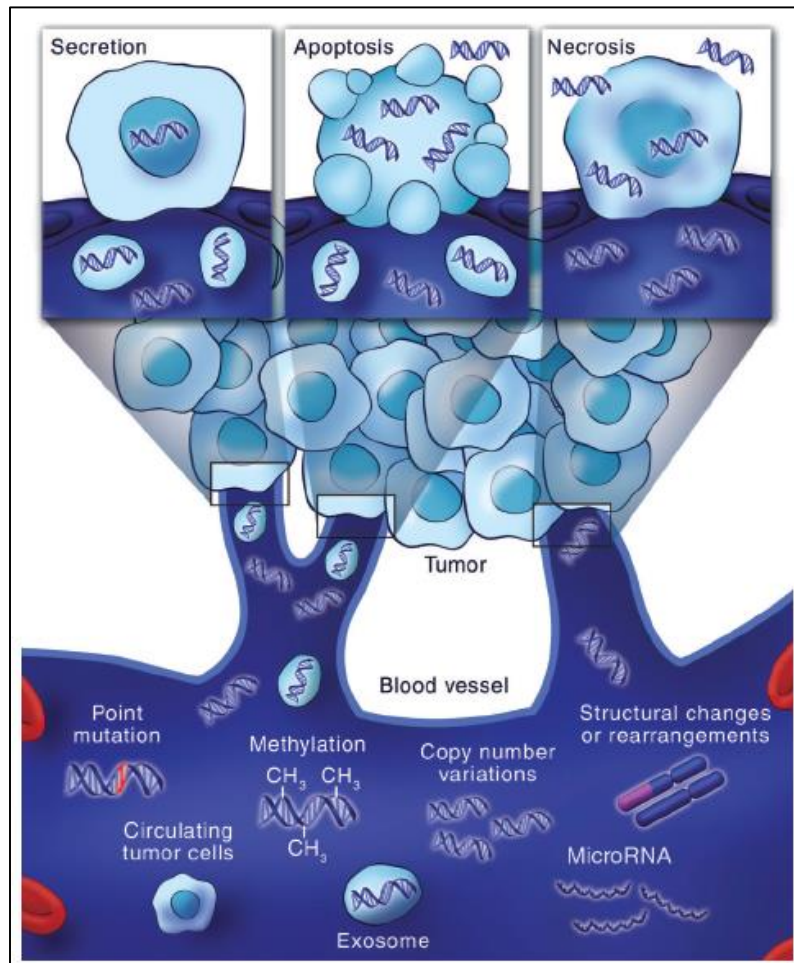


Figura 15: Alteraciones genéticas detectables en el ADN tumoral circulante. Las células tumorales pueden liberar material tumoral a la circulación a través de los vasos sanguíneos por múltiples mecanismos como la secreción, la apoptosis o la necrosis. El material tumoral puede liberarse en forma de células tumorales circulantes (CTCs), exosomas, ADN circulante tumoral (ADNct), entre otros. Se pueden detectar alteraciones genéticas asociadas al tumor en el ADNct, tales como: mutaciones puntuales, variaciones del número de copias, reordenamientos cromosómicos, etc (Imagen obtenida de Díaz y Bardelli, Journal of Clinical Oncology, 2014)(84)

A partir de estos conocimientos surge lo que hoy se conoce como biopsia líquida, que sirve como método complementario a la biopsia de tejido convencional, e incluso en los casos en los que no hay tejido disponible puede servir como método sustitutivo para el diagnóstico e identificación de biomarcadores. Lo más frecuente es que esta biopsia líquida provenga de la sangre periférica de los pacientes (plasma o suero), pero también existen otros fluidos corporales que pueden contener información molecular derivada de los tumores: la orina, el líquido cefalorraquídeo (LCR), la saliva y los derrames pleurales (81,87).

En melanoma, se han estudiado múltiples marcadores serológicos como S100B, MIA, CRO, PD-L1, IL-8, TIL, osteopontina y YKL-40; pero la mayoría de estos están asociados con otros procesos como la inflamación, infecciones, enfermedades autoinmunes e incluso otros cánceres; por lo que su utilidad clínica es limitada. Actualmente, el único marcador líquido validado clínicamente para monitorizar la respuesta al tratamiento y el pronóstico es LDH, aunque su sensibilidad y especificidad son insuficientes (88). El nivel de LDH en suero está considerado como un marcador de mal pronóstico cuando se encuentra elevado en sangre, y está incorporado dentro del sistema de estadificación (22,25).

En la actualidad, los estudios de biopsia líquida en melanoma se centran en el análisis de ADN circulante tumoral (ADNct) en plasma como herramienta sensible para monitorizar la respuesta terapéutica en pacientes metastásicos e incluso para predecir posibles recaídas (89,90). Los niveles elevados de ADNct podrían servir como factor pronóstico independiente de la progresión de la enfermedad en comparación con los niveles séricos de S100 y LDH. Además, un cambio en estos niveles podría predecir la respuesta al tratamiento, así como la progresión de la enfermedad incluso antes que las exploraciones radiológicas de rutina (88,90).

Sin lugar a dudas, la utilidad clínica más importante del análisis del ADNct en plasma de pacientes con melanoma es la de evaluar el estado mutacional de *BRAF*, ya que es obligatorio su estudio en estadios avanzados de la enfermedad, para decidir el tratamiento (22). Aunque por regla general dicho análisis se lleva a cabo en muestras de tejido, en ocasiones este puede tener una calidad deficiente o no haber disponibilidad del mismo. Por tanto, diversos estudios se han centrado en evaluar la concordancia entre pruebas de detección en tejido y en plasma, obteniéndose ratios de detección en el análisis de la mutación *BRAF* V600E en ADNct por encima del 75%, al utilizar técnicas de alta sensibilidad basadas en PCR (91–93).

De esta manera, el análisis mutacional de *BRAF*, detectable en el ADNct de pacientes con melanoma metastásico, podría utilizarse para monitorizar la progresión de la enfermedad, así como la respuesta al tratamiento con inhibidores de *BRAF*/*MEK* (91–93). Sin embargo, solo la mitad de los pacientes con melanoma presentan estas mutaciones, por lo que existe la necesidad de encontrar nuevos

marcadores que puedan detectarse en plasma y que sirvan como complemento en el diagnóstico y monitorización de la enfermedad. Una de las opciones que se están estudiando es la detección de mutaciones en *pTERT* en el ADNct, dada su alta prevalencia en el melanoma; obteniéndose tasas de detección en plasma entre un 50 a 70%, utilizando métodos altamente sensibles como la PCR digital (ddPCR, por sus siglas en inglés). Esto sugiere que las mutaciones de *pTERT* podrían representar un biomarcador valioso para la monitorización de pacientes con melanoma, y ser incluidas en las pruebas de rutina, en conjunto con la detección de mutaciones en *BRAF* y *NRAS* (94,95).

2.7 Tratamiento

El tratamiento de los pacientes con melanoma se ve condicionado por la estadificación del tumor en el diagnóstico inicial. Para los melanomas primarios en estadios tempranos o para lesiones sospechosas, el primer paso es llevar a cabo la cirugía del tumor. Dependiendo de su grosor y ubicación variará el tamaño de los márgenes quirúrgicos recomendados para la escisión. Por su parte, los factores pronósticos como el espesor de Breslow, la presencia de ulceración y de mitosis, serán importantes a la hora de decidir realizar o no la biopsia del ganglio linfático centinela (BGLC). El resultado de la BGLC no solo proporciona información pronóstica de la supervivencia del paciente, sino que también influye en la decisión terapéutica (linfadenectomía completa y/o terapia adyuvante) y en la recomendación de un seguimiento activo (ecografía o estudios de imagen) (1,22,24).

Para los pacientes con metástasis ganglionar con alto riesgo de recidiva o para algunos tipos histológicos específicos (léntigos malignos con cirugía contraindicada o melanomas desmoplásicos de alto riesgo), estaría indicada la terapia adyuvante con radiación (radioterapia). Tiene como objetivo mejorar el pronóstico de los pacientes, pero debido a su toxicidad su uso debe ser sopesado. En el caso de los pacientes con metástasis a distancia se puede realizar una radiocirugía estereotáctica (RCE) en la que la radiación se focaliza sobre un área pequeña y específica. Ésta puede utilizarse como tratamiento primario o adyuvante, sobre todo en metástasis cerebrales (22). Sin embargo, en general la radioterapia tiene un uso principalmente paliativo en aquellos pacientes con múltiples metástasis y sintomáticos. Al

igual que ocurre con la quimioterapia (dacarbazina), estos tratamientos no suponen un gran aumento en la supervivencia a largo plazo y sus potenciales efectos secundarios son bastante altos (1,24).

En los últimos años, el tratamiento de los pacientes con melanoma metastásico ha ido cambiando a medida que se han descubierto fármacos basados en terapias dirigidas o en la inmunoterapia, lo que ha mejorado considerablemente el pronóstico de estos pacientes y ha supuesto una disminución en el uso de la quimioterapia. Las terapias dirigidas en el melanoma metastásico (estadios III y IV) se basan en la administración de fármacos inhibidores de la proteína BRAF (vemurafenib, dabrafenib o encorafenib) en aquellos pacientes que presentan mutaciones en el codón V600 de *BRAF*, siendo la mutación V600E la que tiene mejor respuesta al tratamiento (1,22,33,37). Estos medicamentos se caracterizan por tener una respuesta rápida y efectiva, pero de corta duración, debido al desarrollo de mecanismos de resistencia, además de provocar efectos secundarios, como el desarrollo de otras neoplasias cutáneas. Por tanto, se suelen combinar con inhibidores de la proteína MEK (trametinib, cobimetinib o binimetinib), que también se dirigen a la vía de MAPK, para intentar disminuir la pérdida de respuesta a corto plazo (1,22,24,33,96). Actualmente hay varios estudios y ensayos clínicos en marcha para intentar entender los posibles mecanismos implicados en la resistencia a estos medicamentos, debido a la activación de las vías MAPK y PI3K-AKT (24,33,96).

Sin embargo, la terapia individual o combinada de estos fármacos solo beneficia a aproximadamente la mitad de los pacientes con melanoma metastásico, por lo que los investigadores continúan trabajando en desarrollar otros tipos de tratamiento que sean más duraderos y estén enfocados a la mayoría de los pacientes (96). Uno de ellos es la inmunoterapia, basada en la inhibición de los llamados puntos de control inmunitario, que suelen ser manipulados por las células tumorales como mecanismo para evadir la respuesta del sistema inmune. Los inhibidores de puntos de control inmunitarios (ICI, por sus siglas en inglés) utilizados en el melanoma metastásico son los anticuerpos anti-PD1/PDL1 (nivolumab y pembrolizumab) y los anti-CTLA4 (ipilimumab). Ambos son receptores inhibitorios que regulan la respuesta inmunitaria por diferentes mecanismos. Estos fármacos estimulan

la respuesta inmunitaria al bloquear la unión de ligandos a estos receptores que está generando una señal de tolerancia a las células cancerígenas (1,24,33).

El tratamiento con los ICI ha supuesto un aumento en la supervivencia de los pacientes y su uso combinado se considera actualmente como el estándar de atención en el tratamiento del melanoma avanzado, tras observarse una actividad clínica superior (mejores tasas de respuesta, aumento de la supervivencia y respuestas duraderas). Sin embargo, a pesar de estos datos prometedores, existen complicaciones clínicas debido a su mecanismo de acción en el sistema inmunitario, lo que genera efectos secundarios graves como pueden ser las afecciones inflamatorias en la piel, el tracto gastrointestinal y los órganos endocrinos (24,33).

También se han empezado a realizar ensayos clínicos para valorar el uso de la terapia triple en aquellos pacientes con mutación en *BRAF*^{V600}, combinando la terapia dirigida y la inmunoterapia. Los datos obtenidos en estudios preclínicos sugirieron que los inhibidores de *BRAF* y *MEK* provocan cambios en el microambiente tumoral que pueden mejorar la sensibilidad a los ICI (33,96). Sin embargo, actualmente no existen marcadores fiables que permitan predecir la respuesta a la inmunoterapia y estratificar a los pacientes entre respondedores, no respondedores (mecanismos de resistencia innata) y los que responden inicialmente, pero luego progresan (resistencia adquirida). La ausencia de estos marcadores puede suponer en ocasiones el fracaso de la terapia, y ya que son tratamientos costosos y con efectos secundarios que pueden ser graves, actualmente existe un gran interés en encontrar estos biomarcadores predictivos (33,96,97). Existen estudios prometedores en los que firmas de expresión génica que están asociadas con la respuesta a la inmunoterapia pueden predecir la resistencia y la respuesta al tratamiento, como por ejemplo la vía de la *β-catenina* y la del interferón-gamma (*IFNG*) (33). Además, sigue siendo prioritario la búsqueda de otras dianas terapéuticas diferentes, con el fin de obtener un tratamiento mucho más personalizado. Algunas de las alteraciones que se están estudiando y se proponen como candidatas a la terapia dirigida son: *NRAS*, *C-KIT*, *GNAQ*, *GNA11* y *SF3B1* (24,33).

**JUSTIFICACIÓN,
HIPÓTESIS Y
OBJETIVOS**

1. JUSTIFICACIÓN

El melanoma es considerado como la forma más agresiva de cáncer de piel y es la principal causa de muerte por tumores cutáneos, debido a su tendencia intrínseca a metastatizar y a su resistencia a los tratamientos clásicos (6,11,12). La tasa de supervivencia de la enfermedad es muy alta cuando el diagnóstico es temprano y el tumor se extirpa por completo. Sin embargo, esta tasa disminuye notablemente cuando el melanoma se ha diseminado a los ganglios linfáticos o ha producido metástasis a distancia (11,12,17). Estas características, en conjunto con la alta incidencia en adultos jóvenes, ponen de manifiesto la importancia de llevar a cabo un diagnóstico precoz y certero de la enfermedad, y que se disponga de buenos marcadores pronósticos que permitan predecir la agresividad de la misma y monitorizar a los pacientes tras el tratamiento.

El descubrimiento de mutaciones conductoras altamente frecuentes en *BRAF* y *NRAS* en el melanoma (40-60% y 15-20%, respectivamente), favoreció el desarrollo de terapias con inhibidores específicos, con buenas tasas de respuesta en la práctica clínica y el aumento de la supervivencia global de los pacientes (36,37). Además, estas mutaciones aparecen en etapas tempranas y persisten a lo largo del tiempo en la diseminación metastásica (38), por lo que su detección en el plasma de los pacientes con melanoma sirve para monitorizar, de forma no invasiva, la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (91–93). Sin embargo, una proporción considerable de pacientes carece de mutaciones conductoras conocidas y un alto porcentaje de ellos desarrollan resistencia al tratamiento (24,33,96), por lo que existe la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas que puedan detectarse en plasma y que sirvan como complemento en el diagnóstico y monitorización de la enfermedad.

En la última década, se han detectado dos mutaciones (C228T y C250T) en la región promotora del gen *TERT* en un alto porcentaje de melanomas (70%), tanto en muestras de tejido (41,42,44,45), como de plasma (94,95). Ambas mutaciones son responsables de la activación del promotor al contener un sitio de unión para factores de transcripción ETS, por lo que generan un aumento de la expresión de la telomerasa en las células de melanoma. Esta sobreexpresión se ha asociado ampliamente con un carácter

agresivo de la enfermedad y una peor supervivencia (42–45,48,49,98–100). Además, otras alteraciones genéticas y epigenéticas parecen estar implicadas en la sobreexpresión de *TERT* durante el desarrollo tumoral, como la hipermetilación de la región THOR (región oncológica hipermetilada *TERT*) (55,57,58), asociada con una peor supervivencia en múltiples tipos de cáncer (59,60,101). Sin embargo, se han publicado resultados contradictorios sobre el efecto de las alteraciones del promotor en la regulación de *TERT* y cómo se asocia con la progresión y el desenlace de los pacientes con melanoma (43,46,48,53,62,63); lo que sugiere la necesidad de nuevos estudios que profundicen en el papel de *TERT* en dichos tumores, especialmente en el melanoma metastásico.

2. HIPÓTESIS

Dada su alta frecuencia en melanoma y la existencia de diferencias entre unas investigaciones y otras(44,48,61,63,102), este trabajo pretende analizar las mutaciones de *pTERT* en las diferentes etapas del melanoma y su relación con otras alteraciones como la hipermetilación del promotor, la presencia o no de mutaciones conductoras y las características clínicas e histológicas de los pacientes; con el fin de confirmar si podría servir como un biomarcador pronóstico y/o predictivo de la enfermedad tanto en muestras de tejido como de plasma.

Por otro lado, existen pacientes con melanoma que carecen de mutaciones en *BRAF*, *NRAS* o *TERT* y que demandan el desarrollo de nuevas herramientas para el seguimiento de la enfermedad. Dado que casi la totalidad de los melanomas presentan aberraciones cromosómicas (69,71,74), nuestro estudio propone las ganancias y pérdidas cromosómicas como marcadores para la monitorización de los pacientes. Estas alteraciones podrían ser detectadas mediante el estudio con Arrays de SNPs en ADN circulante extraído a partir de muestras de plasma de pacientes con melanoma metastásico.

3. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es profundizar en el papel de las alteraciones en la región promotora de *TERT* (*pTERT*) en el desarrollo y progresión del melanoma, así como en su posible relación con la supervivencia de los pacientes. Además, se valorarán las mutaciones en *pTERT* y las

aberraciones cromosómicas como nuevos biomarcadores candidatos en plasma para la monitorización de los pacientes con melanoma metastásico.

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

1. Detectar las mutaciones más frecuentes en la región promotora de *TERT* en muestras pareadas de tejido de tumor primario y metastásico pertenecientes a pacientes con melanoma avanzado, y analizar su efecto en la expresión del ARNm de *TERT*
2. Determinar el estado de metilación del promotor de *TERT* en muestras pareadas de tejido de tumor primario y metastásico pertenecientes a pacientes con melanoma avanzado, y correlacionarlo con los niveles de expresión del ARNm de *TERT*.
3. Analizar la coexistencia de las alteraciones en el promotor de *TERT* con la presencia de mutaciones conductoras en *BRAF* y *NRAS*; y su efecto en la expresión del ARNm de *TERT* en el melanoma.
4. Relacionar las alteraciones en la región promotora y los niveles de expresión de *TERT* en las muestras de tejido con diferentes parámetros clínicos e histológicos, así como con la supervivencia de los pacientes con melanoma avanzado.
5. Detectar la presencia de mutaciones en el promotor de *TERT* y de aberraciones cromosómicas en el plasma de pacientes con melanoma avanzado, y establecer el grado de concordancia con las alteraciones detectadas en tejido.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. SELECCIÓN DE CASOS Y CONTROLES

Se recopilaron un total de 88 muestras de tejido fijado con formal y embebido en parafina (FFPE, de las siglas en inglés *formaldehyde fixation with paraffin embedding*) pertenecientes a 53 pacientes diagnosticados con melanoma avanzado en estadios III y IV según el AJCC, el Hospital Universitario 12 de Octubre entre los años 2002 y 2020. De estos pacientes, 35 participaron con muestras pareadas de melanoma primario y sus correspondientes metástasis. De los 18 restantes, solo se disponía de una muestra por paciente (3 melanomas primarios y 15 melanomas metastásicos).

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético y de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital 12 de Octubre y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado para ser incluidos en el mismo. Se utilizaron las muestras sobrantes del diagnóstico y el excedente fue almacenado en el Biobanco del Hospital 12 de Octubre.

Con el fin de confirmar y seleccionar las regiones más representativas del tumor, dos dermatopatólogos evaluaron las muestras de tejido FFPE mediante tinción con hematoxilina-eosina (H&E) para descartar aquellas muestras con grandes cantidades de melanina o necrosis que pudieran interferir con las técnicas moleculares, y evitar las áreas con piel normal adyacente. Además, se recogieron muestras de sangre periférica de 25 de los 53 pacientes incluidos en el estudio antes del inicio del tratamiento sistémico.

Además, se incluyeron en el estudio 7 muestras de piel normal y 6 muestras de *nevus* melanocítico benigno como tejido control. También se incluyeron como control 6 muestras de líneas celulares de melanoma (LC SKMEL, LC #4, LC #3, LC #2, LC #10 y LC #17) cedidas por el Grupo de Melanoma de la Dra. María S. Soengas del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO).

2. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

2.1 A partir de muestras de tejido

Se cortaron en el microtomo entre 5 y 15 secciones de tejido FFPE de unas 5µm de espesor, realizando macrodissección del tumor en los casos donde fue necesario. Se extrajo el ADN utilizando el kit CLART HPV4 (Macherey Nagel, Düren, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante. Para desparafinar las muestras se añadieron 600 µl de aceite mineral (Mineral oil, M-3516-1L; Sigma-Aldrich, Misuri, EE.UU) por tubo y se realizó una incubación a 90 °C durante 2 minutos. Posteriormente, se centrifugaron las muestras para eliminar el aceite y la parafina (sobrenadante), y quedarnos con el tejido desparafinado en el fondo del tubo (pellet). A continuación, se realizó una incubación con 200 µl de buffer de lisis y 20 µl de proteinasa K durante toda la noche a 56 °C. Al día siguiente se llevó a cabo una incubación a 70 °C durante 10 minutos para inactivar la enzima. Finalmente, se purificó el ADN utilizando minicolumnas con membranas de sílice y una serie de tampones de lavado y alcoholes en diferentes proporciones que permiten la eliminación de sales y otros contaminantes, quedando el ADN retenido en la columna. Finalmente, el ADN se eluyó en 20 µl de agua destilada y se almacenó a -20 °C para su posterior utilización.

Para la extracción del ARN, se llevaron a cabo los mismos pasos manteniendo las muestras y reactivos a 4 °C durante todo el proceso y omitiendo el paso de desactivación de la proteinasa K a 70°C, debido a la inestabilidad del ARN a altas temperaturas.

La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó utilizando el fluorímetro Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, Delaware, EE.UU), con el kit Qubit dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad de las muestras se analizó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 de (Thermo Fisher Scientific).

2.2 A partir de muestras de sangre periférica

2.2.1 Extracción de plasma

Se extrajeron entre 10 y 20 ml de sangre total en tubos EDTA y se mantuvieron a 4 °C durante un máximo de 3 horas hasta la obtención del plasma. La extracción del plasma se realizó centrifugando la sangre total a 1900 x g durante 10 minutos a 4 °C. Los sobrenadantes se transfirieron cuidadosamente, sin perturbar la capa leucocitaria, a tubos Falcon de 15 ml de base cónica. Posteriormente, se realizó una segunda centrifugación a 16000 x g durante 10 minutos a 4 °C, tras la cual se descartó el pellet y se recogió el sobrenadante (plasma) en un tubo Eppendorf, que se congeló a -80 °C hasta su utilización para extracción de ADN circulante.

2.2.2 Extracción de ADN circulante

Para la extracción de ADN circulante libre de células (cfDNA, por sus siglas en inglés) a partir de plasma sanguíneo se utilizó el kit QIAamp Circulating Nucleic Acid (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante. Se partió de 2-5 ml de plasma y se incubaron durante 30 minutos a 60 °C con 200 µl de proteinasa K y 1,6 ml de buffer de lisis. Posteriormente, se añadieron 3,6 ml de tampón de unión a los lisados, se incubaron durante 5 minutos en hielo y se transfirieron a minicolumnas con membrana de sílice. La purificación se realizó utilizando un colector de vacío (QIAvac 24 Plus; Qiagen) y una bomba capaz de producir un vacío de -800 a -900 mbar (Qiagen Vacuum Pump); en la que se llevaron a cabo 3 lavados con tampones a diferentes proporciones de alcohol. Finalmente, se eluyó el ADN circulante en 20 µl de agua destilada y se conservó en tubos Eppendorf a -20 °C hasta su posterior utilización. El proceso que se siguió para la cuantificación y el análisis de la calidad de este fue el mismo que el descrito en la extracción de ADN a partir de tejido FFPE.

3. PIROSECUENCIACIÓN

Se analizaron por pirosecuenciación las mutaciones más comunes presentes en el promotor del gen *TERT* (*pTERT*) en las muestras de ADN obtenido a partir de biopsias de tejido. Las mutaciones

analizadas fueron: C228T y C250T, correspondientes a las posiciones -124 y -146 pb del sitio de inicio ATG. El resto de mutaciones menos comunes fueron analizadas por secuenciación sanger.

Se llevó a cabo la amplificación a través de PCR de un fragmento de ADN de 110 pares de bases que contiene las posiciones genómicas mencionadas. Para ello, se utilizó el kit PyroMark PCR Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones de fabricante, y el termociclador Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Para la amplificación se partió de 200 ng totales de ADN y se utilizaron un cebador forward y un cebador reverse marcado con biotina, a una concentración de 10 pmol/μl. El kit comercial incluye una master mix que contiene las cantidades óptimas de enzima ADN polimerasa, nucleótidos (dNTPs) y MgCl₂ para llevar a cabo la PCR; un tampón con colorante de carga (Coral Load) y el reactivo Q Solution, que permite mejorar la amplificación de regiones ricas en nucleótidos G/C, como la del promotor de *TERT*. Los cebadores utilizados (Eurofins Genomic, Ebersberg, Alemania) y el programa de amplificación se describen en la Tabla 1. Finalmente, la calidad de los productos amplificados se comprobó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Tabla 1: Diseño del ensayo de pirosecuenciación para la detección de mutaciones de *pTERT*.

Secuencia cebadores PCR y Pirosecuenciación		Programa PCR		
Forward	5'-CCCTTCACCTCCAGCTCC-3'	95 °C	15 min	1 ciclo
Reverse	Biotina-5'-AAAGGAAGGGGAGGGGTG-3'	95 °C	30 seg	
Secuenciación	5'-ACCCCGCCCCGTCCCGACCCC-3'	60 °C	30 seg	45 ciclos
Diseño Pirosecuenciación		72 °C	30 seg	
Secuencia a analizar	TYCCGGGTCCCCGGCCCAGCCCCYTCCG	72 °C	10 min	1 ciclo
Orden de dispensación	ATCGATCCGCACGCCGTC	4 °C	∞	∞

Los productos amplificados se inmovilizaron con microesferas de Sepharosa-estreptavidina (Cytiva, Massachusetts, EE. UU) y se lavaron y purificaron con diferentes tampones en la estación de

vacío PyroMark Q24 Vacuum Workstation (Qiagen). Los productos purificados se desnaturalizaron a 80 °C para obtener ADN monocatenario, que sirvió de molde para el proceso de pirosecuenciación. Se empleó un cebador de secuenciación a una concentración de 20 pmol/μl, que hibrida en la región inmediatamente anterior a la primera posición genómica a analizar (se describe en la Tabla 1).

Finalmente, para la reacción de pirosecuenciación se utilizaron los reactivos PyroMark Gold Q24 (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Entre ellos se incluye una mezcla con las enzimas DNA polimerasa, ATP sulfurilasa, luciferasa y apirasa, y una mezcla de sustratos que incluye adenosina 5-fosfosulfato (APS) y luciferina. Ambas mezclas se incubaron con las muestras dentro del pirosecuenciador PyroMark Q24 instrument (Qiagen) y se añadió a la reacción los 4 tipos de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs: ATP, GTP, CTP y TTP), de uno en uno, siguiendo un orden de dispensación específico que fue previamente diseñado con el fin de permitir la identificación de todas las posibles mutaciones incluidas en el amplicón. La secuencia de dispensación se muestra en la Tabla 1. La ADN polimerasa va incorporando los dNTPs complementarios según la secuencia de la hebra molde. En cada incorporación se libera un pirofosfato (PPi) en una cantidad equimolar a la cantidad de nucleótido incorporado. Tras varias reacciones en cadena en las que participan el resto de enzimas y sustratos, se genera luz visible en cantidades que son proporcionales a la cantidad de dNTPs incorporados, que es detectada por el instrumento y se registra como un pico, formándose un pirograma (Figura 16) (103). Los resultados obtenidos se analizaron mediante el software PyroMark Q24 2.0.6 Build 20 (Qiagen).

En cada carrera se dispuso de un control negativo (*pTERT* de tipo salvaje, WT), un control positivo para las mutaciones más frecuentes (C228T y C250T) y un control sin muestra o blanco (NTC por sus siglas en inglés).

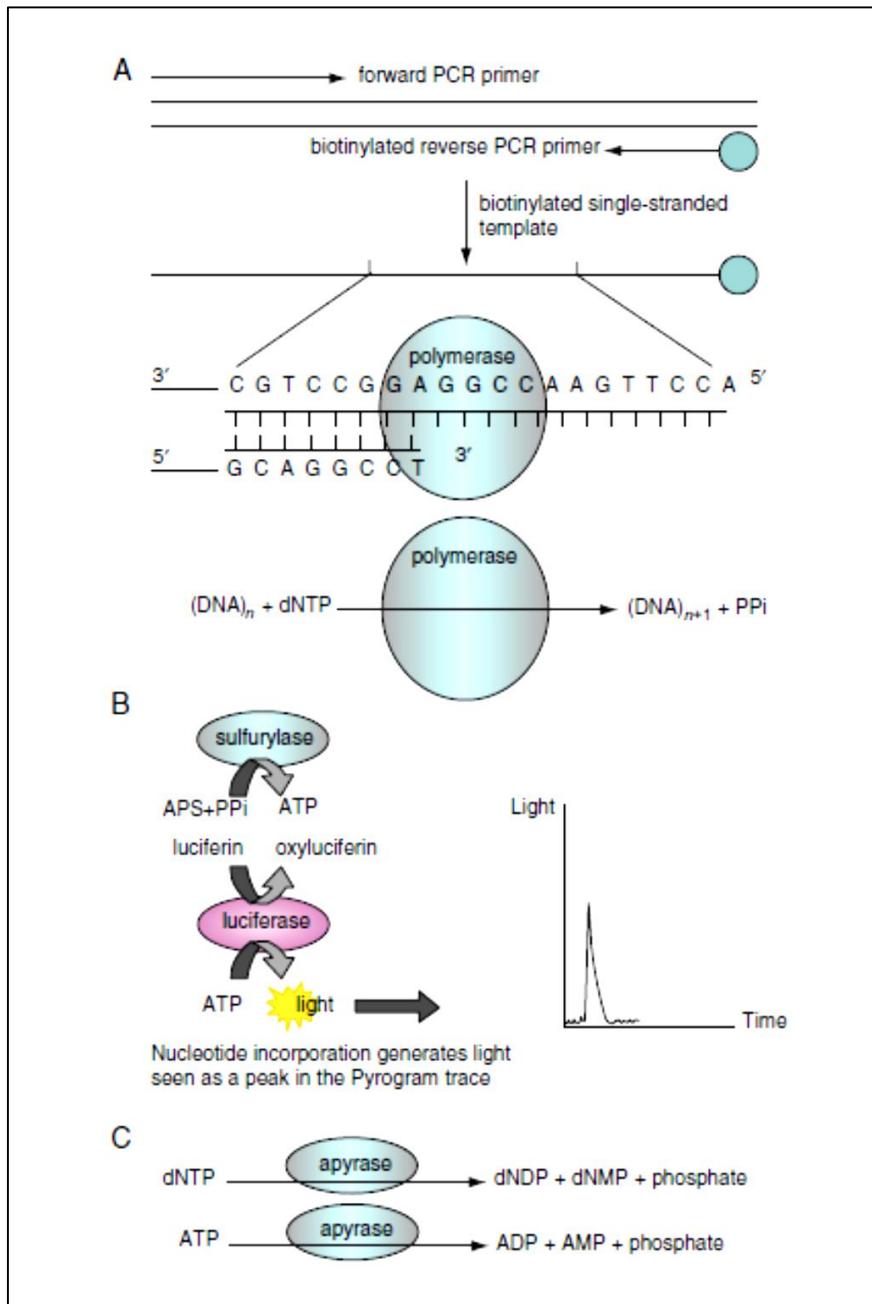


Figura 16: Esquema ilustrado del procedimiento de la pirosecuenciación. **A.** Tras la amplificación por PCR y la purificación, el ADN monocatenario marcado con biotina sirve de molde para la reacción de pirosecuenciación que lleva a cabo la enzima polimerasa. **B.** A medida que los nucleótidos se incorporan a la cadena de ADN se libera un pirofosfato que se convierte en ATP por la acción de la sulfurilasa y la luciferasa en dos reacciones en cadena. El ATP generado impulsa la reacción de luz que se visualiza como un pico en el pirograma. **C.** La enzima apirasa degrada los nucleótidos no incorporados antes de que se dispense el siguiente nucleótido (Imagen obtenida de Kreutz *et al.*, Current protocols in molecular biology, 2013)(103)

4. SECUENCIACIÓN SANGER

La secuenciación Sanger se utilizó para confirmar los resultados de la pirosecuenciación que fueron dudosos o no valorables, así como para detectar mutaciones menos comunes en *pTERT*, como

las mutaciones en tándem CC242-243TT y CC228-229TT en las posiciones -138/-139 pb y -124/-125 pb del sitio de inicio ATG, respectivamente. Para ello se utilizó el mismo producto de PCR obtenido en la amplificación realizada para la pirosecuenciación. Los productos de PCR se purificaron en minicolumnas con membrana de sílice con el kit QIAquick PCR Purification 50 (Qiagen) y se comprobó su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Posteriormente se realizó la reacción de secuenciación con el kit BigDye Terminator v3.1 (ThermoFisher Scientific), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Dicha reacción se llevó a cabo en una única dirección, es decir, utilizando solo el cebador Forward a una concentración de 3,2 pmol/ μ l (Tabla 1), ya que al emplear el producto de PCR de la pirosecuenciación la hebra antisentido estaba biotinilada en 5'. El kit comercial incluye un tampón de reacción a concentración 5X y una master mix que incluye la enzima polimerasa, los dNTPs y los didesoxinucleótidos (ddNTPs) marcados con fluorescencia, que funcionan como terminadores. El programa consistió en una desnaturalización a 96°C durante 3 minutos; seguida de 25 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 10 segundos, unión del cebador a 50°C durante 5 segundos y extensión a 60°C durante 4 minutos; y fue llevado a cabo en el termociclador Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific).

Los productos obtenidos se purificaron con el kit BigDye XTerminator de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, las muestras se cargaron en el secuenciador Applied Biosystems 3130 XL (Thermo Fisher Scientific). Los cromatogramas obtenidos se analizaron empleando el software Chromas 2.5.1 (Technelysium Pty Ltd, South Brisbane QLD 4101, Australia).

5. PCR A TIEMPO REAL

Se utilizó la tecnología automatizada Idylla System (Biocartis, Mechelen, Bélgica), que está basada en PCR a tiempo real, para detectar las mutaciones de los genes *BRAF* y *NRAS* en aquellos pacientes de los que no disponíamos de datos moleculares previos. Para ello se utilizó un corte de 10 μ m de espesor de las muestras de tejido FFPE. Se emplearon los cartuchos Idylla™ *ctBRAF-NRAS* Mutation Test que cubren 18 mutaciones en los exones 2, 3 y 4 de *NRAS*, así como 5 mutaciones en el

codon 600 de *BRAF*. Estos cartuchos fueron cargados según las especificaciones del fabricante y analizados por el instrumento Idylla Console (Biocartis).

6. PCR ESPECÍFICA DE METILACIÓN (MS-PCR)

Se analizó el estado de metilación de 4 islas CpG en la región *pTERT* mediante la realización de una PCR específica de Metilación (MS-PCR, por sus siglas en inglés), de acuerdo con las condiciones previamente descritas por Xin et al (104). Tres de las cuatro islas a analizar se encuentran dentro de la región definida como THOR por Lee *et al.* (61), tal y como se muestra en la siguiente figura:

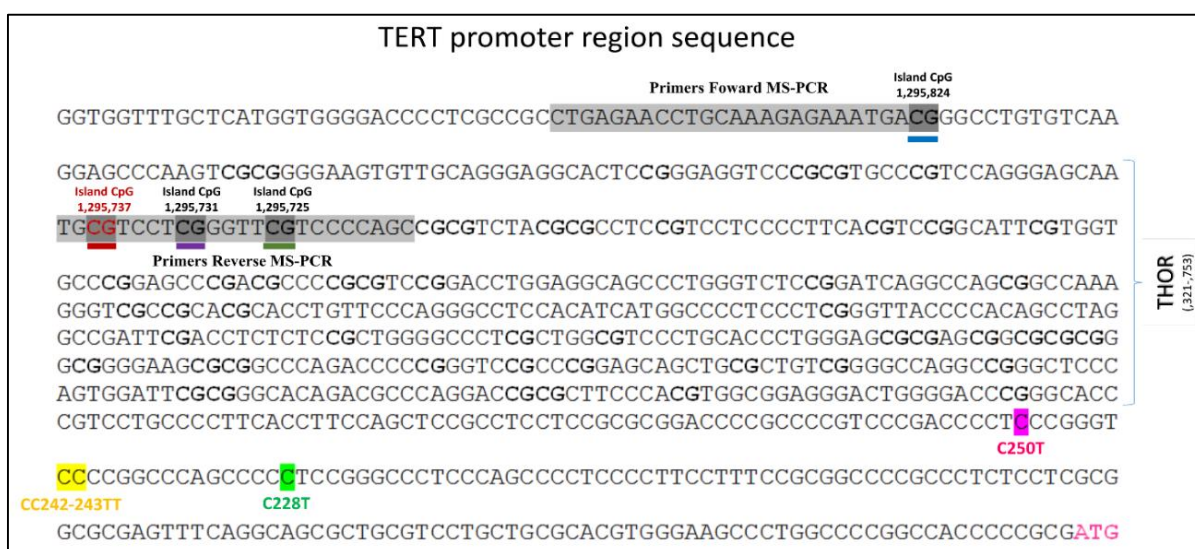


Figura 17: Secuencia de la región promotora de *TERT* con las 4 islas CpG incluidas en el análisis de metilación. Se muestra la región promotora de *TERT* (*pTERT*) aguas arriba del codón de iniciación ATG (marcado en rosa claro). En gris se resaltan las dos secuencias de las zonas que hibridan con los cebadores o primers de la PCR específica de metilación, que a su vez incluyen las 4 islas CpG que son analizadas en este estudio (indicadas por su posición cromosómica y remarcadas en colores azul, rojo, morado y verde). Tres de las 4 islas CpG forman parte de la región conocida como THOR (Región Oncológica Hipermetilada de *TERT*), señalada con un corchete azul a la derecha. También se incluyen las 3 mutaciones más comúnmente detectadas en *pTERT* (resaltadas en color fucsia, amarillo y verde claro).

Primero se realizó la conversión con bisulfito partiendo de entre 500 y 1000 ng de ADN genómico proveniente de tejido, en un volumen de 20 µl, utilizando el kit EpiTect Bisulfite Kit 48 (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El proceso de conversión consistió en un primer ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, 25 minutos a 60 °C, 5 minutos a 95 °C y 85 minutos a 60 °C. Posteriormente se realizó un segundo paso de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos y una incubación a 60°C durante 2 horas y 55 minutos, manteniendo las muestras a 20 °C hasta su posterior

purificación. Este proceso de conversión se llevó a cabo en el termociclador Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Finalmente, el ADN tratado con bisulfito se almacenó a -20 °C hasta su utilización en un periodo máximo de un mes.

Posteriormente se realizó la amplificación de un fragmento de 131-133 pb, en el que se incluyen las islas CpG anteriormente indicadas (Figura 17), utilizando el termociclador Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) y empleando una PCR de tipo “Touchdown” en la que se va disminuyendo la temperatura de anillamiento del cebador de dos en dos grados centígrados durante los primeros 4 ciclos, con el fin de reducir la posibilidad de uniones inespecíficas. Se empleó el reactivo GoTaq G2 Hot Start Colorless Master Mix (Promega, Wisconsin, EE.UU), que contiene las cantidades óptimas de enzima ADN polimerasa, nucleótidos (dNTPs) y MgCl₂ para llevar a cabo la amplificación; y dos parejas de cebadores que se unen específicamente cuando la secuencia se encuentra metilada (citosinas sin convertir) o cuando no hay metilación (citosinas convertidas a uracilo), ambos a una concentración de 15 pmol/μl. Las secuencias de los cebadores (Eurofins Genomic) y el programa de PCR utilizado se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 2: Diseño del ensayo de la PCR específica de metilación para el análisis de metilación de *pTERT*

Secuencias de Cebadores MS-PCR		Programa PCR		
Metilación	Foward	95 °C	15 min	1 ciclo
	5'-TTGAGAATTTGTAAAGAGAAATGAC-3'	95 °C	30 s	
		59 °C	30 s	2 ciclos
	Reverse	72 °C	30 s	
	5'-TAAAAACGAACCCGAAAACG-3'	95 °C	30 s	
		57 °C	30 s	2 ciclos
72 °C		30 s		
No metilación	Foward	95 °C	30 s	
	5'-TTGAGAATTTGTAAAGAGAAATGATG-3'	55 °C	30 s	36 ciclos
		72 °C	30 s	
	Reverse	72 °C	7 min	1 ciclo
	5'-ACTAAAAACAAACCCAAAAACACA-3'	4 °C	∞	∞

MS-PCR = PCR específica de metilación

En cada carrera se incluyeron los siguientes controles: una muestra sin tratar con bisulfito, un ADN metilado comercial (Merck, Darmstadt, Alemania), uno no metilado (Qiagen) y un NTC. Los niveles de metilación detectados en las muestras de piel normal se utilizaron para establecer una línea base de metilación de *pTERT*, ya que en estudios anteriores se observó que *pTERT* se encuentra normalmente hipometilado o no metilado en los tejidos normales (104). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 3%, en el que se comprobó la presencia de banda de amplificación para los cebadores de metilación y los de no metilación, pudiendo observarse muestras metiladas, no metiladas o parcialmente metiladas (amplificación con ambos cebadores). La intensidad de dichas bandas de amplificación se midió utilizando el programa ImageJ (versión 1.53e para Windows; NIH, Bethesda, Maryland) y con los valores obtenidos se realizó una doble normalización. Primero una normalización interna entre las bandas de metilación y no metilación, pertenecientes a cada muestra, y posteriormente una normalización externa con la media de las muestras de piel normal; obteniéndose así un valor numérico para el estado de metilación de *pTERT*. A partir de estos valores, las muestras se distribuyeron en dos grupos: hipermetiladas e hipometiladas, utilizando como punto de corte la mediana de los niveles normalizados de metilación de *pTERT* de las muestras de melanoma.

7. PCR CUANTITATIVA DE TRANSCRIPCIÓN INVERSA (RT-QPCR)

Para medir los niveles de expresión de *TERT* a partir del ARN mensajero (ARNm) de muestras de tejido FFPE, realizamos una PCR de transcripción inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) para sintetizar el ADN complementario (ADNc). Se utilizó para ello el kit de síntesis de SuperScript VILO cDNA de Invitrogen (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de 10 ng de ARNm en un volumen máximo de 7 μ l, a los que se les añadió la master mix incluida en el kit a concentración de 1X, que contiene los cebadores aleatorios, dNTPs y MgCl₂ necesarios para la reacción, y una mezcla de enzima retrotranscriptasa e inhibidor de ARNasa. Para sintetizar el ADNc se sometió dicha mezcla a un programa de 30 minutos a 42 °C y 85 °C durante 5 minutos en el termociclador Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific), y se mantuvo a 10 °C hasta su posterior utilización.

La expresión del ARNm de *TERT* se evaluó por triplicado en una PCR cuantitativa (qPCR, por sus siglas en inglés) mediante el uso del sistema 7500 Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) y utilizando el gen *GAPDH* como control endógeno. Las sondas Taqman utilizadas fueron: TERT Hs00972650_m1 TaqMan 20X y GAPDH Hs99999905_m1 TaqMan 20X de Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific). Se partió de 2 μ l de ADNc a una concentración de entre 100-1000 ng y cada muestra se analizó por triplicado. Se añadieron cada una de las sondas por separado y la mezcla de reacción TaqMan Fast Advanced Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific), según las indicaciones del fabricante. La master mix contenía una ADN polimerasa AmpliTaq Fast, la enzima uracilo-N glicosilasa (UNG), dNTPs con dUTP y un tampón optimizado para la reacción de qPCR. Las condiciones para la amplificación fueron las siguientes: 2 minutos de incubación a 50 °C, 2 minutos de activación a 95 °C y posteriormente 40 ciclos de desnaturalización durante 3 segundos a 95 °C y 30 segundos de extensión a 60 °C.

Dado que los niveles de ARNm de *TERT* fueron indetectables por RT-qPCR en las muestras control de piel normal y *nevus* melanocítico, los valores relativos de la expresión de ARNm de *TERT* se obtuvieron con el método Δ CT en lugar del método $\Delta\Delta$ CT (Livak) utilizando únicamente los niveles de expresión del gen endógeno *GAPDH*. A partir de los valores obtenidos, las muestras se distribuyeron en dos grupos: alta y baja expresión, utilizando como punto de corte la mediana de los niveles normalizados de expresión de *TERT* de las muestras de melanoma.

8. PCR DIGITAL (ddPCR)

Las mutaciones de *pTERT* en el ADN circulante de muestras plasmáticas fueron analizadas por PCR digital (ddPCR, por sus siglas en inglés). Además, esta técnica también se empleó para confirmar algunos resultados discordantes en muestras de tejido FFPE. Se utilizaron sondas fluorescentes para detectar específicamente las mutaciones C228T (dHsaEXD72405942) y C250T (dHsaEXD46675712) (Biorad, Hércules, California). Las sondas específicas de las mutaciones estaban marcadas con el fluoróforo FAM, y las de tipo salvaje (wild type), dirigidas a la misma región, con HEX. Se utilizaron 10 ng totales de ADN aproximadamente en un volumen de 8 μ l, que se hibridaron por duplicado con 2

µl de una mezcla optimizada de cebadores y sonda específicos para cada región a estudiar, y con 11 µl de una supermix que contiene las cantidades óptimas de enzima ADN polimerasa, nucleótidos (dNTPs) y sales. Además, se incluyeron en cada tanda un control negativo (*pTERT* WT), un control positivo para cada mutación estudiada (C228T y C250T) y un NTC.

A continuación, se añadió en cada reacción 70 µl de aceite Droplet Generation Oil for Probes (Biorad) y se cargaron en el QX200 AutoDG Droplet Generator (Biorad) con el fin de generar gotas que contenían un solo fragmento de ADN. Posteriormente se llevó a cabo una amplificación en el termociclador C1000 Touch Thermal Cycler, siguiendo las condiciones de PCR previamente descritas por McEvoy et al (95). Cada fragmento de ADN amplificado se detectó en el lector de gotas QX200 Droplet Reader (BioRad) y el análisis de los fragmentos se realizó con el software QuantaSoft (BioRad), siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Cada gota formada se consideró como un evento. Los resultados no se consideraron valorables en aquellos casos en que el número de eventos totales era menor a 10000. Para confirmar la presencia de una mutación se estimó la detección de un mínimo de cinco eventos para cada sonda.

9. MICROARRAYS DE SNPs

El análisis de las variaciones en el número de copias cromosómicas (ganancias, pérdidas y amplificaciones) de las muestras de ADN obtenido a partir de biopsias de tejido FFPE y plasma se realizó mediante microarrays, utilizando el kit OncoScan FFPE Assay Kit (Affymetrix, California, EE.UU), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. Este ensayo se basa en el uso de sondas de inversión molecular (MIP, por sus siglas en inglés) y también permite el estudio de mutaciones somáticas en 9 genes (*BRAF*, *EGFR*, *IDH1*, *IDH2*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN* Y *TP53*).

Cada sonda MIP contiene en los extremos una región homóloga a una región diana del ADN genómico (ADNg), que tras hibridar dejan un espacio de un solo nucleótido en donde se localiza un SNP, generando una forma circular incompleta (Figura 18a) (105). Cada región homóloga es de 20 pb de longitud, por lo que el conjunto de sondas puede hibridar ADNg fragmentado de hasta 40 pb, como en el caso del obtenido a partir de tejido FFPE.

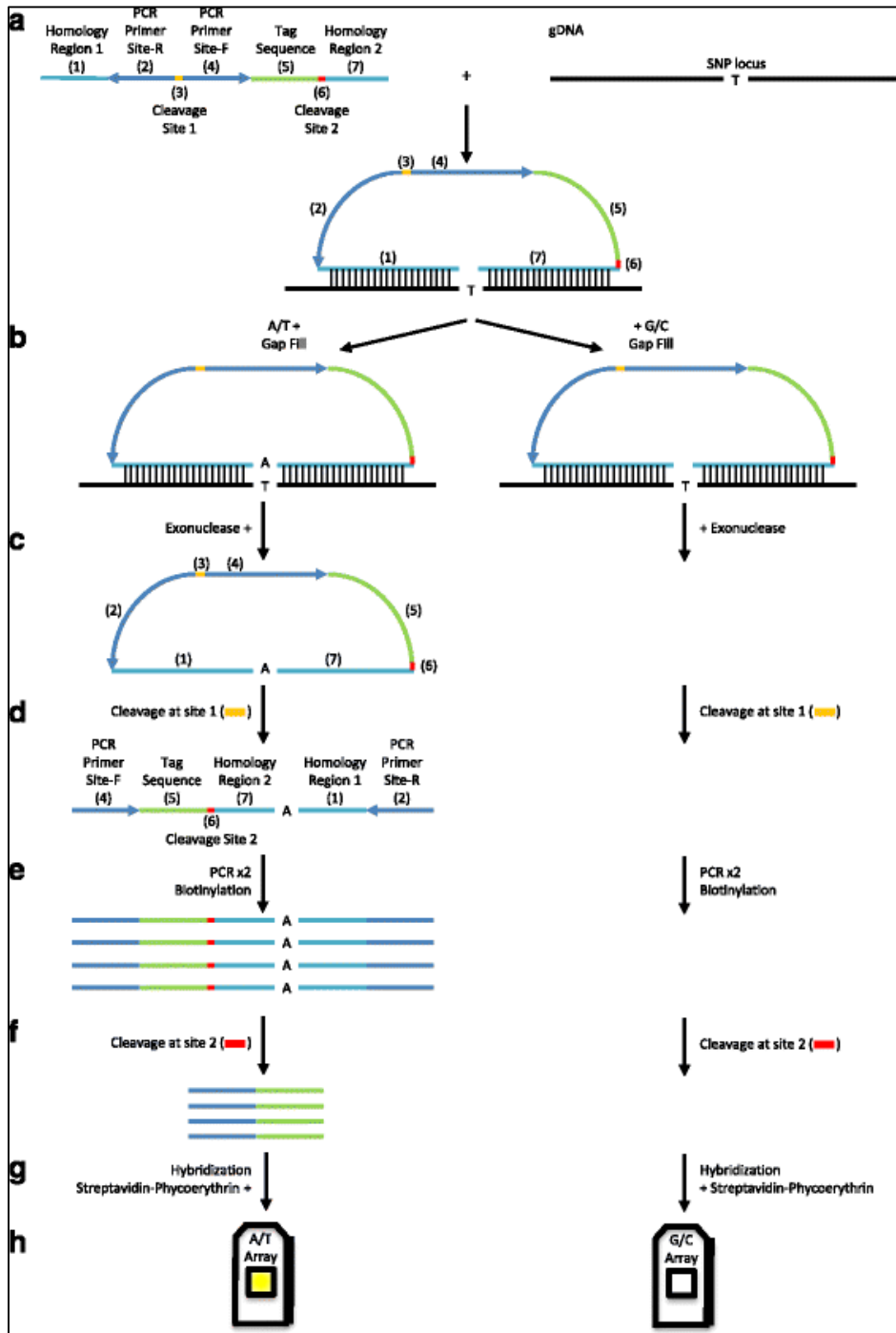


Figura 18: Ensayo de microarrays basado en sondas de inversión molecular. A. Estructura de la sonda de inversión molecular (MIP) con sus dos regiones homólogas de unión al ADN genómico (1), dos regiones de unión a cebadores (2 y 4), una región de hibridación con el microarray (5) y dos sitios de corte específicos (3 y 6). Una vez se da el anillamiento del ADNg con la sonda, se genera una forma circular incompleta y queda un espacio para un único nucleótido. B. Duplicación del ensayo añadiendo nucleótidos A/T o G/C para rellenar el espacio. C. Digestión con exonucleasa. D. Digestión con enzima específica que corta en el sitio 1 para la apertura e inversión de la sonda. E. Amplificación de la sonda por PCR y biotinylación. F. Escisión con enzima de restricción en el sitio 2 para liberar la secuencia de etiqueta o código de barra G. Hibridación con el microarray y posterior tinción con ficoeritrina a través de la interacción biotina-estreptavidina. H. Escaneo de la señal de fluorescencia del array. Los colores amarillo y blanco indican la presencia y ausencia de señal, respectivamente (Imagen obtenida de Jung *et al.*, Applied Cancer Research, 2017)(105)

Se partió de 80 ng totales de ADNg, y se hibridaron durante 16 a 18 horas con una mezcla de sondas MIP a 58 °C en un termociclador Applied Biosystems Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Después de la hibridación, cada muestra se dividió en dos tubos y en cada uno se añadió una mezcla de nucleótidos A y T o G y C. De esta forma, en el tubo donde están presentes los nucleótidos correspondientes, se rellena el hueco con el nucleótido correspondiente y se forma una estructura circular completa, mientras que en los tubos donde no se rellena el hueco en el ADN, las sondas continúan con su forma circular incompleta, para ser eliminadas posteriormente mediante un paso de digestión con exonucleasa (Figura 18b y 18c). A continuación, se realizó una digestión con una enzima que reconoce un sitio de escisión en las sondas MIP, generando una forma lineal con dos secuencias de unión a cebadores en sus extremos y, por tanto, permite llevar a cabo una amplificación por PCR. Durante dicha PCR, se incorporaron nucleótidos marcados con biotina en el producto lo que permite su posterior tinción (Figura 18d y 18e). El producto amplificado se sometió a otra digestión con el fin de separar una parte de la sonda que contiene una secuencia de etiqueta o código de barras, lo que permite identificar la región específica de ADN genómico; y es la que posteriormente se hibrida con las secuencias diana que hay en los microarrays durante 16 a 18 horas a 59 °C (Figura 18f y 18g) (105). Se utilizaron dos arrays por muestra, uno para los productos de reacción tras la unión con nucleótidos A/T y otro para los obtenidos tras la reacción con la mezcla de nucleótidos G/C.

Para lavar y teñir los arrays se utilizó la plataforma GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix). Durante este proceso se eliminan los posibles residuos utilizando tampones de lavado y se tiñen las sondas mediante una tinción en serie con un conjugado de streptavidina-ficoeritrina y un anticuerpo biotinilado anti-streptavidina (Figura 18g) (105). Finalmente, se escanea la señal de fluorescencia de los arrays empleando el escáner GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) (Figura 18h). Los datos proporcionados por este último fueron procesados a través del OncoScan Console Software (Affymetrix) y se analizaron con el Chromosome Analysis Suite (ChAS) (Affymetrix).

Para confirmar el catalogar un tumor melanocítico como maligno se consideró la detección de más de 3 alteraciones cromosómicas, según los criterios de J. Bauer y B. Bastian (72).

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y DE SUPERVIVENCIA

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando pruebas de independencia de Chi-cuadrado basadas en tablas de contingencia para las variables categóricas. El tamaño del efecto se estimó utilizando el Odds Ratio (OR) y un 95% de intervalo de confianza (IC). Se realizaron análisis de varianza mediante ANOVA unidireccional y bidireccional, comparaciones por medio de la prueba t-Student (T-test) y regresiones lineales, para las variables continuas. Los análisis de supervivencia se realizaron mediante curvas de Kaplan-Meier, comparaciones por medio de la prueba de Log-Rank y modelos de regresión de Cox univariantes y multivariante. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $P < 0,05$. Estos análisis se realizaron con los programas GraphPad Prism, GP (versión 8.0.1 para Windows, San Diego, California), SPSS Statistics (versión 21.0.0 para Windows, IBM, Nueva York, EE.UU.) y R statistical analysis software (versión 4.0.3 para MacOS, Viena, Austria).

RESULTADOS

1. DATOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Se revisaron las historias clínicas de los pacientes incluidos en el estudio para recoger sus datos clínicos (sexo, edad, fecha de diagnóstico y localización del melanoma primario, fecha de detección y localización de las metástasis, supervivencia global y libre de progresión, estatus vivo o muerto) e histológicos (tipo histológico, nivel de Clark, espesor de Breslow, presencia de ulceración, regresión e infiltrado inflamatorio) relevantes para el estudio. Estos datos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 3: Datos clínicos e histológicos de 53 pacientes con melanoma metastásico

Datos clínicos e histológicos	Número (%)
Sexo	
Hombres	28 (53%)
Mujeres	25 (47%)
Edad al diagnóstico (años)*	
Media (Rango)	58 (13-91)
< 70	31 (59%)
≥ 70	15 (28%)
Tipo histológico	
Melanoma de extensión superficial (MES)	22 (42%)
Melanoma nodular (MN)	15 (28%)
Léntigo maligno melanoma (LMM)	1 (2%)
Melanoma lentiginoso acral (MLA)	2 (3%)
Otras variantes histológicas ¹	2 (4%)
Localización del melanoma primario*	
Piel acral	2 (3%)
Piel no acral	38 (72%)
Mucosas	2 (3%)
Espesor de Breslow (mm)*	
Media (Rango)	3.14 (0.52-28.0)
Bajo (0.01-1.00)	4 (8%)
Medio (1.01-3.99)	22 (42%)
Alto (> 4.00)	14 (26%)

Nivel de Clark*	
I	0 (0%)
II	1 (2%)
III	14 (26%)
IV	17 (32%)
V	7 (13%)
Ulceración*	
Presencia	17 (32%)
Ausencia	21 (40%)
Respuesta inflamatoria*	
Presencia	8 (15%)
Ausencia	22 (42%)
Tasa mitótica (mitosis/mm²)*	
< 1	5 (9,5%)
> 1	17 (32%)
Localización de la metástasis	
Ganglio linfático	20 (38%)
Piel acral	0 (0%)
Piel no acral	19 (36%)
Otras ²	14 (26%)
Supervivencia (meses)*	
<i>Supervivencia libre de progresión (SLP)</i>	
Media (rango)	19.4 (0.8-182.6)
Progresión a los 45 meses	41 (77%)
<i>Supervivencia global (SG)</i>	
Media (rango)	71.5 (3.6-232.1)
Progresión a los 45 meses	20 (38%)
Estatus en el último seguimiento	
Vivo	25 (47%)
Muerto	28 (53%)

* Los números no siempre suman el total (N=53) debido a la falta de datos.

1 Otras variantes histológicas incluyen melanoma spitzoide y desmoplásico.

2 Otras localizaciones de metástasis incluyen partes blandas y órganos distantes.

2. MUTACIÓN DEL PROMOTOR DE *TERT* EN MELANOMA

2.1 Estado mutacional

Para evaluar el estado mutacional de *pTERT* como potencial biomarcador en melanoma, se analizaron 88 muestras de tejido FFPE por pirosecuenciación y secuenciación Sanger. Se detectaron mutaciones en *pTERT* en el 69% (61/88) de las muestras analizadas, siendo la proporción de casos mutados *pTERT* similar en el grupo de los melanomas primarios (66%, 25/38) y en el grupo de los melanomas metastásicos (72%, 36/50). En cuanto al tipo de mutación detectada, la mutación C250T estaba presente en el 59% (36/61), la mutación C228T en el 38% (23/61) y la mutación CC228-229TT en el 3% (2/61) de los melanomas mutados (Anexo 1). No se observaron mutaciones de *pTERT* en las 7 muestras control de piel normal y en las 6 muestras de *nevus* melanocítico. Por su parte, se detectaron mutaciones de *pTERT* en el 83% (5/6) de las líneas celulares analizadas. Los datos obtenidos se detallan en la siguiente tabla:

Tabla 4: Frecuencias de mutación del promotor de *TERT* en muestras de melanoma (primario y metástasis) y muestras control (piel normal, *nevus* y líneas celulares) analizadas por pirosecuenciación.

<i>pTERT</i>	Muestras de melanoma		Muestras de control		
	Primario ¹ (n = 38)	Metástasis ¹ (n = 50)	Piel normal (n = 7)	<i>Nevus</i> (n = 6)	Líneas celulares (n = 6)
Wild Type	13 (34%)	14 (28%)	7 (100%)	6 (100%)	1 (17%)
Mutado	25 (66%)	36 (72%)	-	-	5 (83%)
C250T	15 (60%)	21 (58%)	-	-	2 (40%)
C228T	9 (36%)	14 (39%)	-	-	2 (40%)
CC228-229TT	1 (4%)	1 (3%)	-	-	-
CC242-243TT	-	-	-	-	1 (20%)

¹ La secuenciación Sanger se utilizó para confirmar los resultados discordantes entre muestras pareadas del mismo paciente (tumor primario vs metástasis).

pTERT = promotor de *TERT*

A continuación, se muestran algunos ejemplos de las mutaciones detectadas por pirosecuenciación y secuenciación Sanger:

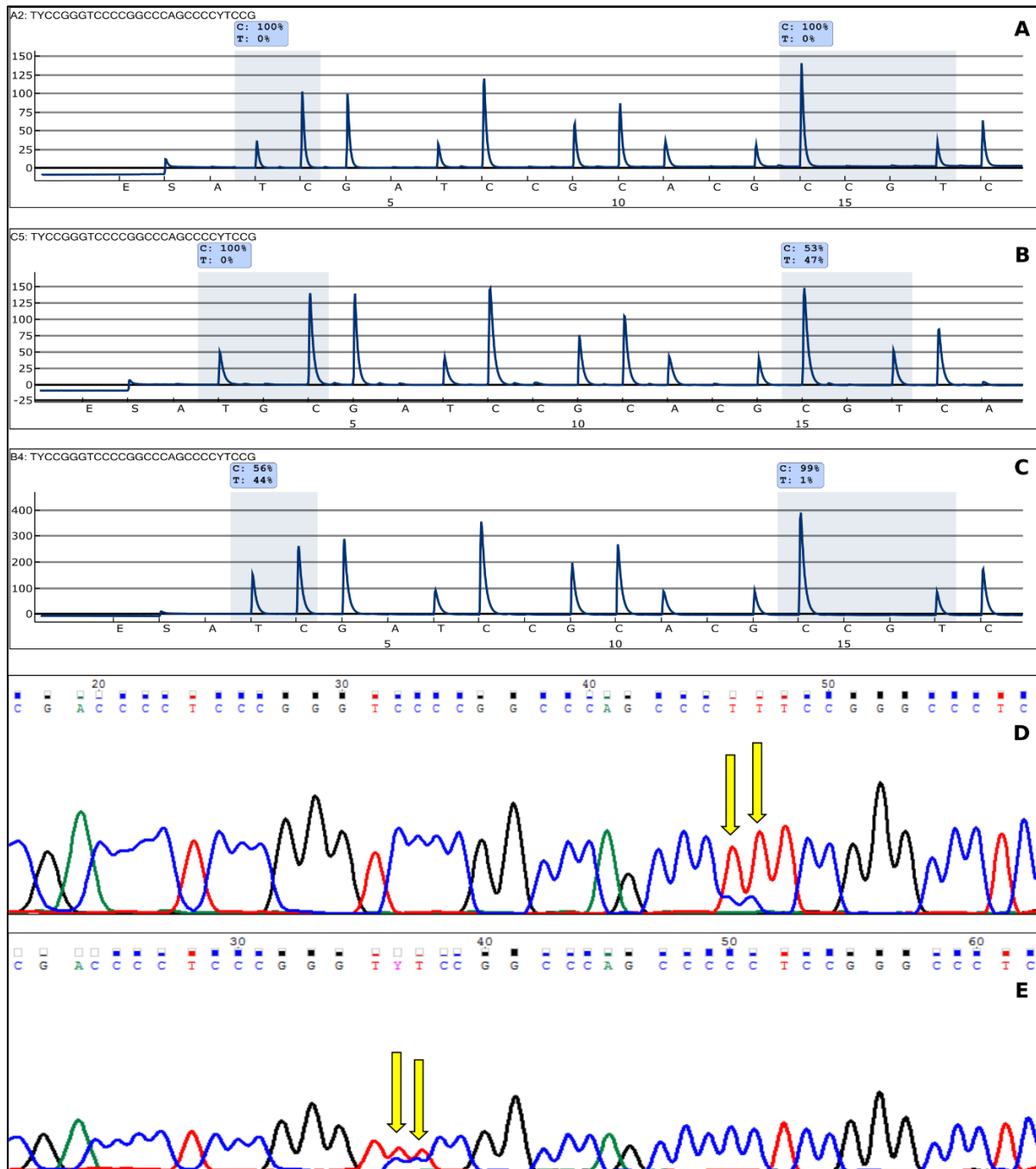


Figura 19: Ejemplo de mutaciones en el promotor de *TERT* detectadas mediante pirosecuenciación y secuenciación Sanger. **A.** Pirograma de una muestra de melanoma analizada mediante pirosecuenciación en la que no se detecta mutación en *pTERT*. **B.** Pirograma de una muestra de melanoma en la que se detecta la mutación C228T. **C.** Pirograma de una muestra de melanoma en la que se detecta la mutación C250T. **D.** La mutación en tándem CC228-229TT, menos frecuente en melanoma, detectada por secuenciación Sanger (señalada con flechas amarillas). **E.** Detección de la mutación en tandem CC242-243TT por secuenciación Sanger en una muestra de línea celular de melanoma (señalada con flechas amarillas).

2.2 Mutación de *pTERT* en muestras pareadas de melanoma primario y metástasis

Se analizó el estado mutacional de *pTERT* en 35 de los 53 pacientes incluidos en el estudio de los que se disponía de muestras pareadas de tumor primario y metástasis. Se observó que la mutación de *pTERT* se mantenía en el tumor primario y en su correspondiente metástasis en el 77% (27/35) de los pacientes, mostrando una correlación positiva estadísticamente significativa (χ^2 OR 16.0, 95% intervalo de confianza [IC] 2.56–100.08, $p = 0.001$). En cuanto al tipo de mutación identificada, la mutación C250T se detectó en el 31% (11/35), la mutación C228T en el 20% (7/35) y la mutación CC228-229TT en el 3% (1/35) de los pacientes. En los 16 pacientes restantes, la mitad eran *pTERT* no mutado o wild type (WT) (23%, 8/35) y la otra mitad mostraron un estado mutacional de *pTERT* discordante entre el tumor primario y la metástasis: El 62,5% (5/8) adquirió la mutación, el 25% (2/8) la perdió y el 12,5% (1/8) la cambió en el tumor metastásico (Anexo 1). Para descartar un posible problema de sensibilidad en los casos discordantes, se utilizó una técnica adicional más sensible como la PCR digital, en la que se obtuvieron los mismos resultados. A continuación, se detallan los resultados obtenidos en las muestras pareadas de tumor primario y su metástasis:

Tabla 5: Frecuencias de mutación del promotor de *TERT* en muestras pareadas en muestras de tejido de tumores primarios y sus metástasis pertenecientes a 35 pacientes de melanoma.

Estado mutacional <i>pTERT</i> ¹	Tumores metastásicos			
	Wild Type (n=10)	C250T (n=15)	C228T (n=9)	CC228-229TT (n=1)
Tumores primarios				
Wild Type (n=13)	8 (23%)	4 (11%)	1 (3%)	0 (0%)
C250T (n=13)	1 (3%)	11 (31%)	1 (3%)	0 (0%)
C228T (n=8)	1 (3%)	0 (0%)	7 (20%)	0 (0%)
CC228-229TT (n=1)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3%)

¹ El estado de mutación de *pTERT* se analizó por Pirosecuenciación. Se utilizó la secuenciación Sanger para confirmar los resultados discordantes entre muestras pareadas del mismo paciente (primario vs metástasis). *pTERT* = promotor de *TERT*

2.3 Coexistencia de mutaciones en *BRAF* o *NRAS* y *pTERT*

Se analizó la coexistencia de mutaciones en los genes *BRAF* o *NRAS* y *pTERT* en los 53 pacientes de la serie de melanoma en estudio. Se detectaron mutaciones en *BRAF* y *NRAS* en el 62% (33/53) y el 27% (14/52) de los pacientes, respectivamente. Después de excluir a los pacientes con resultados discordantes para la mutación *pTERT* entre el tumor primario y la metástasis (8/53) o no valorables para *BRAF/NRAS* (1/53), se observó la coexistencia de mutaciones en *BRAF* y en *pTERT* en el 47% (21/45) de los pacientes, de los cuales el 57% (12/21) presentaron la mutación C250T y el 43% (9/21) la mutación C228T. Por su parte, las mutaciones en *NRAS* y *pTERT* coexistían en un 18% (8/44) de los pacientes, de los cuales, el 88% (7/8) presentaron la mutación C250T y el 12% (1/8) la mutación CC228-229TT. No se encontraron casos mutados en *NRAS* con la mutación C228T. Además, en 4 de los 5 (80%) pacientes que tenían *BRAF* y *NRAS* WT, se identificó la mutación C228T, siendo el paciente restante *pTERT* WT (20%). Por lo tanto, se observó una asociación estadísticamente significativa entre el estado de mutación de *BRAF* o *NRAS*, y la posición de la mutación presente en *pTERT* (C250T o C228T), siendo la mutación C250T la más frecuente en los pacientes con mutación de *NRAS* (χ^2 OR 2.0, 95% IC 1.34–2.98, $p = 0.017$):

Tabla 6: Coexistencia de mutaciones del promotor de *TERT* y mutaciones de *BRAF/NRAS* en muestras de tejido de 44 pacientes con melanoma.

Pacientes con melanoma (n=44) ¹	Estado mutacional de <i>BRAF</i> / <i>NRAS</i> ³		
	Wild Type (n=4)	<i>BRAF</i> mutado (n=27)	<i>NRAS</i> mutado (n=13)
Estado mutacional de <i>pTERT</i> ²			
Wild Type (n=12)	1 (2%)	6 (14%)	5 (11%)
C250T (n=19)	0 (0%)	12 (27%)	7 (16%)
C228T (n=12)	3 (7%)	9 (21%)	0 (0%)
CC228-229TT (n=1)	0 (0%)	0 (0%)	1 (2%)

¹ Se ha excluido del análisis a los pacientes con resultados discordantes para la mutación de *pTERT* (8/53) o no valorables para la detección de mutaciones de *BRAF* o *NRAS* (1/53).

² El estado de mutación de *pTERT* se analizó mediante pirosecuenciación. Se utilizó la secuenciación Sanger para confirmar los resultados discordantes entre muestras pareadas del mismo paciente (primario vs metástasis).

³ El estado de mutación de *BRAF* y *NRAS* fue analizado mediante PCR cuantitativa (qPCR).

pTERT = promotor de *TERT*

3. METILACIÓN DEL PROMOTOR DE *TERT* EN MELANOMA

3.1 Estado de metilación

Para entender la regulación del gen *TERT* en melanoma, además de las mutaciones, se analizaron los niveles de metilación de la región promotora de *TERT* en los 53 pacientes de la serie y en las muestras control mediante MS-PCR. A continuación, se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos tras analizar los productos de la MS-PCR por electroforesis en gel de agarosa:

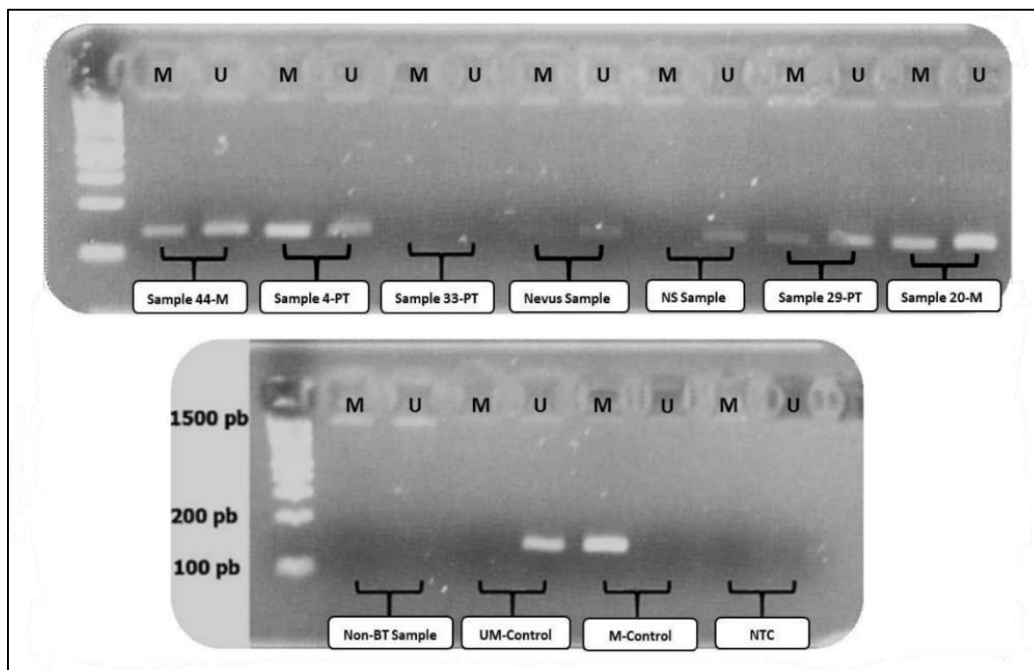


Figura 20: Detección del estado de metilación del promotor de *TERT* mediante PCR específica de metilación y electroforesis en gel de agarosa. Se muestra un ejemplo de un gel de agarosa en donde se han cargado tres tumores primarios (PT), dos melanomas metastásicos (M) y dos muestras de control (*nevus* y piel normal [NS]). U y M denotan la amplificación de genes no metilados y metilados, respectivamente. Se utilizó un ADN metilado comercial como control positivo (**control M**) y ADN no metilado comercial como control negativo (**control UM**). También se incluyeron como controles de la PCR una muestra sin tratar con bisulfito (**non-BT**) y un blanco (**NTC**). Después de realizar una doble normalización (descrita en Materiales y métodos), observamos que tres de las muestras mostraron hipermetilación (44-M, 4-PT y 20-M), dos mostraron hipometilación (Nevus y 29PT) y la muestra de piel normal no estaba metilada. La muestra de 33-PT no tuvo resultado valorable.

Se observaron niveles más altos de metilación de *pTERT* en las muestras y en las líneas celulares de melanoma que en las pieles normales y los *nevus* melanocíticos, tal como se muestra en la siguiente figura:

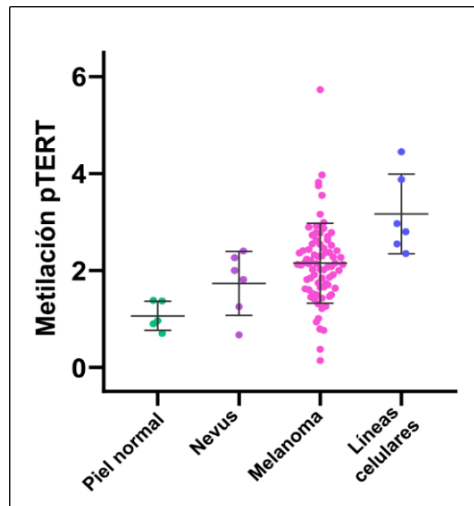


Figura 21: Niveles de metilación del promotor de *TERT* en muestras control y de melanoma. Valores normalizados de metilación de *pTERT* en muestras de piel normal (n=5), *nevus* (n=6), melanoma (n=78) y líneas celulares (n=6). Los niveles de metilación de *pTERT* se obtuvieron mediante una PCR específica de metilación (MS-PCR) y una doble normalización, utilizando muestras de piel normal como referencia. Las muestras control mostraron niveles más bajos de metilación de *pTERT* que las muestras de melanoma, mientras que los niveles de metilación más altos corresponden con las líneas celulares.

Después de excluir del análisis aquellas muestras que fueron descartadas por no tener cantidades suficientes de ADN para realizar la técnica o que tuvieron un resultado no valorable (8/88), se dividió la serie en dos grupos como se detalla en Materiales y Métodos, detectándose hipermetilación de *pTERT* en el 48% (38/80) e hipometilación en el 52% (42/80) de las muestras de melanoma, tal como y como se muestra en la Figura 22, siendo la proporción de casos hipermetilados similar en el grupo de los melanomas primarios (50%, 17/34) y en el grupo de los melanomas metastásicos (46%, 21/46).

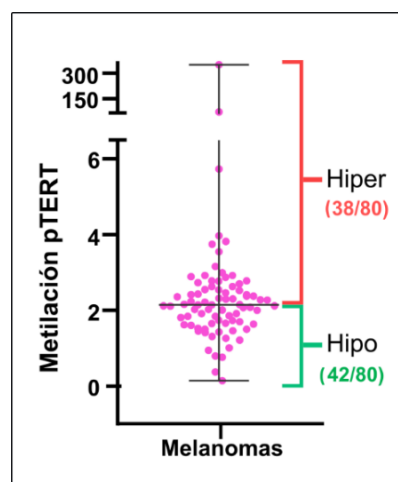


Figura 22: Estratificación de pacientes con *pTERT* hipermetilado e hipometilado. Para definir los dos grupos se utilizó como punto de corte la mediana de los niveles de metilación normalizados de *pTERT* perteneciente a la serie de 80 muestras de melanoma.

3.2 Estado de metilación en muestras pareadas de melanoma primario y metástasis

El 81% de los casos con resultado valorable (25/31) para la metilación de *pTERT* mantuvieron los niveles de metilación entre muestras pareadas de melanoma primario y metástasis, con una correlación positiva estadísticamente significativa (χ^2 OR 17.33, 95% IC 2.92–103.02, $p=0.001$). De manera que el 39% (12/31) de los casos mostraron hipermetilación de *pTERT* mientras que el 42% (13/31) tenían *pTERT* hipometilado, en ambas lesiones. El 19% (6/31) restante mostró un resultado discordante, tal que la mitad de los casos (3/6) tenían *pTERT* hipermetilado solo en el tumor primario, y la otra mitad solo en la metástasis (3/6) (Anexo 1).

3.3 Estado de metilación en muestras *BRAF* o *NRAS* y/o *pTERT* mutadas

Se observaron altos niveles de metilación en el 68% (15/22) de los melanomas que carecían de mutaciones de *pTERT* en comparación con el 40% (23/58) de las muestras *pTERT* mutadas. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas, por lo que los melanomas sin mutaciones en *pTERT* tenían más probabilidades de presentar hipermetilación del promotor (χ^2 OR 3.2, 95% CI 1.15–9.09, $p = 0.023$) (Anexo 1). Esta correlación es independiente de la posición de la mutación, C250T o C228T, tal como se detalla en la siguiente figura:

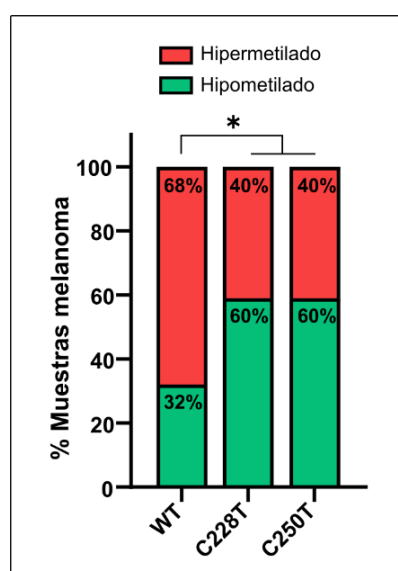


Figura 23: Asociación entre el estado mutacional y de metilación del promotor de *TERT* en el melanoma. Se observó una correlación positiva entre el estado de metilación de *pTERT* (hipo e hipermetilado) y el estado mutacional (WT, C228T y C228T) en las muestras de melanoma de la serie a partir de una prueba de Chi-cuadrado (χ^2) con $p = 0.023$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y **** $P < 0.0001$.

Asimismo, se detectó hipermetilación de *pTERT* en el 54% (26/48) de las muestras mutadas en *BRAF*, en comparación con el 32% (7/22) de las muestras con mutación en *NRAS* que mostraron hipermetilación. Por su parte, en las muestras WT para *BRAF/NRAS* se observó un 44% (4/9) de muestras con hipermetilación de *pTERT*. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas (*BRAF*: χ^2 OR 1.62, 95% IC 0.45–5.81, $p = 0.461$; *NRAS*: χ^2 OR 1.97, 95% IC 0.79–4.91, $p = 0.144$), como se observa en la figura:

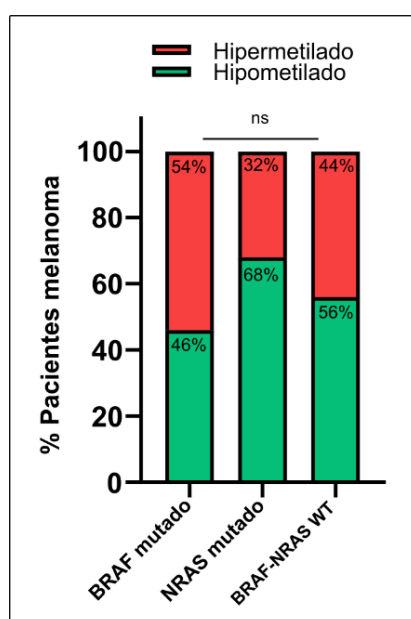


Figura 24: Asociación entre la metilación del promotor de *TERT* y el estado mutacional de *BRAF* y *NRAS* en melanoma. No se detectó correlación entre el estado de metilación de *pTERT* (hipometilado e hipermetilado) y la presencia de mutaciones conductoras (*BRAF* y *NRAS*) en los pacientes de melanoma a partir de una prueba de Chi-cuadrado (χ^2) (*BRAF*: $p = 0.461$; *NRAS* $p = 0.144$). *ns* = *no significativo*.

4. EXPRESIÓN DE *TERT* EN MELANOMA

4.1 Niveles de ARN mensajero (ARNm)

Se analizaron los niveles de expresión de *TERT* mediante el estudio del ARNm por RT-qPCR en los 53 pacientes de melanoma de la serie y en las muestras control incluidas en el estudio. Se detectaron niveles de ARNm más altos en las muestras de melanoma y en las líneas celulares en comparación con las muestras control de piel normal y *nevus* melanocítico, en las que no se detectaron niveles de expresión de *TERT*. El resultado de esta comparativa se muestra en la siguiente figura:

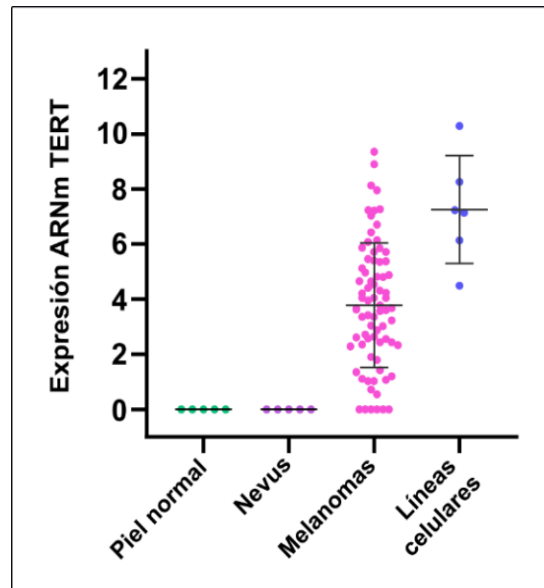


Figura 25: Niveles de expresión del ARNm de *TERT* en muestras control y de melanoma. Valores relativos de expresión del ARNm de *TERT* en muestras de piel normal (n=5), *nevus* (n=5), melanoma (n=76) y líneas celulares (n=6); detectados a partir de PCR cuantitativa de transcripción inversa (RT-qPCR), utilizando GAPDH como control endógeno. No se detectó expresión de *TERT* en las muestras control de piel normal y *nevus*, mientras que la media de los niveles de expresión de *TERT* fue mayor en las líneas celulares que en las muestras de melanoma.

En el estudio de expresión se excluyeron aquellas muestras de las que no se disponía de la cantidad suficiente de ácidos nucleicos para hacer el análisis o que tuvieron un resultado no valorable (12/88). Posteriormente, la serie de melanoma se dividió en dos grupos siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. De esta manera, se detectó una alta expresión de ARNm en el 49% (37/76) y una baja expresión en el 51% (39/76) de las muestras., tal y como se muestra en la Figura 26. Esta proporción cambia ligeramente entre las muestras de melanoma primario (45%, 14/31 con alta expresión) y melanoma metastásico (62%, 28/45 con alta expresión), sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (χ^2 OR 2.0, 95% IC 0.83–5.09, $p = 0.141$; t-student test $p = 0.237$, no se muestra gráfica).

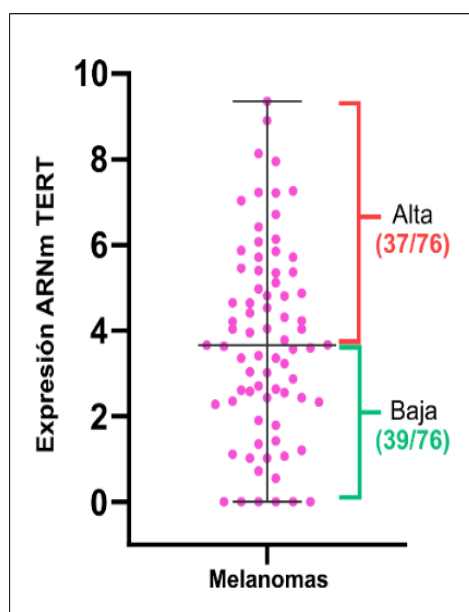


Figura 26: Estratificación de pacientes según los niveles de expresión del ARNm de *TERT* en melanoma. Para definir los dos grupos de expresión de *TERT* (alta y baja) se utilizó como punto de corte la mediana de los niveles de expresión normalizados de ARNm perteneciente a 76 muestras de melanoma de la serie.

4.2 Niveles de expresión en muestras pareadas de melanoma primario y sus metástasis

Los niveles de expresión de ARNm de *TERT* se mantuvieron en el 65,5% (19/29) de los pacientes con muestras pareadas de melanoma primario y su correspondiente metástasis, aunque dicha correlación positiva no fue estadísticamente significativa (χ^2 OR 4.3, 95% CI 0.84–21.76, $p = 0.071$). De estos pacientes, el 31% (9/29) mostraba niveles altos y el 34,5% (10/29) niveles bajos de expresión de *TERT* tanto en el melanoma primario como en su metástasis, existiendo un 34,5% (10/29) de casos discordantes. El 70% (7/10) de los pacientes con resultado discordante mostraba niveles de expresión altos en la metástasis, pero no en el tumor primario, mientras que el 30% (3/10) restante mostraba hipermetilación de *pTERT* en el tumor primario, pero no en la metástasis (Anexo 1).

4.3 Efecto de la mutación y/o metilación de la región promotora en los niveles de expresión

El 50% (26/52) de las muestras mutadas en *pTERT* y el 46% (11/24) de las muestras *pTERT* WT mostraron altos niveles de expresión de ARNm, sin detectarse diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (χ^2 OR 1.2, 95% IC 0.45–3.12, $p = 0.736$; t-student test $p = 0,627$). Sin embargo, al analizar los niveles de expresión en cada tipo de mutación de forma independiente, observamos que la mutación *pTERT* C250T se asoció con mayores niveles de expresión de ARNm de

TERT en el 59% (19/32) de las muestras, en comparación con el 28% (5/18) de las muestras con alta expresión y la mutación C228T (χ^2 OR 3.8, 95% IC 1.09–13.26, $p = 0.032$; t-student test $p = 0.041$).

Ambas comparativas se muestran en la siguiente figura:

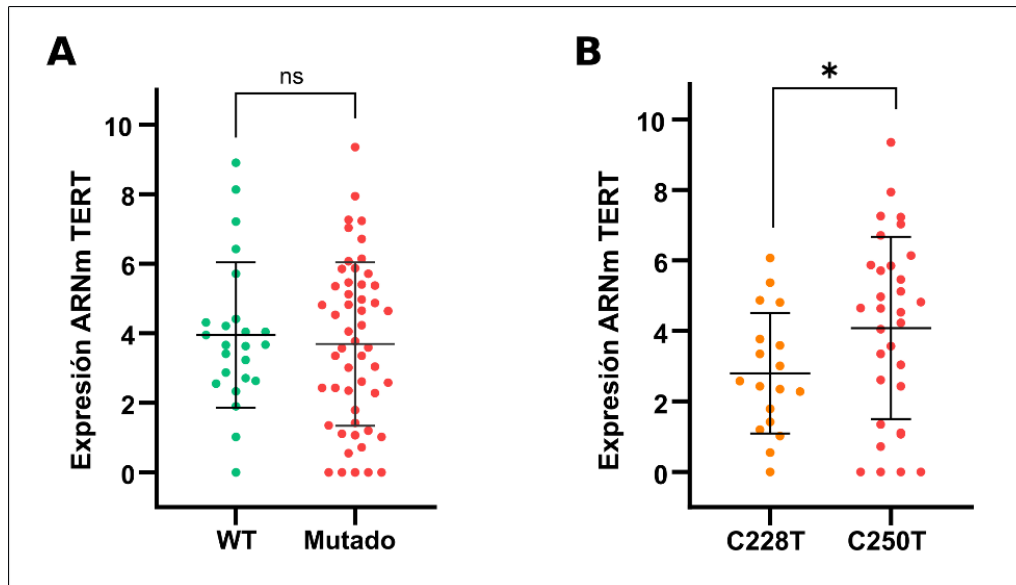


Figura 27: Asociación entre los niveles de expresión del ARNm de *TERT* y el estado mutacional de la región promotora. **A.** Comparación de la media +/- la desviación estándar (DE) de los niveles de expresión del ARNm de *TERT* entre las muestras de melanoma con *pTERT* WT (n=24) y *pTERT* mutado (n=52). Prueba t de student no significativa (ns) con $p = 0.627$ **B.** Comparación de la media +/- DE de los niveles de expresión del ARNm de *TERT* entre muestras de melanoma con la mutación C228T de *pTERT* (n=18) y la mutación C250T (n=32). Correlación significativa por prueba t de student con $p = 0,041$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y **** $P < 0.0001$.

Por su parte, el 49% (20/41) y el 51% (21/41) de las muestras de melanoma que presentaban hipometilación en *pTERT* mostraban baja y alta expresión de ARNm respectivamente, mientras que el 53% (16/30) y el 47% (14/30) de las muestras hípermetiladas tenían baja y alta expresión de *TERT*, respectivamente. Por tanto, no se detectó una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de metilación y los niveles de expresión de ARNm de *TERT* en nuestra serie (χ^2 OR 0.8, 95% IC 0.32–2.10, $p = 0.705$; t-student test $p = 0.796$), tal y como se muestra en la Figura 28:

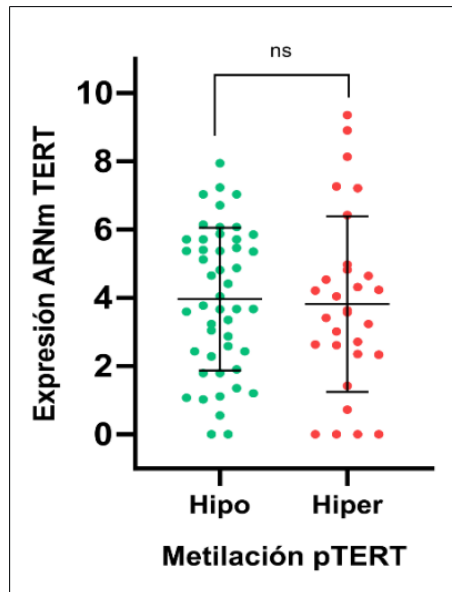


Figura 28: Asociación entre la expresión del ARNm de *TERT* y la metilación del promotor en melanoma. No se detectó correlación entre el estado de metilación de *pTERT* (hipometilado e hipermetilado) y los niveles de expresión del ARNm de *TERT* en los pacientes de melanoma de la serie a partir de una prueba t-student $p = 0.796$. *ns* = no significativa.

4.4 Efecto de la mutación en *BRAF* o *NRAS* en los niveles de expresión de *TERT*

Al analizar en conjunto los niveles de expresión de ARNm de *TERT* en relación con el estado de mutación de *BRAF/NRAS*, observamos que el 46% (21/46) y el 73% (16/22) de melanomas con mutaciones en *BRAF* o *NRAS*, respectivamente, mostraron una alta expresión de *TERT*, mientras que ninguna de las 8 muestras con *BRAF/NRAS* WT mostró una alta expresión de *TERT*; siendo estas diferencias estadísticamente significativas (χ^2 OR 4.2, 95% IC 1.41–12.41, $p = 0.007$; ANOVA $p = 0.001$), tal y como se observa en la figura 29.

Teniendo en cuenta que la mayoría de las muestras en las que coexisten mutaciones de *NRAS* y *pTERT* presentan la mutación C250T, se realizó un análisis bidireccional para examinar si ambas variables se afectan entre sí al influir en la expresión de ARNm de *TERT*. Este análisis reveló que no existe interacción entre el estado mutacional de *NRAS* y el tipo de mutación presente en *pTERT* (C250T o C228T) por lo que ambos factores tienen un efecto independiente sobre la expresión de *TERT* (ANOVA bidireccional P valor interacción = 0,971).

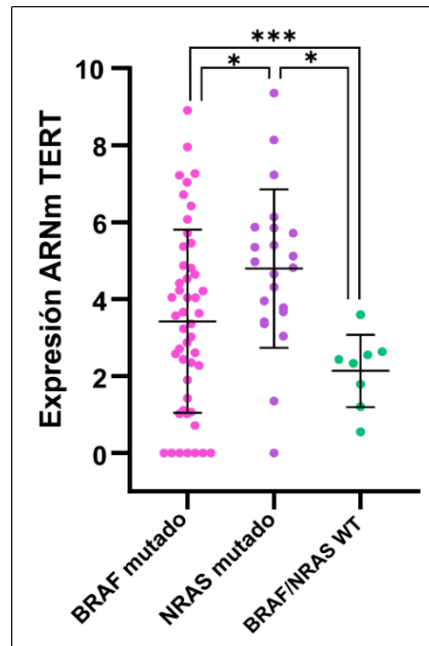


Figura 29: Asociación entre el estado mutacional de *NRAS* y *BRAF* y los niveles de expresión del ARNm de *TERT*. Comparación de la media +/- la desviación estándar de los niveles de expresión del ARNm de *TERT* entre las muestras de melanoma con *BRAF* mutado (n=48), *NRAS* mutado (n=22), y de tipo salvaje (WT) para ambos genes (n=8). Prueba de ANOVA significativa con $p = 0.0007$. Prueba de comparaciones múltiples: *NRAS* mutado vs *BRAF* mutado ($p = 0,046$); *BRAF* mutado vs WT para ambos genes ($p = 0,031$), y *NRAS* mutado vs WT para ambos genes ($p = 0,0001$). * $P < 0.050$, ** $P < 0.010$, *** $P < 0.001$, y **** $P < 0.0001$.

5. RELACIÓN DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES EN *TERT* CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DE LOS PACIENTES CON MELANOMA

Se analizó la relación entre las alteraciones en *TERT* (mutación, hipermetilación y sobreexpresión) y las características clínicas e histológicas de los pacientes, entre las que se incluyeron: sexo, edad en el momento del diagnóstico, tipo histológico y localización anatómica del tumor primario, espesor de Breslow, nivel de Clark, ulceración, respuesta inflamatoria, índice mitótico, y localización y número de metástasis (Tabla 3). Se observó que el sexo de los pacientes y el índice de Breslow del tumor primario fueron los únicos parámetros clínicos e histológicos significativamente relacionados con alguna de las alteraciones moleculares analizadas en *TERT*. En este análisis no fueron incluidos aquellos pacientes que mostraron resultados discordantes entre las muestras de melanoma primario y sus metástasis para la mutación en *pTERT*, la metilación y/o la expresión.

5.1 Sexo de los pacientes

Se observó una posible relación entre el estado de mutación de *pTERT* y el sexo de los pacientes con melanoma, de manera que el 58% (11/19) de las mujeres y el 84% (21/25) de los hombres mostraron mutación en *pTERT*, respectivamente, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (χ^2 OR 3.2, 95% IC 0.81–12.91, $p = 0.089$). Además, en las pacientes mujeres se observó una tendencia a presentar una mayor proporción de la mutación C250T (82%, 9/11) en comparación con los pacientes varones (48%, 10/21) (χ^2 OR 0.2, 95% IC 0.04–1.17, $p = 0.061$). También se detectó que el 71% (12/17) de las mujeres tenían una alta expresión de ARNm de *TERT*, mientras que sólo el 30% (6/20) de los hombres mostraron alta expresión. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (χ^2 OR 0.2, 95% IC 0.04–0.74, $p = 0.014$). Asimismo, se observó que los hombres tienden a mostrar más hipermetilación en *pTERT* (63%, 12/19) que las mujeres (35%, 8/23) (χ^2 OR 3.2, 95% IC 0.91–11.41, $p = 0.067$). Por otro lado, también se detectó una asociación positiva entre el estado mutacional de *BRAF/NRAS* con el sexo de los pacientes, existiendo una mayor proporción de varones con *BRAF* mutado (91%, 20/22) en comparación con las mujeres, en las que *BRAF* y *NRAS* estaban mutados de forma similar (χ^2 OR 9.2, 95% IC 1.90–44.61, $p = 0.0045$) (Anexo 1). En la siguiente figura se muestran estas cuatro comparaciones:

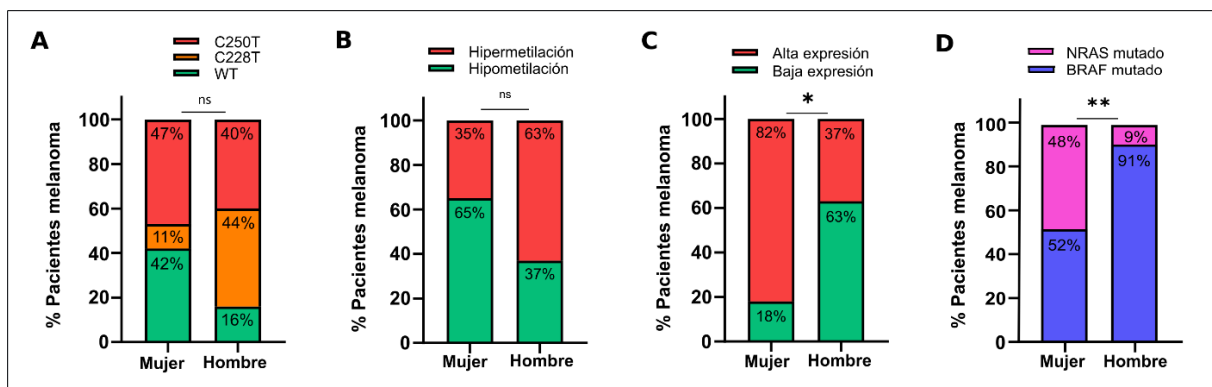


Figura 30: Asociación entre la presencia de alteraciones en *TERT*, *BRAF* o *NRAS* y el sexo de los pacientes con melanoma. A. Se observó una mayor frecuencia de mutación en el promotor de *TERT* (*pTERT*) en los pacientes varones en comparación con las mujeres, pero en las mujeres la mutación C250T era más frecuente que la C228T. Estas diferencias no fueron significativas según la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) ($p = 0.089$ y $p = 0.061$). B. Los hombres tendieron a mostrar más hipermetilación en *pTERT* que las mujeres, pero las diferencias no fueron significativas según la prueba χ^2 con una $p = 0,067$. C. Se detectaron niveles más altos de expresión del ARNm de *TERT* en las mujeres que en los hombres, con una correlación positiva según la prueba χ^2 ($p = 0,014$). D. Se observó que los hombres mostraban una mayor frecuencia de mutación de *BRAF* que de *NRAS* en comparación con las mujeres (χ^2 positiva con $p = 0,004$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y **** $P < 0.0001$.

5.2 Espesor de Breslow del tumor primario

Se observó que todos los pacientes (3/3) con melanoma de bajo índice de Breslow (<1,0mm) en su tumor primario carecían de mutaciones en *pTERT*, en comparación con el 74% (14/19) de pacientes de índice medio (1,0-4,0mm) o el 77% (10/13) de casos de alto índice de Breslow (>4,0mm) que mostraban mutaciones en *pTERT* (χ^2 OR 1.4, 95% IC 0.96–1.98, $p = 0.006$). Además, la mutación C250T fue más prevalente en pacientes con espesor de Breslow alto (80%, 8/10) en comparación con aquellos con riesgo medio (50%, 7/14). Asimismo, los melanomas de alto índice de Breslow tendían a presentar niveles más altos de expresión de ARNm de *TERT* que los pacientes con índice medio y bajo (χ^2 OR 1.6, 95% IC 0.94–2.74, $p = 0.070$) (Anexo 1). Sin embargo, no se observó una asociación estadísticamente significativa entre el espesor de Breslow y el estado de metilación de *pTERT* (χ^2 OR 1.4, 95% IC 0.61–2.57, $p = 0.619$). Estas tres comparaciones se muestran en la figura 31. Por último, no se observaron diferencias significativas entre la frecuencia de mutación de *BRAF/NRAS* y el espesor de Breslow del tumor primario (p valor =0,272; no se muestran los datos).

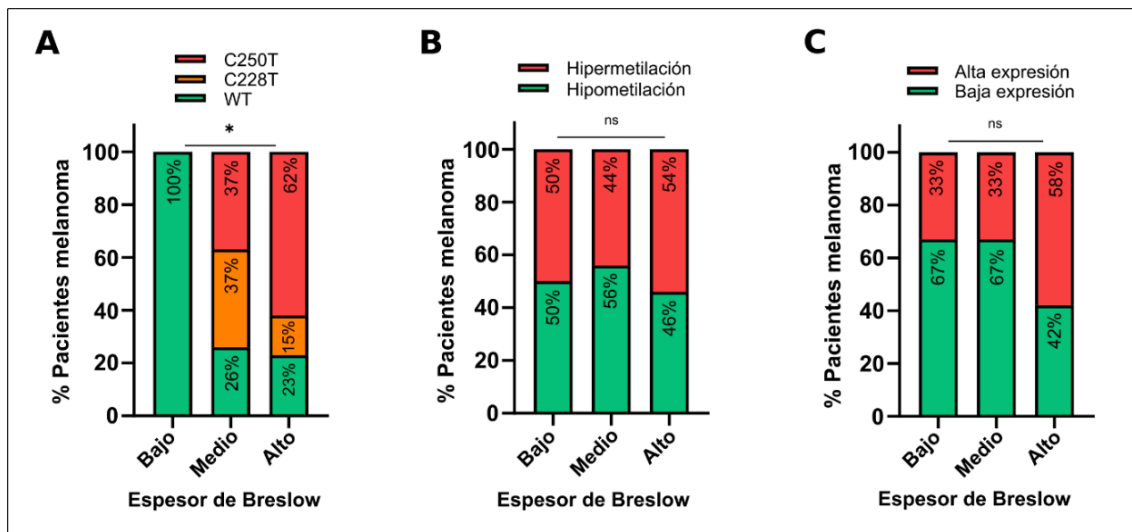


Figura 31: Asociación entre la presencia de alteraciones en *TERT* y el espesor de Breslow en melanoma primario. **A.** Los melanomas con grosor de Breslow medio y alto mostraron una mayor proporción de mutación en el promotor de *TERT* (*pTERT*) que los tumores con Breslow bajo. Además, en los tumores de mayor grosor la mutación C250T era más frecuente que la C228T. Estas diferencias fueron significativas según la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) ($p = 0.006$). **B.** No se observó asociación entre la metilación en *pTERT* y el espesor del Breslow según la prueba χ^2 con una $p = 0,619$. **C.** Se detectaron niveles más altos de expresión del ARNm de *TERT* en los tumores que tenían mayor espesor de Breslow, pero esta relación no fue significativa según la prueba χ^2 ($p = 0,070$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y **** $P < 0.0001$; ns = asociación no significativa.

6. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

El análisis de supervivencia se realizó con el fin de evaluar el potencial efecto de las alteraciones moleculares de *TERT* (mutación, hipermetilación y/o sobreexpresión) en la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de progresión (SLP) de los pacientes con melanoma. Primero se realizó un análisis de regresión de Cox univariante en el que también se incluyeron las variables clínicas, histológicas y moleculares que mostraron una relación con las alteraciones en *TERT* y/o que son consideradas como factores pronósticos en el sistema de estadificación TNM del melanoma; para confirmar cuáles de estas variables tenían un efecto en la supervivencia y la progresión de los pacientes con melanoma. Posteriormente, para entender cómo se comportaba cada factor que el análisis de regresión de Cox univariante reveló como predictor de la supervivencia y la progresión de los pacientes con melanoma, se utilizó el método de estimación de Kaplan-Meier. En ambos estudios estadísticos se incluyeron únicamente los pacientes de los que se disponía de datos de SG y SLP (46/53) y se excluyeron los pacientes con resultados discordantes entre las muestras pareadas de melanoma primario y su metástasis, para la mutación en *pTERT*, la metilación y/o la expresión de ARNm (Anexo 1).

6.1 Variables clínicas e histológicas

A partir de los análisis de regresión de Cox univariante se observó que la edad en el momento del diagnóstico (<70 años o ≥ 70 años) estaba significativamente relacionada con la SG (Tabla 7). Asimismo, el modelo de Kaplan-Meier reveló que los pacientes que tenían 70 años o más cuando se les diagnosticó la enfermedad mostraban una peor SG (promedio de 49 meses) que los pacientes que tenían menos de 70 años (promedio de 106 meses) (Log rank test P valor=0,033), tal y como se observa en la figura 32. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al analizar la SLP (Log rank test P valor=0,301; no se muestran los datos).

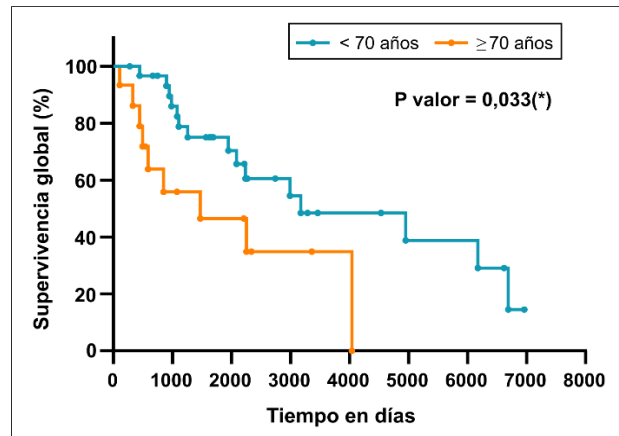


Figura 32: Efecto de la edad al momento del diagnóstico en la supervivencia de los pacientes con melanoma. Análisis de supervivencia global (SG) de Kaplan-Meier entre pacientes de melanoma con menos de 70 años al momento del diagnóstico (n=31) y más de 70 años (n=15). Los pacientes que se les diagnosticó el melanoma con 70 años o más mostraron una peor SG (media de 49 meses) que los de menores de 70 años (media de 106 meses). Prueba Log-Rank estadísticamente significativa (p = 0.033). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, y ****P < 0.0001

Por su parte, la ulceración en el tumor primario (ausencia o presencia) también se asoció significativamente con la SG a partir del análisis de regresión de Cox univariante (Tabla 7). A su vez, la curva de supervivencia de Kaplan-Meier indicó que aquellos pacientes con presencia de ulceración en su tumor primario mostraban una peor SG (promedio de 42 meses) que los pacientes que no tenían ulceración (promedio de 81 meses) (Log rank test P valor=0,014), tal y como se observa en la figura 33. No obstante, no se observaron diferencias significativas al analizar la SLP (Log rank test P valor = 0,060; no se muestran los datos).

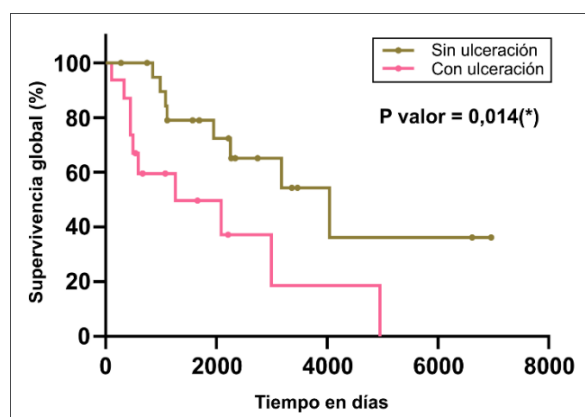


Figura 33: Efecto de la ulceración en la supervivencia de los pacientes con melanoma. Análisis de supervivencia global (SG) de Kaplan-Meier entre pacientes de melanoma con presencia (n=16) y ausencia (n=21) de ulceración en el tumor primario. Los pacientes con ulceración mostraron una peor SG (media de 42 meses) que los que no tenían ulceración (media de 81 meses). Prueba Log-Rank estadísticamente significativa (p = 0.014). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, y ****P < 0.0001

Por otro lado, el análisis de regresión de Cox univariante reveló que el espesor de Breslow (bajo, medio o alto) se asoció significativamente con la SLP (Tabla 7). Además, a partir del modelo de Kaplan-Meier se observó una tendencia a que los pacientes con un espesor de Breslow alto en el tumor primario mostraran una peor PFS (media de 13 meses) en comparación con los que tenían un espesor de Breslow medio (media de 23 meses) o bajo (media de 118 meses) (Log rank P valor=0,122), como puede observarse en la Figura 34. Sin embargo, con el método de Kaplan-Meier, no se detectó un efecto significativo del espesor de Breslow en la SG de los pacientes con melanoma (Log rank P valor=0,264; no se muestran los datos).

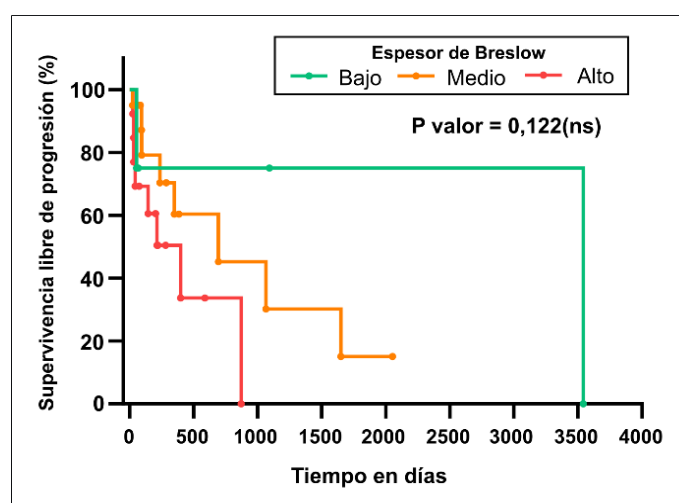


Figura 34: Efecto del espesor de Breslow del tumor primario en la supervivencia de los pacientes con melanoma. Análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) de Kaplan-Meier entre pacientes con melanoma primario con espesor de Breslow bajo (n=4), medio (n=20) y alto (n=13). Los pacientes con mayor espesor de Breslow en su tumor primario tendieron a mostrar una peor SLP (media de 13 meses) que los de Breslow medio (media de 23 meses) o bajo (media de 118 meses). Prueba Log-Rank no significativa (ns) (p = 0.122).

Finalmente, el sexo de los pacientes no se asoció significativamente con la SG ni la SLP a partir del análisis de regresión de Cox univariante. Los resultados obtenidos para todas las variables clínicas e histológicas se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 7: Análisis de regresión de Cox univariante incluyendo las variables clínicas e histológicas de 53 pacientes con melanoma.

Variables	HR	IC 95%	P*	P ajustada ¹
Supervivencia Global (SG)²				
<i>Datos clínicos e histológicos</i>				
Edad al diagnóstico	2.492	1.043-5.953	0.040*	0.126
Sexo	0.721	0.314-1.656	0.440	0.538
Espesor de Breslow	1.648	0.779-3.486	0.191	0.323
Ulceración	3.076	1.194-7.929	0.020*	0.088
Supervivencia libre de progresión (SLP)²				
<i>Datos clínicos e histológicos</i>				
Edad al diagnóstico	1.611	0.647-4.015	0.306	0.449
Sexo	0.421	0.159-1.115	0.082	0.164
Espesor de Breslow	2.347	1.011-5.449	0.047*	0.129
Ulceración	2.603	0.923-7.337	0.060	0.154

* Valores de P < 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Se resaltan en negrita.

1 Los valores de P se ajustaron mediante el método de Benjamini-Hochberg (BH).

2 No se incluyeron los pacientes que no tenían datos clínicos, histológicos y de supervivencia disponibles.

HR= Hazard ratio; IC =Intervalo de confianza; *pTERT* = promotor de *TERT*

6.2 Variables moleculares

Los análisis de regresión de Cox en los que se incluyeron las variables moleculares, revelaron que el estado de mutación de *pTERT* (WT, C228T o C250T) era un predictor significativo de la evolución clínica y la progresión tumoral. Además, el efecto sobre la supervivencia de las mutaciones C250T y C228T de *pTERT* se analizó por separado, siendo la mutación C250T la única que se asoció de forma significativa con la SG y la SLP.

Del mismo modo, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier indicaron que los pacientes con mutación en la posición C250T tenían una peor SG (media de 36 meses) que los pacientes mutados en la posición C228T (media de 106 meses) o los pacientes con *pTERT* WT (media de 223 meses) (Log rank P valor=0,001). Además, los pacientes con la mutación C250T mostraron una peor SLP (media de

5 meses) que aquellos con la mutación C228T (promedio de 23 meses) o *pTERT* WT (promedio de 55 meses) (Log rank P valor=0.004). En la siguiente figura se muestran ambos resultados:

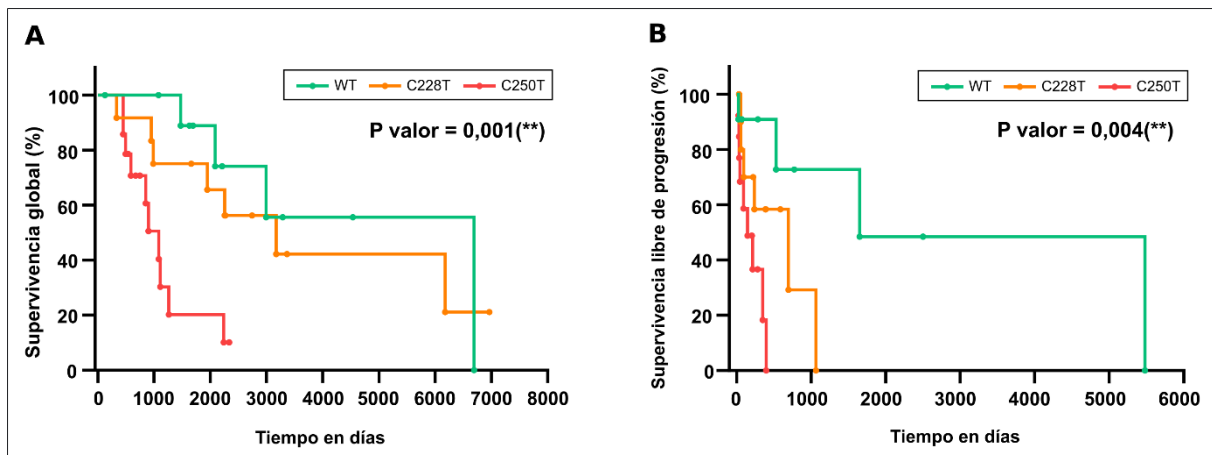


Figura 35: Efecto de la mutación del promotor de *TERT* en la supervivencia de pacientes con melanoma. A. Análisis de supervivencia global (SG) de Kaplan-Meier entre pacientes de melanoma con mutación C250T de *pTERT* (n=14), mutación C228T (n=12) y de tipo salvaje o WT (n=11). Los pacientes con mutación C250T mostraron una peor SG (media de 36 meses) que los pacientes con mutación C228T (media de 106 meses) o que carecían de mutaciones en *pTERT* (media de 223 meses). Prueba Log-Rank estadísticamente significativa ($p = 0.001$). **B.** Análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) de Kaplan-Meier entre pacientes de melanoma con mutación C250T de *pTERT* (n=13), mutación C228T (n=11) y de tipo salvaje o WT (n=11). Los pacientes con mutación en *pTERT* mostraron una peor SLP que los pacientes que carecían de mutaciones, siendo la mutación C250T la que se asoció con la peor SLP (media de 5 meses). Prueba Log-Rank estadísticamente significativa ($p = 0.004$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, y **** $P < 0.0001$

Por su parte, el nivel de expresión de mRNA de *TERT* (bajo o alto) también se asoció significativamente con la SG y la SLP a partir del análisis de regresión de Cox univariante. A su vez, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier indicaron que aquellos pacientes con altos niveles de expresión de ARNm de *TERT* mostraron una peor SG (media de 51 meses) que aquellos pacientes con bajos niveles de expresión de ARNm (media de 88 meses). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (Log rank P valor=0,041). Además, aquellos pacientes con una alta expresión de ARNm de *TERT* desarrollaron metástasis en una media de 8 meses, mientras que aquellos con una baja expresión de ARNm lo hicieron a los 20 meses, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Log rank P valor=0.028). Las curvas de supervivencia se muestran en la siguiente figura:

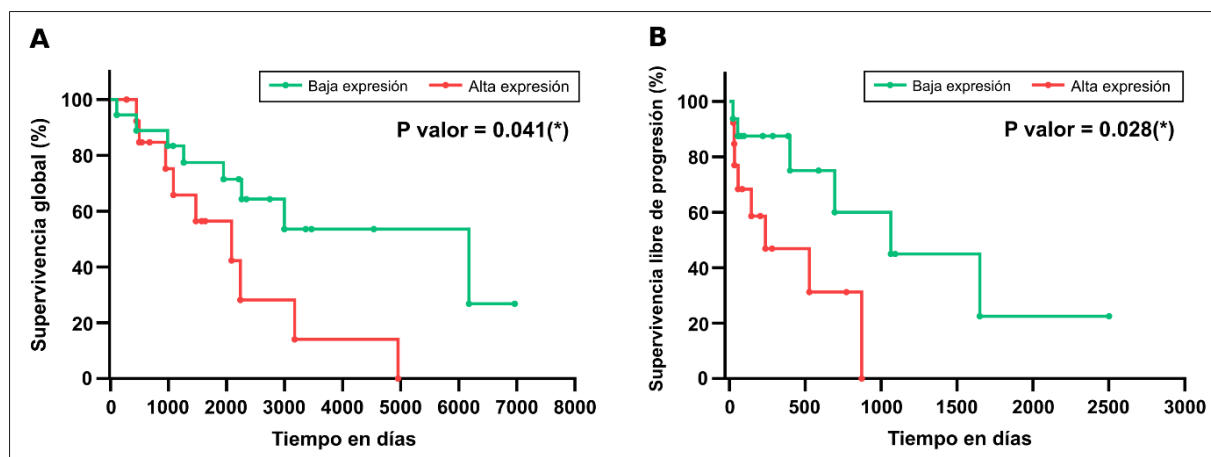


Figura 36: Efecto de la expresión del ARNm de *TERT* en la supervivencia de pacientes con melanoma. A. Análisis de supervivencia global (SG) de Kaplan-Meier entre pacientes de melanoma con alta expresión de ARNm de *TERT* (n=14) y baja expresión (n=18). Los pacientes con altos niveles de expresión mostraron una peor SG (media de 51 meses) que los pacientes con baja expresión de *TERT* (media de 88 meses). Prueba Log-Rank estadísticamente significativa (p = 0.041). **B.** Análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) de Kaplan-Meier entre pacientes de melanoma con altos niveles de expresión de ARNm de *TERT* (n=13) y bajos niveles de expresión (n=16). Los pacientes con expresión de *TERT* alta mostraron una peor SLP (media de 8 meses) que los pacientes con bajos niveles (media de 20 meses). Prueba Log-Rank estadísticamente significativa (p = 0.028). *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, y ****P < 0.0001

Por último, el estado de metilación de *pTERT* y el estado mutacional de *BRAF* y *NRAS* no se asociaron significativamente con la SG ni la SLP a partir del análisis de regresión de Cox univariante.

Los resultados obtenidos para todas las variables moleculares se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 8: Análisis de regresión de Cox univariante incluyendo las variables moleculares de 53 pacientes con melanoma.

Variables	HR	IC 95%	P*	P ajustada ¹
Supervivencia Global (SG)²				
<i>Datos moleculares³</i>				
Estado mutacional de <i>BRAF</i>	1.354	0.572-3.204	0.491	0.569
Estado mutacional de <i>NRAS</i>	0.884	0.322-2.424	0.810	0.849
Estado mutacional de <i>pTERT</i>	2.825	1.417-5.631	0.003*	0.033*
Mutación C250T	5.854	2.134-16.056	0.001*	0.022*
Mutación C228T	0.625	0.252-1.554	0.312	0.429
Metilación de <i>pTERT</i>	0.771	0.300-1.983	0.589	0.648
Expresión ARNm de <i>TERT</i>	2.744	1.004-7.504	0.049*	0.120

Supervivencia libre de progresión (SLP)²*Datos moleculares³*

Estado mutacional de <i>BRAF</i>	2.016	0.793-5.124	0.141	0.259
Estado mutacional de <i>NRAS</i>	0.517	0.172-1.556	0.241	0.379
Estado mutacional de <i>pTERT</i>	3.387	1.529-7.505	0.003*	0.022*
Mutación C250T	5.106	1.663-15.677	0.004*	0.022*
Mutación C228T	1.040	0.388-2.784	0.938	0.938
Metilación de <i>pTERT</i>	0.641	0.222-1.852	0.412	0.533
Expresión ARNm de <i>TERT</i>	3.594	1.064-12.139	0.039*	0.143

* Valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos. Se resaltan en negrita.

1 Los valores de P se ajustaron mediante el método de Benjamini-Hochberg (BH).

2 No se incluyeron los pacientes que no tenían datos de supervivencia disponibles.

3 Se excluyeron los pacientes con resultados discordantes para mutación de *pTERT*, metilación y/o expresión de ARNm

HR= Hazard ratio; IC =Intervalo de confianza; *pTERT* = promotor de *TERT*

Por otro lado, al no observar relación entre la presencia de mutaciones conductoras (*BRAF* o *NRAS*) y la supervivencia y progresión de los pacientes con melanoma, se analizó el efecto conjunto que podían tener cuando coexistían con las mutaciones de *pTERT*. Se observó una tendencia a que los pacientes en los que *BRAF* o *NRAS* y *pTERT* estaban mutados mostraran una peor SLP (media de 5 meses y 11 meses, respectivamente) que aquellos en los que *BRAF* o *NRAS* eran WT (media de 26 meses), tal y como se observa en las curvas de supervivencia representadas en la Figura 37. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Log rank P valor=0,056). Tampoco se detectaron diferencias significativas en la SG (Log rank test P valor=0,500; no se muestran los datos).

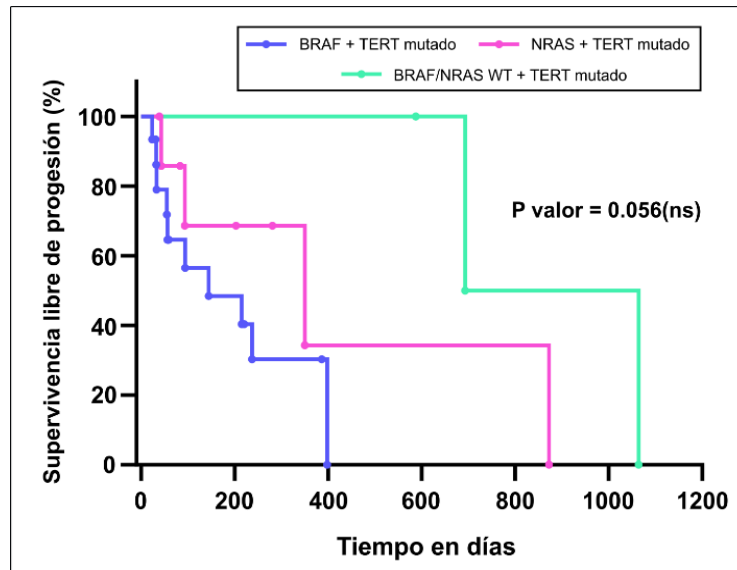


Figura 37: Efecto de la coexistencia de mutaciones en *pTERT* y *BRAF* o *NRAS* en la supervivencia de los pacientes con melanoma. Análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) de Kaplan-Meier entre pacientes de melanoma con mutación en el promotor de *TERT* (*pTERT*) que tienen *BRAF* mutado (n=15), *NRAS* mutado (n=7) y de tipo salvaje (WT) para ambos genes (n=3). Los pacientes en los que coexisten las mutaciones en *pTERT* con las mutaciones conductoras (*BRAF* y *NRAS*) tienden a una peor SLP (media de 5 meses y 11 meses) que aquellos que carecen de estas mutaciones (media de 26 meses). Prueba Log-Rank no significativa (ns) (p = 0.056).

También consideramos el riesgo combinado que podrían tener en la supervivencia de los pacientes la mutación y la hipermetilación en *pTERT*, ya que ésta última no se asoció de forma independiente con la SG y la SLP según el análisis de regresión de Cox. El modelo de Kaplan-Meier reveló una tendencia a que los pacientes con *pTERT* mutado, independientemente de si la región *pTERT* estaba hipometilada o hipermetilada, tenían una peor SLP (media de 8 meses y 13 meses, respectivamente) que aquellos con *pTERT* WT (media de 55 meses). Por otro lado, la hipermetilación parecía tener un efecto sobre la SLP para aquellos pacientes con *pTERT* WT (media de 55 meses vs 95 meses). Estas tendencias se pueden visualizar en la Figura 38. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Log rank P valor=0.061). Por su parte, no se observaron diferencias significativas en la supervivencia global (Log rank test P valor=0,250; no se muestran los datos).

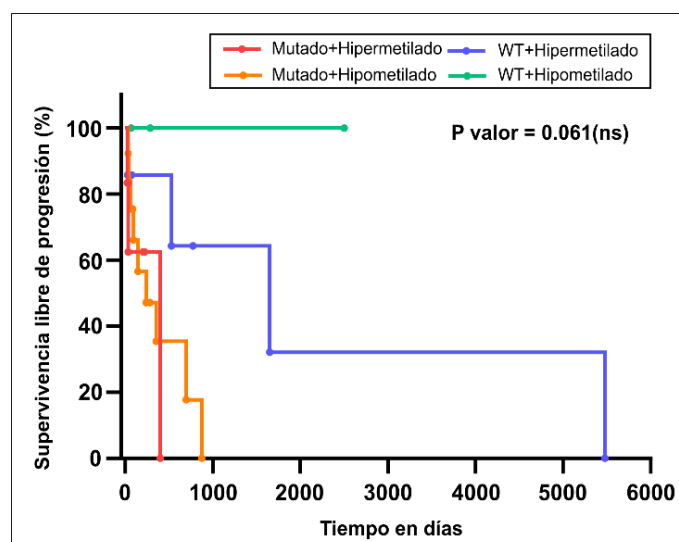


Figura 38: Efecto combinado de las alteraciones en el promotor de *TERT* en la supervivencia de los pacientes con melanoma. Análisis de supervivencia libre de progresión (SLP) de Kaplan-Meier entre pacientes de melanoma con mutación e hipermetilación en el promotor de *TERT* (*pTERT*) (n=6), con mutación en *pTERT* y el promotor hipometilado (n=12), pacientes que carecen de mutaciones y el promotor está hipermetilado (n=7); y que no disponen de alteraciones en el promotor (n=3). Los pacientes con *pTERT* mutado tienden a una peor SLP con independencia del estado de metilación del promotor (media de 8 meses y 13 meses). Aquellos que carecen de mutaciones, pero el promotor está hipermetilado tienden a mostrar una peor SLP (media de 55 meses) que los que no tienen alteraciones (media de 95 meses). Prueba Log-Rank no significativa (ns) ($p = 0.061$).

6.3 Ajuste del análisis de regresión de Cox por el método de Benjamini & Hochberg

Al realizar el análisis de regresión de Cox univariante de forma repetida en un total de 22 variables diferentes (clínicas, histológicas y moleculares) y considerar un nivel de significancia de $P < 0.05$, existe un 5% de probabilidad de aparición de falsos positivos, por lo que es necesario realizar un ajuste de los valores de P. En este estudio se corrigieron los valores de P por el método de comparaciones múltiples de Benjamini & Hochberg (BH). Tras realizar este ajuste se observó que únicamente el estado de mutación de *pTERT* se asociaba significativamente con la SG y la SLP, donde la mutación C250T mostró el mayor efecto sobre la progresión y el desenlace en pacientes con melanoma avanzado.

7. NUEVOS BIOMARCADORES EN BIOPSIA LÍQUIDA PARA LA MONITORIZACIÓN DE LOS PACIENTES CON MELANOMA

7.1 Mutación de *pTERT*

Para evaluar el papel de *pTERT* como potencial biomarcador en el seguimiento de los pacientes con melanoma, se analizó el estado mutacional de *pTERT* por PCR digital (ddPCR, en sus siglas en

inglés) en 25 de los 53 pacientes de la serie que tenían muestra de plasma disponible. Se detectaron mutaciones en *pTERT* en el 52% (13/25) de los pacientes, de tal forma que el 31% (4/13) de los casos mutados presentaban la mutación C250T y el 69% (9/13) la mutación C228T. A continuación, se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos por ddPCR:

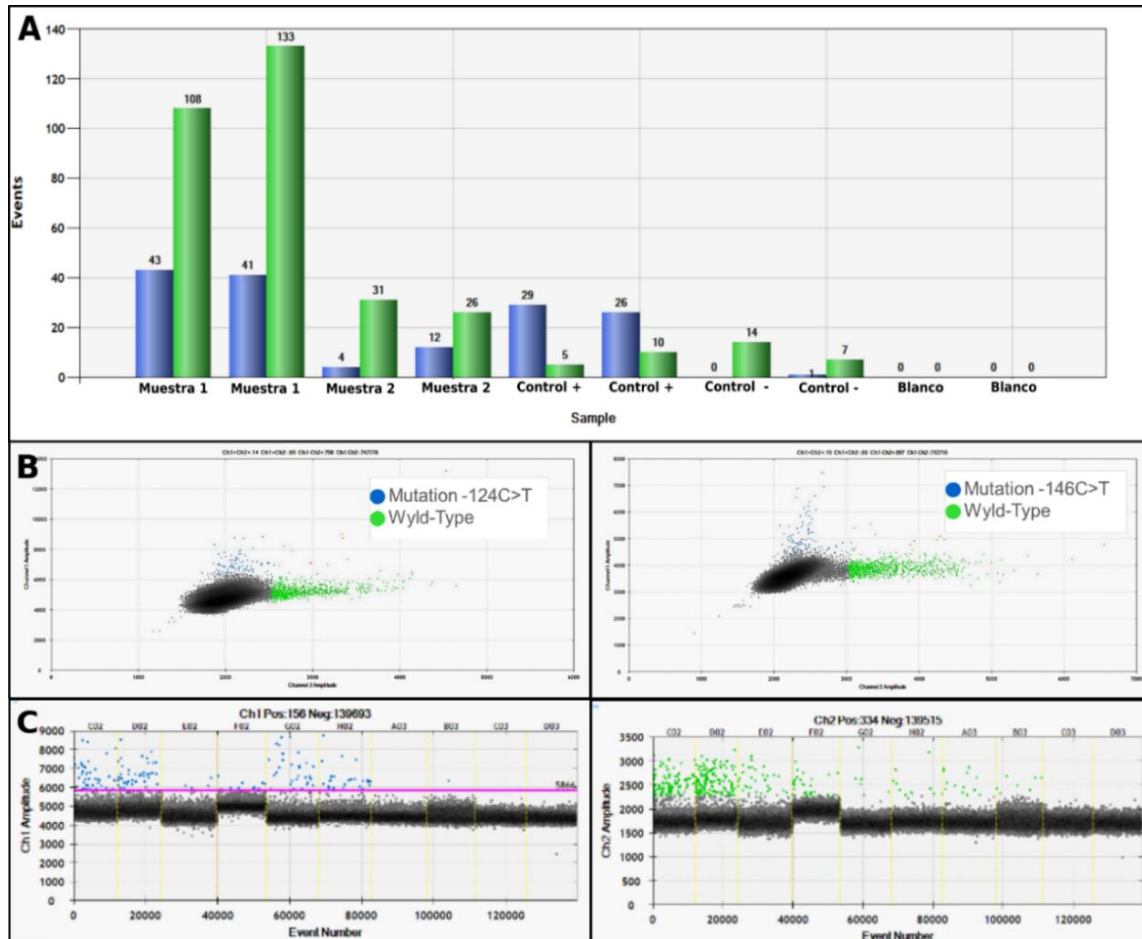


Figura 39: Detección de mutaciones en el promotor de *TERT* mediante PCR digital. **A.** Gráfico de barras en el que se muestra el número de eventos detectados por PCR digital (ddPCR) para la sonda específica de mutación en *pTERT* (azul) y la sonda de tipo salvaje (WT, en verde) en cada muestra. Se considera positivo a partir de 5 eventos, por lo que las muestras 1, 2 y el control positivo tienen mutación en *pTERT*, mientras que el control negativo es WT y en el blanco no se detecta amplificación. **B.** Gráficos 2D de dos muestras mutadas en C228T y C250T en las que se observan dos poblaciones: una que muestra señal FAM de unión a la sonda mutada en *pTERT* (azul) y una con señal HEX de unión a la sonda WT (verde). **C.** Gráficos 1D en los que se muestra un ensayo completo en el que se incluyen varias muestras y controles. Las positivas muestran señal FAM y señal HEX, mientras que las negativas solo presentan señal HEX. El control negativo marca el punto de corte (línea rosa).

Se observó que el estado de *pTERT* (mutado o wild type) se conservaba en el 56% (14/25) de las muestras de tejido (melanoma primario, metastásico o ambos) y plasma para el mismo paciente. Además, el tipo de mutación de *pTERT* (C228T o C250T) se mantenía en el 69% (9/13) de las muestras

pareadas de plasma y tejido que estaban mutadas. Esta correlación fue estadísticamente significativa (χ^2 OR 2.67, 95% IC 1.09–6.52, $p = 0.038$). En total, 11 de los 25 pacientes analizados presentaron resultados discordantes entre la muestra de tejido y plasma, de los cuales el 64% (7/11) mostró la mutación solo en el tejido y el 9% (1/11) solo en el plasma, mientras que en el 27% (3/11) restante se detectó una mutación diferente en cada muestra (Anexo 1). En la siguiente tabla se incluyen las frecuencias de mutación obtenidas en este análisis:

Tabla 9: Frecuencia de mutación del promotor de *TERT* en muestras pareadas de tumores de tejido primario o metástasis, y plasma de 25 pacientes con melanoma analizadas por PCR digital (ddPCR).

Estado mutacional <i>pTERT</i> ¹	Muestras de plasma		
	Wild Type (n=11)	C250T (n=4)	C228T (n=9)
Muestras de tejido ²			
Wild Type (n=6)	5 (21%)	0 (%)	1 (4%)
C250T (n=11)	4 (17%)	4 (17%)	3 (13%)
C228T (n=7)	2 (8%)	0 (%)	5 (21%)

1 Un paciente (1/25) tuvo que ser excluido de la tabla cruzada porque se observaron dos tipos diferentes de mutación de *pTERT* en sus muestras emparejadas de tumor primario y metástasis (C228T y C250T). Este paciente no mostró ninguna de las mutaciones en la muestra de plasma, por lo que se incluye dentro de los casos discordantes (11/25).

2 Se analizó el estado mutacional de *pTERT* en muestras de tejido mediante pirosecuenciación. Se utilizó la ddPCR para confirmar los resultados discordantes entre muestras emparejadas del mismo paciente (tejido vs plasma).
pTERT = promotor de *TERT*

7.2 Alteraciones cromosómicas

Con el objetivo de comprobar la posible aplicación de los microarrays o arrays de SNPs en el seguimiento clínico de los pacientes con melanoma, sobre todo en aquellos que no presentan mutación V600 de *BRAF* o mutaciones en *pTERT*, se estudiaron las alteraciones cromosómicas presentes en el tejido y plasma de los pacientes. El análisis se realizó en 16 de las 25 muestras disponibles de plasma que tenían la concentración mínima de ADN circulante requerida para realizar la técnica, y se compararon con los resultados obtenidos en el tejido.

Se detectaron más de tres alteraciones cromosómicas en el 25% (4/16) de los plasmas analizados, mientras que el 50% (8/16) no mostró alteraciones. El 25% (4/16) restante no cumplió con los criterios de calidad mínimos para obtener un resultado valorable. Por su parte, se analizaron las muestras de tejido pertenecientes a los 12 pacientes con resultado valorable en la muestra de plasma. Se detectaron más de tres alteraciones cromosómicas en el 75% (9/12) de las muestras, mientras que en el 17% (2/12) se detectaron menos de tres alteraciones o ninguna. En la muestra restante (8%, 1/12) no se pudo obtener concentración suficiente de ADN para la realización de la técnica (Anexo 1).

El análisis de las alteraciones cromosómicas por arrays de SNP en las muestras de plasma reveló la presencia de múltiples ganancias y pérdidas de citobandas o de cromosomas complementos, entre las que destacan las ganancias de 1q, 6p, 8q, cromosomas 7 y 13; y las pérdidas de 6q, cromosomas 10 y 11. La alteración más frecuentemente detectada fue la pérdida de la región 9p, en concreto la delección de la citobanda 9p21.3 en la que se localiza p16. También se observaron algunas amplificaciones y pérdidas de heterocigosidad (LOH) en los cromosomas anteriormente mencionados. Por su parte, en las muestras pareadas de tejido se detectaron alteraciones cromosómicas coincidentes con las observadas en plasma, como la ganancia de 1q, 6p, cromosomas 7 y 10; así como las pérdidas de 6q, cromosoma 10 y 11q. La delección en la región 9p21.3 también se observó en varios tejidos. Por otro lado, los arrays de SNP permitieron la detección de mutaciones como *BRAF* V600E e *IDH2* R140Q en ambos tipos de muestras.

Los resultados obtenidos en las cuatro muestras de plasma en las que se detectaron alteraciones cromosómicas (casos 15, 42, 43 y 44), así como la comparación con las alteraciones detectadas en las muestras de tejido perteneciente al mismo paciente, se detallan en las figuras que se muestran a continuación:

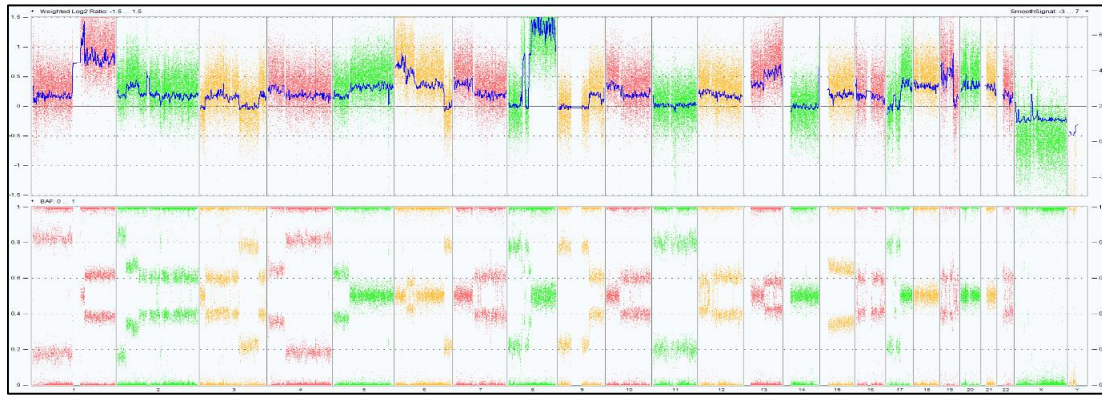


Figura 40: Genoma completo de la muestra de plasma del caso 41 obtenida a partir del análisis por microarrays de SNP. En el panel superior de cada apartado se observan las variaciones en el número de copias (CNV) de todos los cromosomas del paciente, que se localizan en el eje x y están codificados por colores. En el panel inferior, se observa la B-Allele Frequency (BAF) que informa sobre los desequilibrios alélicos. Se detectan múltiples CNV y pérdidas de heterocigosidad (LOH), entre las que destacan la amplificación de las citobandas 1q21.1 (11 Kb) y 8q13.3 (77 Kb). La muestra pareada de tejido, no se incluyó en el análisis al no obtenerse concentración suficiente de ADN para la realización de la técnica.

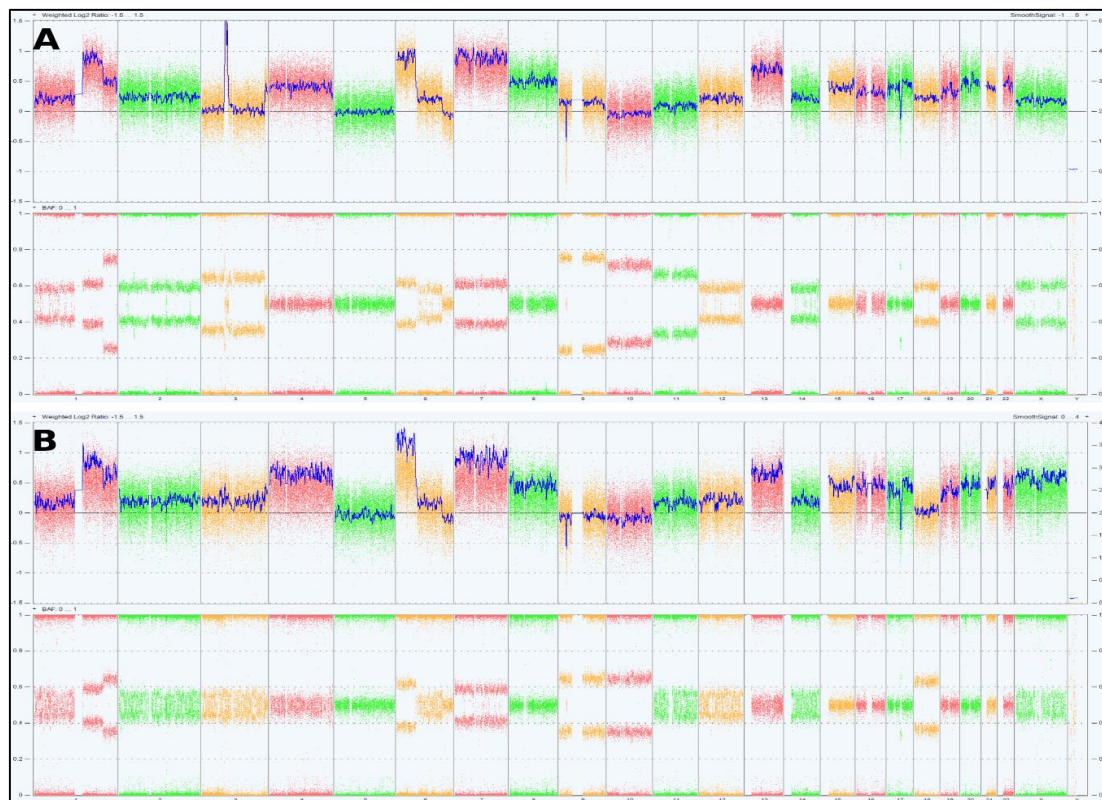


Figura 41: Análisis comparativo de las aberraciones cromosómicas detectadas en tejido y plasma de un paciente con melanoma a partir de microarrays de SNP (caso 15). En el panel superior de cada apartado se observan las variaciones en el número de copias (CNV) de todos los cromosomas del paciente, que se localizan en el eje x y están codificados por colores. En el panel inferior, se observa la B-Allele Frequency (BAF) que informa sobre los desequilibrios alélicos. **A.** Genoma completo de la muestra de plasma del caso 15. Se observan múltiples CNV, entre las que destacan la amplificación de la citobanda 3p14.1-12.3 y la pérdida en homocigosidad de 9p21. **B.** Genoma completo de la muestra de tejido del caso 15 en la que se observan múltiples CNV que coinciden con las detectadas en la muestra de plasma, entre las que destacan la ganancia de 1p, 6p, cromosomas 8 y 13, así como la pérdida en homocigosidad de 9p21.

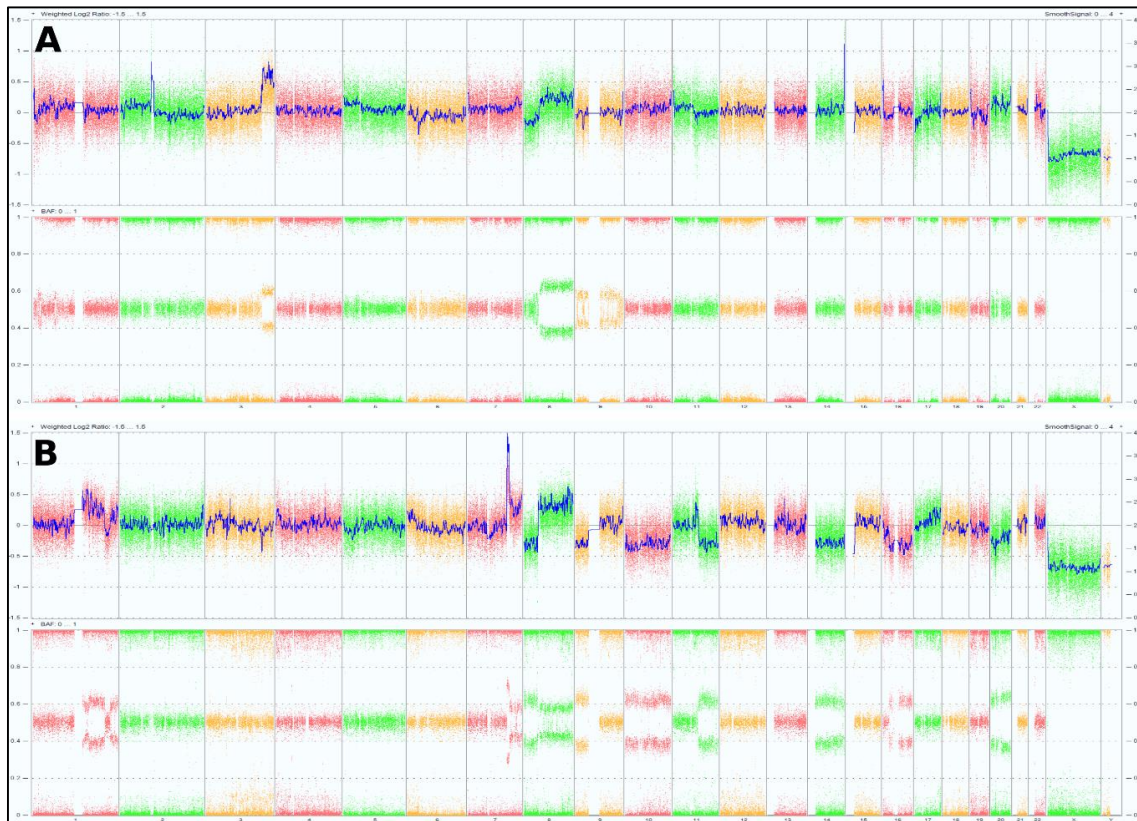


Figura 42: Análisis comparativo de las aberraciones cromosómicas detectadas en tejido y plasma de un paciente con melanoma a partir de microarrays de SNP (caso 43). En el panel superior de cada apartado se observan las variaciones en el número de copias (CNV) de todos los cromosomas del paciente, que se localizan en el eje x y están codificados por colores. En el panel inferior, se observa la B-Allele Frequency (BAF) que informa sobre los desequilibrios alélicos. **A.** Genoma completo de la muestra de plasma del caso 43. Se observa múltiples alteraciones cromosómicas como la ganancia de las regiones 3q25.32 y 8q, la pérdida de 9p21.3, y varias pérdidas de heterocigosidad (LOH) **B.** Genoma completo de la muestra de tejido del caso 43 en la que se observan múltiples CNV, de las cuales, la ganancia de 8q y la pérdida 9p21.3 son coincidentes con las detectadas en la muestra de plasma, y destaca la amplificación de la citobanda 7q31.1.

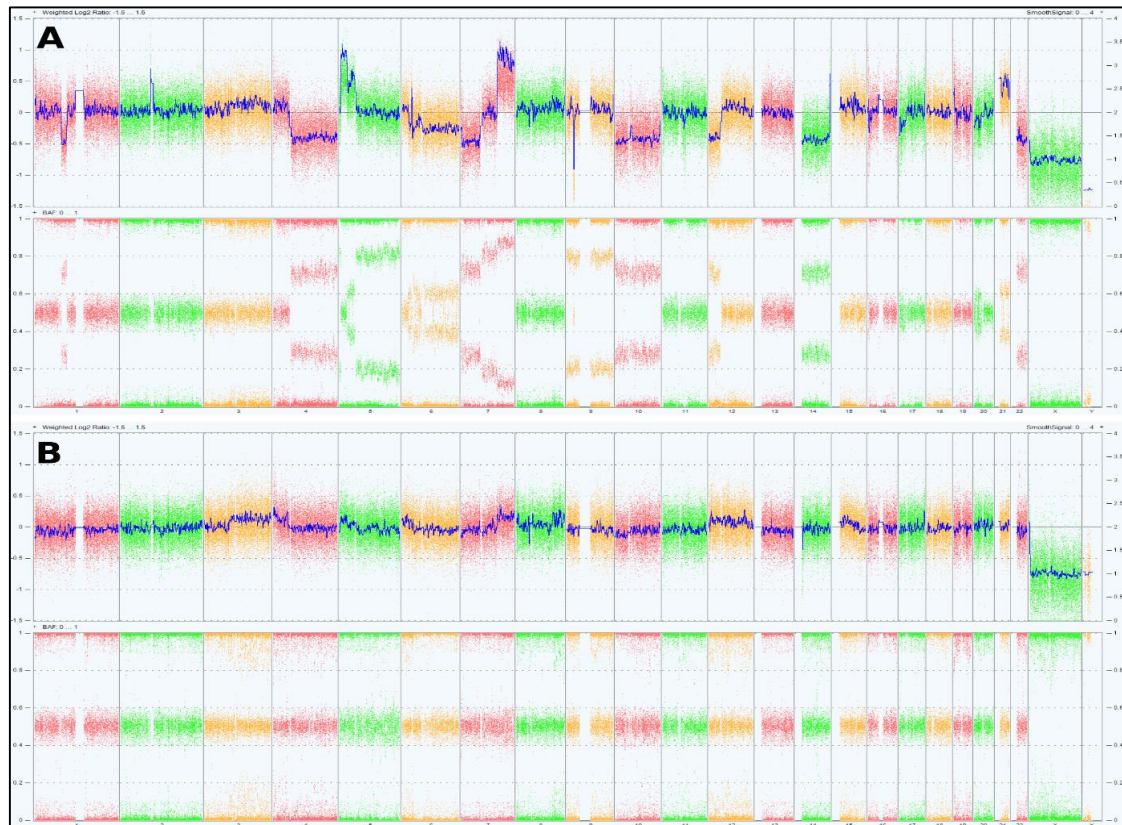


Figura 43: Análisis comparativo de las aberraciones cromosómicas detectadas en tejido y plasma de un paciente con melanoma a partir de microarrays de SNP (caso 46). En el panel superior de cada apartado se observan las variaciones en el número de copias (CNV) de todos los cromosomas del paciente, que se localizan en el eje x y están codificados por colores. En el panel inferior, se observa la B-Allele Frequency (BAF) que informa sobre los desequilibrios alélicos. **A.** Genoma completo de la muestra de plasma del caso 46. Se observan múltiples CNV entre las que destacan la ganancia de las citobandas 5p13.32 y 7q31.2, y la pérdida en homocigosis de 9p21.3 **B.** Genoma completo de la muestra de tejido del caso 46 en la que detecta una ganancia en la región 7q31.2 en muy baja frecuencia que coincide con la observada en el plasma.

Por su parte, en los 8 pacientes (casos 2, 16, 21, 28, 35, 39, 45 y 50) en los que no se detectaron alteraciones cromosómicas en el plasma por arrays de SNPs, se analizaron las muestras pareadas de tejido (melanoma primario o metástasis) y se observó en ellas la presencia de varias alteraciones como: ganancias y/o pérdidas de fragmentos cromosómicos, LOH o mutaciones. En la siguiente figura se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos en plasma y tejido:

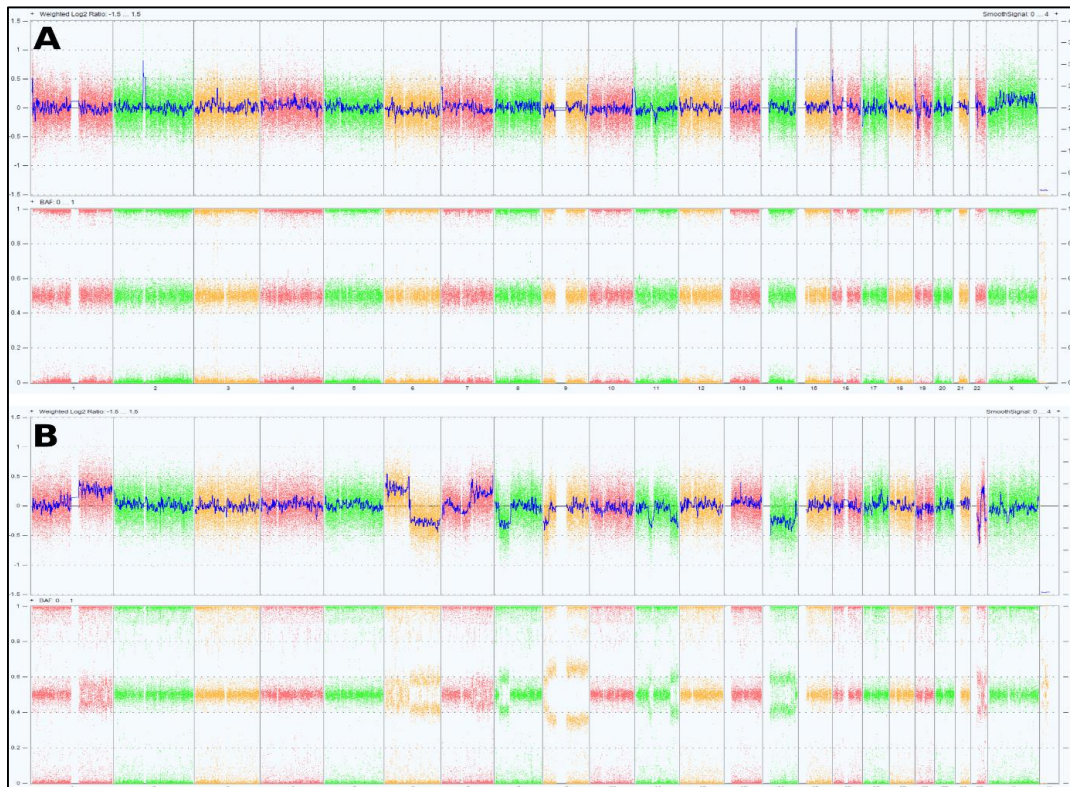


Figura 44: Análisis comparativo de las aberraciones cromosómicas detectadas en tejido y plasma de un paciente con melanoma a partir de microarrays de SNP (caso 2). En el panel superior de cada apartado se observan las variaciones en el número de copias (CNV) de todos los cromosomas del paciente, que se localizan en el eje x y están codificados por colores. En el panel inferior, se observa la B-Allele Frequency (BAF) que informa sobre los desequilibrios alélicos. **A.** Genoma completo de la muestra de plasma del caso 2. No se detectan alteraciones cromosómicas **B.** Genoma completo de la muestra de tejido del caso 2 en la que se detectan varias CNV que no se visualizan en el plasma, como la ganancia de 1q, 6p y 7q y las pérdidas de 6q, 8p y 9p.

7.3 Mutación de *pTERT* vs alteraciones cromosómicas en plasma

Finalmente, se compararon los resultados obtenidos en plasma para la determinación de las mutaciones de *pTERT* y las alteraciones cromosómicas con el fin de valorar su utilidad en la monitorización de los pacientes con melanoma avanzado. Mientras que con los arrays de SNPs más de la mitad de las muestras de plasma fueron descartadas por su baja concentración o no tuvieron un resultado valorable (52% ,13/25), con la ddPCR se pudo valorar el estado mutacional de *pTERT* en todas ellas (25/25). Además, con los microarrays, en un 67% (8/12) de las muestras de plasma con resultado valorable, no se observaron alteraciones cromosómicas. Sin embargo, la ddPCR detectó mutaciones en la región *pTERT* en el 50% (4/8) de las mismas, siendo esto un indicativo de la presencia de ADNct.

DISCUSIÓN

1. LA MUTACIÓN DEL PROMOTOR DE *TERT* COMO EVENTO TEMPRANO EN LA PROGRESIÓN METASTÁSICA DEL MELANOMA

Se detectaron mutaciones de *pTERT* en el 66% y el 72% de las muestras de melanoma primario y metastásico, respectivamente, siendo la mutación C250T la más frecuente. Como se esperaba, las muestras de piel normal y nevus melanocítico benignos utilizadas como control no mostraron mutaciones en *pTERT*. Por su parte, el 83% de las líneas celulares mostró mutación en *pTERT*. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran frecuencias de mutación para *pTERT* similares a las reportadas previamente en muestras de melanoma metastásico y en líneas celulares de melanoma (41,42,44). Sin embargo, la frecuencia de mutación en las muestras de melanoma primario fue considerablemente superior a la reportada en estudios anteriores (66% vs 35%) (41,42,44). Este aumento en la prevalencia de la mutación de *pTERT* apoyaría la posible asociación del estado de mutación de *pTERT* con una enfermedad más agresiva, ya que los pacientes de nuestra serie se encuentran en estadios avanzados de la enfermedad (III y IV, según el AJCC) (44,45,48,49,99).

Además, se analizaron muestras pareadas de melanoma primario y sus correspondientes metástasis, pertenecientes a 35 pacientes. Se observó que la mutación de *pTERT* se mantenía en el 77% de los pacientes en la muestra de melanoma primario y su metástasis. Esto sugiere que las mutaciones de *pTERT* podrían aparecer de forma temprana durante la expansión clonal de las células tumorales, siendo importantes para la progresión metastásica (42,53,54). Sin embargo, a diferencia de estudios previos con muestras pareadas de tumor primario y metástasis (106–108), se observó que más de la mitad de los casos discordantes de mutación en *pTERT* (5 de 8 casos; 62%) presentaban mutación en la lesión metastásica y no en su tumor primario. Estos datos apoyan la hipótesis de que las mutaciones de *pTERT* están relacionadas con un comportamiento de la enfermedad más agresivo y pueden desempeñar un papel relevante en la progresión metastásica de las lesiones en estadios III y IV (44,45,49,99). Por otro lado, en el 25% (2/8) de los pacientes con resultado discordante, no se detectó mutación de *pTERT* en la metástasis, pero sí en el tumor primario. Esto puede deberse al hecho de que la mayoría de los

pacientes de nuestra serie tenía más metástasis en otras localizaciones anatómicas que podían presentar mutaciones de *pTERT* y que no pudieron analizarse en nuestro estudio. Otra posibilidad es que el tejido metastásico no se originase del tumor primario que analizamos, sino de otro tumor primario desconocido u oculto.

2. PAPEL DE LA HIPERMETILACIÓN DEL PROMOTOR EN LA REGULACIÓN DE *TERT* Y LA PROGRESIÓN DEL MELANOMA

En nuestro estudio, los mayores niveles de metilación de *pTERT* se detectaron en las muestras de melanoma y en las líneas celulares con respecto a las muestras control (piel normal y nevus melanocítico), tal y como se ha descrito previamente en otros trabajos (57,63).

Como novedad, estudiamos el estado de metilación (hiper o hipometilado) en las muestras pareadas de tejido de melanomas primarios y sus correspondientes metástasis, observándose que en el 81% de los casos se mantenían los niveles de metilación en el primario y la metástasis, tal y como se observó en el análisis del estado mutacional de *pTERT* en muestras pareadas. Esto sugiere que al igual que la mutación, la metilación de la región promotora de *TERT* también puede tener un papel importante en la regulación del gen durante el transcurso de la enfermedad. Además, ambos resultados apoyan el hecho de que las alteraciones en *pTERT* ocurren prematuramente durante la expansión clonal de las células tumorales y son persistentes en la progresión metastásica (42,53,54).

Por otro lado, estudios recientes han asociado la presencia de hipermetilación en la región THOR con la ausencia de mutaciones en *pTERT* (63,109). Nuestros resultados confirman estos hallazgos, ya que las muestras que carecen de mutación en *pTERT* mostraron niveles de metilación más altos que las muestras mutadas. Esto sugiere que la sobreexpresión de *TERT*, en las muestras que no presentan mutaciones en *pTERT*, podría estar relacionada con la metilación de la región promotora, pudiendo jugar un papel importante en la progresión tumoral (57,63,109).

Asimismo, estudios recientes han demostrado altos niveles de expresión de *TERT* en tumores con hipermetilación en la región promotora, demostrando que la metilación funciona como un

mecanismo epigenético de activación de la telomerasa (59–61,101). En nuestro estudio, las muestras que carecen de mutaciones en *pTERT* mostraron altos niveles de metilación. Sin embargo, a diferencia de estudios previos (57), este hallazgo no se asociaba estadísticamente con mayores niveles de expresión de ARNm, probablemente debido a la baja proporción de muestras con ausencia de mutación en *pTERT* en nuestra serie. Por tanto, sería necesario estudiar el efecto que la hipermetilación tiene en la sobreexpresión de *TERT* independientemente de la mutación, en una serie más grande de pacientes con melanoma. Además, algunos estudios sugieren que, aunque la hipermetilación en THOR puede ser un mecanismo activador de la telomerasa prevalente en el cáncer, otros mecanismos epigenéticos como la accesibilidad de la cromatina son necesarios para la expresión del ARNm de *TERT* (63,109).

3. LA SOBREEXPRESIÓN DE *TERT* EN EL MELANOMA AVANZADO Y SU RELACIÓN CON LA MUTACIÓN DEL PROMOTOR

Se observó que la expresión de ARNm de *TERT* estaba presente en las muestras de melanoma y en las líneas celulares, mientras que los controles de piel normal y nevus no mostraron expresión. Esto coincide con lo descrito en el trabajo de Baltzarsen *et al.*, así como con lo que otros estudios anteriores han observado usando inmunohistoquímica (110,111).

Además, los niveles de expresión de ARNm de *TERT* mostraron una tendencia a mantenerse en muestras pareadas de melanoma primario y su correspondiente metástasis en el 65,5% de los pacientes. De acuerdo con lo observado en los casos discordantes de mutación en *pTERT* que presentaban mutación en la lesión metastásica y no en su tumor primario, el 70% de los casos discordantes mostraba altos niveles de expresión en el tumor metastásico en comparación con la lesión primaria, lo que puede confirmar la relación entre la sobreexpresión de *TERT* y una mayor agresividad en la enfermedad, al tener un papel importante en la progresión tumoral (44,45,49,99,111).

Por otro lado, se analizaron los niveles de expresión de *TERT* en relación con las mutaciones en la región promotora de *TERT*. A diferencia de otros estudios publicados con anterioridad, no se encontraron diferencias significativas entre los niveles de expresión transcripcional mostrados por las

muestras con *pTERT* mutado y los observados en muestras con ausencia de mutación en *pTERT*. No obstante, la mayoría de estos trabajos previos se realizaron con líneas celulares de melanoma y no con pacientes (41,42,112), mientras que otros se realizaron solo con pacientes jóvenes (60,98). En nuestra serie, se detectaron niveles altos de expresión de ARNm de *TERT* en tumores que carecen de mutaciones en *pTERT*, lo que podría explicarse por la presencia de otras alteraciones como la hipermetilación del promotor, reordenamientos cromosómicos, amplificaciones o fusiones transcripcionales (55,57). Es posible que algunas de estas alteraciones que se activan por factores ambientales no estén presentes en las líneas celulares o no se manifiesten todavía en pacientes jóvenes, como la metilación del *pTERT*, que se ha demostrado que aumenta con la edad (104).

Al contrario de lo observado en estudios previos (34,51), si estratificamos a los pacientes según el tipo de mutación detectada en *pTERT*, encontramos una asociación estadísticamente significativa entre la mutación C250T y unos niveles de expresión de ARNm de *TERT* más altos en comparación con los niveles de expresión detectados en las muestras con la mutación C228T. En 2015, Li *et al.* demostraron que la mutación C250T en *pTERT*, a diferencia de la C228T, requiere de la señalización no canónica de NFκB en cooperación con factores ETS para activar de manera eficiente la transcripción de *TERT* en tumores de glioblastoma multiforme (113). Por tanto, sabiendo que la expresión de *TERT* puede depender de la participación de eventos genéticos y epigenéticos, sería conveniente realizar estudios funcionales para explicar el diferente papel de las mutaciones C250T y C228T en la activación transcripcional de *TERT* en el melanoma.

4. RELACIÓN DE LAS MUTACIONES CONDUCTORAS DE *BRAF* Y *NRAS* CON LAS ALTERACIONES EN *TERT*.

Se analizó la coexistencia de mutaciones en *pTERT* y *BRAF* o *NRAS*, al tratarse de mutaciones conductoras o “driver” del melanoma (39). Se observó una coexistencia de estas mutaciones en proporciones más altas que las reportadas en estudios previos (48% vs 25%, para el caso de *BRAF* y *pTERT*) (44,48–50), probablemente debido a que nuestra serie se compone de pacientes con melanoma

en estadios avanzados. La coexistencia de dichas mutaciones se ha asociado en estudios previos con un aumento del crecimiento tumoral y un peor pronóstico de la enfermedad (48–52).

Además, en nuestra serie, observamos una asociación significativa entre el estado de mutación de *BRAF* o *NRAS* y la posición de la mutación de *pTERT* (C250T o C228T), ya que se encontró que las mutaciones de *NRAS* coexisten en mayor proporción con la mutación C250T de *pTERT* que con la mutación C228T, a diferencia de las mutaciones en *BRAF* que se dan junto a ambas mutaciones en proporciones similares. Además, se observaron altos niveles de expresión de ARNm de *TERT* en los casos que mostraban mutaciones en *NRAS*, y se confirmó que esta asociación era independiente de la presencia de la mutación C250T de *pTERT*, que en nuestro estudio se asoció también con una mayor expresión. Curiosamente, Manrique-Silva *et al.* observaron en su serie de pacientes que las mutaciones de *NRAS* tenían un mayor efecto en la supervivencia cuando coexistían con mutaciones de *pTERT* (52). Además, en nuestra serie, los pacientes con *BRAF* o *NRAS* mutado mostraban niveles de expresión de *TERT* más altos que los que carecían de mutaciones conductoras. Por lo tanto, parece existir una sinergia entre *BRAF/NRAS* y *TERT* en pacientes con melanoma, que podría explicarse por la activación del gen *TERT* debido a la unión de factores de transcripción cuando la región promotora está mutada, siendo estos factores promovidos por la señalización de la vía MAPK (52,114). Estudios actuales han relacionado esta sinergia con la respuesta al tratamiento con inhibidores BRAF/MEK, teniendo la mutación *pTERT* un papel importante, lo que podría sugerir un nuevo enfoque en las estrategias terapéuticas (115–119).

5. ASOCIACIÓN DE LAS ALTERACIONES EN *TERT* CON LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS

Las características clínicas e histológicas de los pacientes con melanoma incluidos en nuestra serie son similares a las descritas en la literatura (11–13,19,20), por lo tanto, se trata de una serie altamente representativa de melanoma desde el punto de vista epidemiológico que valida los resultados obtenidos en los diferentes análisis realizados en este trabajo.

Además, se analizó estadísticamente la asociación entre estas características y las alteraciones moleculares en *pTERT* (mutación, metilación o sobreexpresión), detectándose una relación entre el estado mutacional y el sexo de los pacientes. Se observó que la frecuencia de mutación en *pTERT* fue mayor en los pacientes varones que en las mujeres, como se describió en estudios previos (120,121). Sin embargo, las mujeres fueron las que presentaron mayores niveles de expresión de ARNm de *TERT*, posiblemente debido a una mayor proporción de mutación C250T y de mutaciones en *NRAS* en este grupo de pacientes, ya que en nuestro estudio ambas se asocian de forma independiente con unos mayores niveles de expresión en comparación con la mutación C228T o las mutaciones en *BRAF*. También se observaron mayores niveles de metilación en *pTERT* en los pacientes varones. Estudios previos han correlacionado la metilación de *pTERT* con la sobreexpresión de *TERT* solo en muestras que carecen de alteraciones somáticas como las mutaciones en el promotor (57). Los pacientes varones en este estudio tienen una alta frecuencia de mutación en *pTERT*, lo que explicaría que no tengan mayores niveles de expresión como consecuencia de la hipermetilación de la región promotora del gen.

Estudios recientes proponen que el estado mutacional de *pTERT* podría servir como biomarcador específico del sexo en pacientes con cáncer, ya que los pacientes varones con mutación en *pTERT* podían ser candidatos a beneficiarse del tratamiento con inmunoterapia, especialmente en melanoma (121). Se conoce que la activación de *TERT* es sensible tanto a los estrógenos como a los andrógenos (120), por lo que las alteraciones en *pTERT* podrían tener un papel importante en las diferencias observadas en el pronóstico y predicción de la respuesta al tratamiento entre hombres y mujeres. Sin embargo, en nuestro estudio, en el análisis estadístico realizado posteriormente no se observó una relación significativa entre el sexo y la supervivencia de los pacientes o la progresión de la enfermedad. Se necesitan más estudios con series de pacientes de mayor tamaño para clarificar la asociación del sexo con las alteraciones en *TERT* y su posible implicación en el tratamiento con inmunosupresores, así como la posibilidad de nuevas estrategias terapéuticas como la terapia anti-hormonal por privación de andrógenos (120,121).

Cuando evaluamos la asociación entre las alteraciones genómicas en *TERT* y las características clínico-patológicas, confirmamos que la presencia de mutaciones en *pTERT* se correlacionaba con un

mayor índice de Breslow, como indican estudios previos (44,45,48,52,100,110), lo que es indicativo de un peor pronóstico (1,19,21). En particular, observamos que la mutación C250T era más frecuente en melanomas con mayor grosor de Breslow (>4 mm), que a su vez se asocian con un alto riesgo de recidiva. Asimismo, mayores espesores de Breslow también se asociaron a niveles altos de expresión de ARNm de *TERT*, lo que puede explicarse por la mayor proporción de mutación C250T que, en nuestro estudio, tiene un efecto independiente en la sobreexpresión del gen. Estos resultados sugieren que las mutaciones más comunes en *pTERT*, C228T y C250T, pudieran no ser funcionalmente redundantes, a pesar de ser mutuamente excluyentes, como indicaban los estudios iniciales sobre mutaciones en *pTERT* en cáncer (41,42). Estudios anteriores en modelos de ratón sugieren que el aumento de la expresión de *TERT*, como consecuencia de las mutaciones en el promotor y, debido al aumento de actividad de la telomerasa, puede desempeñar un papel en el crecimiento e invasión tumoral, lo que explica su asociación con el índice de Breslow (44,110,122). Por lo tanto, futuros estudios funcionales en series más amplias permitirían conocer si los diferentes tipos de mutación en *pTERT*, C228T y C250T, tienen un papel diferente en la propagación local del melanoma primario, siendo esta un factor de riesgo para la posterior progresión metastásica.

6. EFECTO DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES EN *TERT* EN LA SUPERVIVENCIA DE LOS PACIENTES CON MELANOMA

Los análisis de supervivencia en los que se analizaron las variables clínicas e histológicas de los pacientes de la serie revelaron que la edad al diagnóstico, la ulceración y el espesor de Breslow estaban asociados con la supervivencia de los pacientes. En concreto, aquellos pacientes a los que se les había diagnosticado su tumor primario cuando tenían más de 70 años tendían a mostrar una peor supervivencia global que los de menor edad, mientras que los pacientes con índice de Breslow alto tendían a progresar antes que los de grosor medio o bajo. Por su parte, la presencia de ulceración en el tumor primario se asoció también con una peor supervivencia global. Estas tendencias coinciden con lo descrito en estudios anteriores, ya que estas tres variables son consideradas como factores clínicos e histológicos de mal pronóstico (6,13,19). No obstante, tras realizar el método de comparaciones múltiples de Benjamini &

Hochberg (BH), se observó que la asociación de estas variables clínicas e histológicas con la supervivencia no era estadísticamente significativa en nuestra serie.

Por su parte, los análisis de supervivencia en los que se incluyeron las variables moleculares confirmaron que la presencia de mutaciones en *pTERT* y los altos niveles de expresión de ARNm de *TERT* se correlacionaban con un peor pronóstico de la enfermedad, como se ha descrito en estudios previos (44,45,49,100,110). En particular, en nuestro estudio se observó que la mutación C250T se relacionaba con una peor supervivencia global (SG) y una peor supervivencia libre de progresión (SLP) en comparación con la mutación C228T. Además, tras ajustar el análisis estadístico de Cox por el método BH, se confirmó que entre todas las variables analizadas únicamente el estado de mutación de *pTERT* se asoció significativamente con la SG y la SLP, siendo la mutación C250T la que mostró el mayor efecto sobre la progresión y el desenlace en pacientes de la serie.

Estos resultados confirman la hipótesis de que ambas mutaciones en *pTERT* (C250T y C228T) no son funcionalmente redundantes, como indicaban los estudios de Horn *et al.* y Huang *et al.* (41,42). De hecho, otros estudios recientes también han observado diferencias en cuanto al efecto de ambas mutaciones sobre la supervivencia del paciente y la actividad transcripcional de *TERT*. Por un lado, Andrés-Lencina *et al.* y Chang *et al.* observaron que la mutación C228T se relacionaba con una peor supervivencia y un peor pronóstico, en comparación con los pacientes con mutación C250T, al contrario que en nuestro estudio (47,51). Sin embargo, ambos estudios se realizaron con una gran mayoría de pacientes en estadios tempranos de la enfermedad (estadios I y II), mientras que en nuestra serie se incluyeron pacientes con melanoma en estadios avanzados (III y IV). Estos resultados son consistentes con los resultados obtenidos por Del Bianco *et al.*, que analizaron muestras de pacientes de melanoma metastásico con *BRAF* mutado en los que asociaron la mutación *pTERT* C250T con una peor supervivencia y un peor pronóstico (115). En la misma línea, Blateau *et al.* observaron que la presencia de la mutación *pTERT* C228T era un marcador de buen pronóstico en pacientes con *BRAF* mutado que tienen marcadores de mal pronóstico (presencia de metástasis cerebrales y aumento de LDH) (116). Por lo tanto, esto sugiere que las mutaciones C250T y C228T de *pTERT* tienen diferentes efectos en la

supervivencia de los pacientes y la progresión de la enfermedad. En particular, nuestros resultados confirman que la presencia de mutación C250T podría ser un predictor significativo de una peor supervivencia y un peor pronóstico en pacientes con melanoma avanzado (estadios III y IV).

Por otro lado, debido a la asociación detectada entre las mutaciones en *pTERT* y la supervivencia y progresión de los pacientes con melanoma en nuestro estudio, se analizó si la coexistencia con mutaciones conductoras en *BRAF* o *NRAS* podía tener un efecto diferente. Se observó una tendencia de los pacientes con *pTERT* mutado en los que coexistían mutaciones en *BRAF* o *NRAS* a tener un peor pronóstico que los pacientes que carecían de mutaciones conductoras, como se ha descrito en estudios anteriores (48,50,52). Curiosamente, Manrique-Silva *et al.* observaron que el grupo de pacientes con melanoma en los que coexistían mutaciones en *pTERT* y *NRAS* se asociaban con la peor supervivencia global y supervivencia libre de progresión (52). Estos resultados podrían apoyar nuestros hallazgos sobre el efecto independiente que tienen las mutaciones de *NRAS* en la sobreexpresión de *TERT*, así como su asociación con la mutación C250T, que en nuestro estudio muestra una peor supervivencia y progresión. Se necesitan estudios en series más amplias de pacientes para aclarar cómo afecta esta aparente sinergia entre las mutaciones conductoras y las mutaciones en *pTERT* a la progresión del melanoma y cómo influye en las estrategias terapéuticas que sugieren estudios anteriores (115–119).

Del mismo modo, se analizó el impacto combinado de las alteraciones de la región promotora de *TERT* (hipermetilación y mutación) en la supervivencia de los pacientes con melanoma. Se observó una tendencia en aquellos pacientes con mutación en *pTERT* a tener una peor supervivencia libre de progresión, independientemente del estado de metilación del promotor. Además, los pacientes que carecían de mutaciones pero que tenían hipermetilación en *pTERT*, mostraron una tendencia a tener una peor SLP que aquellos que tenían niveles más bajos de metilación. Estos resultados concuerdan con los publicados en estudios previos sobre la combinación de alteraciones genéticas y epigenéticas de *TERT* en cáncer, que sugieren que la presencia de alteraciones en la región promotora (mutación o hipermetilación) aumenta el riesgo de recurrencia en diferentes tipos de tumores (59,62,101). Debido a nuestra limitada serie de casos no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas, por lo que sería

necesario estudios futuros en series más amplias para confirmar si los melanomas en los que coexisten ambas alteraciones en *pTERT* están asociados con una peor supervivencia y progresión, como sugieren estudios anteriores (62).

7. LA MUTACIÓN DE *pTERT* COMO BIOMARCADOR EN PLASMA PARA LA MONITORIZACIÓN DE PACIENTES CON MELANOMA METASTÁSICO.

Actualmente, las mutaciones en genes conductores como *BRAF/NRAS* detectadas en ADNct están siendo ampliamente estudiadas para su utilización en el seguimiento de pacientes con melanoma metastásico(91–93,123). Sin embargo, en un porcentaje considerable de los pacientes con melanoma estas mutaciones no están presentes (40-50%)(36), por lo que los esfuerzos futuros en los estudios sobre melanoma deben dirigirse a la detección de nuevos biomarcadores en biopsia líquida por técnicas altamente sensibles y su implementación en la rutina asistencial para el diagnóstico y monitorización de los pacientes.

Dada su alta frecuencia en melanoma (alrededor del 70%) (41,42,44,45), se analizó el estado mutacional de *pTERT* en muestras de plasma por ddPCR, pertenecientes a 25 de los 53 pacientes de la serie, con el fin de confirmar si podría servir como biomarcador para el seguimiento de los pacientes con melanoma avanzado. Se detectaron mutaciones de *pTERT* en plasma que se correlacionaron positivamente con el estado de mutación de la muestra de tejido perteneciente al mismo paciente, en proporciones similares a las detectadas en estudios previos (50 a 70%) (94,95). Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que las mutaciones de *pTERT* podrían servir como un valioso biomarcador en plasma, además de la mutación V600 de *BRAF*, para la monitorización de pacientes con melanoma avanzado (89,94,95). La incapacidad para detectar mutaciones de *pTERT* en el plasma del 64% (7/11) de los pacientes con resultado discordante, puede explicarse por la liberación variable de material tumoral por parte del tumor al torrente circulatorio. Por otro lado, la presencia de mutaciones diferentes en *pTERT* entre plasma y tejido en el 27% (3/11) de los casos discordantes puede deberse a la heterogeneidad tumoral que puede existir en las muestras de tejido y que se puede evitar analizando las muestras de

plasma (88,124). Aun así, considerando que las tasas de detección plasmática de mutaciones en *pTERT* son más bajas que las de otros genes conductores como *BRAF* (>80%) (91,92,125), sería necesario realizar estudios en series más amplias de pacientes para poder confirmar su utilidad como potencial biomarcador en melanoma.

Aunque en nuestro estudio se obtuvo una cantidad limitada de cfDNA, puede ser de gran utilidad analizar las mutaciones conductoras (*BRAF* y *NRAS*) en las muestras plasmáticas para confirmar que el cfDNA de las muestras es representativo del tumor, ya que estas son consistentes durante la progresión del melanoma y solo cambian después del tratamiento con inhibidores (38). Además, esto nos permitiría saber si la detección de mutaciones en *pTERT* puede tener utilidad en el gran porcentaje de muestras en las que las mutaciones “driver” no están presentes y que a priori no se les puede hacer seguimiento por biopsia líquida (91,92,94,95).

8. LAS ALTERACIONES CROMOSÓMICAS COMO BIOMARCADOR ALTERNATIVO EN PLASMA PARA LA MONITORIZACIÓN DE PACIENTES CON MELANOMA METASTÁSICO

Técnicas como FISH o los microarrays permiten realizar un diagnóstico diferencial más certero en aquellas muestras de melanoma y nevus melanocítico en las que el estudio histopatológico no es concluyente. Dichas técnicas se basan en la detección de alteraciones cromosómicas, que están presentes con gran frecuencia en los melanomas, pero no en los nevus. Ambas técnicas son realizadas habitualmente en material procedente de muestras de tejido FFPE (23,69–71). En este estudio se llevó a cabo una primera aproximación experimental para detectar las alteraciones cromosómicas en el ADNct procedente de muestras de plasma utilizando la técnica de microarrays, con la finalidad de comprobar si pudiera utilizarse en un futuro para monitorizar la respuesta terapéutica a partir de muestras menos invasivas y con una mayor disponibilidad, en los pacientes con melanoma metastásico que no disponen de mutaciones en *BRAF*, *NRAS* o *TERT* e incluso para predecir posibles recaídas (81,89,90).

De manera interesante, se logró detectar más de tres alteraciones cromosómicas en las muestras de ADNct procedente del plasma de 4 pacientes con melanoma metastásico. Muchas de estas alteraciones coinciden con las más comúnmente detectadas en melanoma, como por ejemplo la pérdida de 9p21 donde se localiza p16 (70,71,74). Además, en su mayoría se asemejan a las observadas en las muestras pareadas de tejido provenientes del mismo paciente. Estos hallazgos suponen una novedad en el uso de la biopsia líquida para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con melanoma, demostrando que los microarrays o arrays de SNP podrían ser una técnica adecuada para el análisis del ADNct, así como para la monitorización de aquellos pacientes que carecen de mutaciones conductoras (*BRAF/NRAS*) detectables en plasma.

No obstante, solo se pudo analizar la mitad de las muestras de plasma disponibles en nuestra serie (12/25), debido a que la técnica de microarrays se realizó a partir de la tecnología Oncoscan (Affymetrix) que requiere un cantidad y calidad mínimos de ADN para poder obtener un resultado valorable. Se esperaba que las concentraciones de ADNct fuesen óptimas, ya que los pacientes en estadios avanzados de la enfermedad cuentan con un gran número de células tumorales necróticas y por tanto tienen más ADNct en plasma, siempre que la muestra se recoja después del desarrollo de metástasis, pero antes del tratamiento sistémico (80). Sin embargo, se obtuvieron concentraciones variables de ADN, algunas por debajo de 1 ng/μl, lo que puede deberse a que el tamaño del tumor es diferente en cada una de las muestras, ya que estudios anteriores han correlacionado los niveles de ADNct con el volumen tumoral (80,126,127). Además, en cada tumor la liberación o desprendimiento del material tumoral al torrente circulatorio es variable, lo que se conoce como “tumor shedding”, que puede provenir de células no tumorales vivas (linfocitos), apoptóticas, necróticas o CTCs (85,88,124,127).

Por otro lado, la tasa de detección en este estudio fue considerablemente baja (33%), ya que de las 12 muestras de plasma que fueron analizadas solo se observaron pérdidas y ganancias cromosómicas en 4 de ellas, mientras que en las 8 muestras restantes no se observó ninguna alteración. Se sabe que los melanomas metastásicos presentan múltiples alteraciones cromosómicas, por lo que la incapacidad para su detección en estas muestras puede deberse a un enmascaramiento de los ácidos nucleicos libres no

tumorales presentes en el plasma, también conocido como cfDNA (82,85). Sin embargo, se llevó a cabo el estudio del estado mutacional de *pTERT* en las muestras de plasma para valorar su utilidad como potencial biomarcador de mal pronóstico. Este análisis reveló que en la mitad de los casos en los que no se observaron alteraciones por la técnica de microarrays (4/8), se detectaron mutaciones en *pTERT* por PCR digital, siendo este un indicativo de la presencia de ADNct. Estos resultados sugieren que la técnica de microarrays no tiene la sensibilidad suficiente para detectar cantidades bajas de ADNct que están enmascaradas por el cfDNA, a diferencia de la ddPCR.

9. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Entre las limitaciones de este estudio se encuentran el pequeño tamaño muestral, así como la incapacidad de obtener muestras de sangre periférica de todos los pacientes de la serie. Además, algunos pacientes fueron diagnosticados inicialmente en otros centros, por lo que no se disponía de todos los datos clínicos e histológicos de los mismos para poder realizar los análisis estadísticos y de supervivencia. Por tanto, sería conveniente realizar estudios prospectivos en series más amplias de pacientes con melanoma avanzado para confirmar los resultados obtenidos en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

1. Las mutaciones en el promotor de *TERT* aparecen de forma temprana durante la expansión clonal de las células tumorales y son importantes para la progresión metastásica del melanoma. Además, las mutaciones frecuentes C228T y C250T no son funcionalmente redundantes y tienen un papel diferente en la activación transcripcional de *TERT*.
2. El estado de metilación de *pTERT* tiene un papel importante en la regulación del gen durante el transcurso de la enfermedad, estando relacionada con la progresión tumoral de los pacientes que carecen de mutaciones en *pTERT*. Sin embargo, no se descarta la influencia de otros mecanismos genéticos adicionales en la sobreexpresión de *TERT*.
3. Existe una sinergia entre las mutaciones conductoras de *BRAF/NRAS* y la regulación de *TERT* en el melanoma, lo que podría tener relevancia en el enfoque de las estrategias terapéuticas con inhibidores BRAF/MEK.
4. La mutación C250T muestra un efecto independiente sobre la supervivencia global de los pacientes y se asocia con un mayor índice de Breslow, lo que sugiere que la mutación C250T es más agresiva que la C228T y, por tanto, su detección podría usarse como un biomarcador potencial de mal pronóstico en pacientes con melanoma avanzado.
5. Las mutaciones de *pTERT* podrían servir como un valioso biomarcador en plasma para la monitorización de pacientes con melanoma avanzado que carecen de mutaciones conductoras de *BRAF/NRAS*. Mientras que el análisis de aberraciones cromosómicas con microarrays podrían ser una técnica alternativa para la monitorización de pacientes que son negativos para *BRAF*, *NRAS* y *TERT*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrés-Lencina JJ, Lázaro Simó AI, Ruedas Martínez A, Duran Vian C, De Perosanz Lobo D, Sánchez Velázquez A, et al. Manual CTO de Medicina y Cirugía 11ª Edición. Dermatología. Vol. 8, CTO Editorial. 2019. 90 p.
2. Franco GN. Histología de la piel. MG Rev Fac Med UNAM. 2003;46(4).
3. Gilaberte Y, Prieto-Torres L, Pastushenko I, Juarranz Á. Anatomy and Function of the Skin. In: Nanoscience in Dermatology. Elsevier; 2016. p. 1–14.
4. Ferrándiz C. Dermatología Clínica. 4ª Ed. Elsevier 4ª Edition, editor. Elsevier; 2014. 307 p.
5. Echeverría B, Botella-Estrada R. Lesiones melanocíticas (nevos y melanomas) en atención primaria. JANO. 2009;1.740:49–56.
6. Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. The melanomas: A synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. Vol. 24, Pigment Cell and Melanoma Research. Pigment Cell Melanoma Res; 2011. p. 879–97.
7. AIM at Melanoma Foundation. AIM at Melanoma. 2023 [cited 2023 Mar 30]. Understanding Melanoma: Types of Moles and Skin Lesions. Available from: <https://www.aimatmelanoma.org/melanoma-101/understanding-melanoma/moles-and-other-lesions/types-moles-skin-lesions/>
8. Garnacho Saucedo GM, Moreno Giménez JC. Trastornos de la pigmentación: Léntigos, Nevus y Melanoma. Fotoprotección. Pediatría Integral. 2012;XVI (4):321–31.
9. Pellacani G, Scope A, Ferrari B, Pupelli G, Bassoli S, Longo C, et al. New insights into nevo genesis: In vivo characterization and follow-up of melanocytic nevi by reflectance confocal microscopy. J Am Acad Dermatol. 2009 Dec;61(6):1001–13.
10. Luelmo Aguilar J. Nevus melanocítico en la infancia. An Esp Pediatr. 2001;54(5):477–83.
11. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). AECC. 2022 [cited 2022 Apr 5]. Melanoma Maligno en la Piel: Lo que Necesitas Saber. Available from: <https://www.contraelcancer.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-piel/melanoma>
12. American Society of Clinical Oncology (ASCO). ASCO. 2020 [cited 2022 Apr 5]. p. 1–2 Melanoma: Estadísticas. Available from: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-cáncer/melanoma/estadísticas>

13. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *In Vivo* (Brooklyn). 2014;28(6).
14. Watson M, Holman DM, Maguire-Eisen M. Ultraviolet Radiation Exposure and Its Impact on Skin Cancer Risk. Vol. 32, *Seminars in Oncology Nursing*. Semin Oncol Nurs; 2016. p. 241–54.
15. Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin*. 1985 May 1;35(3):130–51.
16. Rodrigo Schwartz A, Gustavo Vial C, Ricardo Schwartz J. Estrategias de detección precoz de melanoma cutáneo. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 2011;22(4):466–75.
17. Swetter SM, Tsao H, Bichakjian CK, Curiel-Lewandrowski C, Elder DE, Gershenwald JE, et al. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2019 Jan 1;80(1):208–50.
18. Frishberg DP, Balch C, Balzer BL, Crowson AN, Didolkar M, McNiff JM, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with melanoma of the skin. *Arch Pathol Lab Med*. 2009 Oct;133(10):1560–7.
19. Bobos M. Histopathologic classification and prognostic factors of melanoma: A 2021 update. *Italian Journal of Dermatology and Venereology*. 2021;156(3):300–21.
20. Duncan LMD. The Classification of Cutaneous Melanoma. Vol. 23, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. 2009. p. 501–13.
21. Elder DE. Melanoma progression. *Pathology*. 2016;48(2):147–54.
22. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Melanoma cutáneo. *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines)*. 2020; Versión 4.
23. Wilson ML. Histopathologic and Molecular Diagnosis of Melanoma. *Clin Plast Surg*. 2021;48(4):587–98.
24. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther*. 2019;20(11):1366–79.
25. Amin MB, Edge SB, Greene FL, Schilsky RL, Brookland RK, Washington MK, et al. American Joint Committee on Cancer (AJCC). *AJCC Cancer Staging Manual*. AJCC Cancer Staging Manual. 2017. 211–212 p.

26. Cañueto J, Román-Curto C. Los nuevos sistemas de estadificación del AJCC incorporan novedades en el cáncer cutáneo. *Actas Dermosifiliogr.* 2017 Nov 1;108(9):818–26.
27. Keung EZ, Gershenwald JE. The eighth edition American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma staging system: implications for melanoma treatment and care. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2018;18(8):775–84.
28. Rodrigo Schwartz A. Melanoma maligno y diagnóstico diferencial de lesiones pigmentadas en piel. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2011 Nov;22(6):728–34.
29. Requena C, Requena L. Claves para el diagnóstico del melanoma spitzoide. *Piel.* 2009 Dec;24(10):542–8.
30. Yeh I, Busam KJ. Spitz melanocytic tumours – a review. Vol. 80, *Histopathology.* *Histopathology*; 2022. p. 122–34.
31. Read J, Wadt KAW, Hayward NK. Melanoma genetics. *J Med Genet.* 2015 Sep 3;53(1):1–14.
32. Tsao H, Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M. Recent Advances in Melanoma and Melanocyte Biology. *Journal of Investigative Dermatology.* 2017;137(3):557–60.
33. Teixido C, Castillo P, Martinez-Vila C, Arance A, Alos L, Jazirehi AR, et al. Molecular Markers and Targets in Melanoma. *Cells.* 2021;10(2320).
34. The Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell.* 2015 Jun 20;161(7):1681–96.
35. Ren M, Zhang J, Kong Y, Bai Q, Qi P, Zhang L, et al. BRAF, C-KIT, and NRAS mutations correlated with different clinicopathological features: an analysis of 691 melanoma patients from a single center. *Ann Transl Med.* 2022;10(2):31–31.
36. Platz A, Egyhazi S, Ringborg U, Hansson J. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. Vol. 1, *Molecular Oncology.* 2008. p. 395–405.
37. Kudchadkar R, Paraiso KHT, Smalley KSM. Targeting mutant BRAF in melanoma: Current status and future development of combination therapy strategies. Vol. 18, *Cancer Journal.* 2012. p. 124–31.

38. Riveiro-Falkenbach E, Villanueva CA, Garrido MC, Ruano Y, García-Martín RM, Godoy E, et al. Intra- and inter-tumoral homogeneity of BRAF V600E mutations in melanoma tumors. *Journal of Investigative Dermatology*. 2015;135(12):3078–85.
39. Mehnert JM, Kluger HM. Driver mutations in melanoma: Lessons learned from bench-to bedside studies. *Curr Oncol Rep*. 2012;14(5):449–57.
40. Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clinical Cancer Research*. 2008;14(21):6821–8.
41. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science (1979)*. 2013 Feb 22;339(6122):959–61.
42. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov G V., Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science (1979)*. 2013 Feb 22;339(6122):957–9.
43. Vinagre J, Pinto V, Celestino R, Reis M, Pópulo H, Boaventura P, et al. Telomerase promoter mutations in cancer: An emerging molecular biomarker? *Virchows Archiv*. 2014;465(2):119–33.
44. Heidenreich B, Nagore E, Rachakonda PS, Garcia-Casado Z, Requena C, Traves V, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in primary cutaneous melanoma. *Nat Commun*. 2014;5:3401.
45. Griewank KG, Murali R, Puig-Butille JA, Schilling B, Livingstone E, Potrony M, et al. TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 2014;106(9).
46. Heidenreich B, Kumar R. TERT promoter mutations in telomere biology. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2017;771:15–31.
47. Chang GA, Robinson E, Wiggins JM, Zhang Y, Tadepalli JS, Schafer CN, et al. Associations between TERT promoter mutations and survival in superficial spreading and nodular melanomas in a large prospective patient cohort. *Journal of Investigative Dermatology*. 2022 Apr;
48. Nagore E, Heidenreich B, Rachakonda S, Garcia-Casado Z, Requena C, Soriano V, et al. TERT promoter mutations in melanoma survival. *Int J Cancer*. 2016 Jul 1;139(1):75–84.
49. Nagore E, Heidenreich B, Requena C, García-Casado Z, Martorell-Calatayud A, Pont-Sanjuan V, et al. TERT promoter mutations associate with fast-growing melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016;29(2):236–8.

50. Macerola E, Loggini B, Giannini R, Garavello G, Giordano M, Proietti A, et al. Coexistence of TERT promoter and BRAF mutations in cutaneous melanoma is associated with more clinicopathological features of aggressiveness. *Virchows Archiv*. 2015;467(2):177–84.
51. Andrés-Lencina JJ, Rachakonda S, García-Casado Z, Srinivas N, Skorokhod A, Requena C, et al. TERT promoter mutation subtypes and survival in stage I and II melanoma patients. *Int J Cancer*. 2019;144(5):1027–36.
52. Manrique-Silva E, Rachakonda S, Millán-Esteban D, García-Casado Z, Requena C, Través V, et al. Clinical, environmental and histological distribution of BRAF, NRAS and TERT promoter mutations among patients with cutaneous melanoma: a retrospective study of 563 patients. *British Journal of Dermatology*. 2021;184(3):504–13.
53. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(20):1926–36.
54. Sanborn JZ, Chung J, Purdom E, Wang NJ, Kakavand H, Wilmott JS, et al. Phylogenetic analyses of melanoma reveal complex patterns of metastatic dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Sep 1;112(35):10995–1000.
55. Guilleret I, Yan P, Grange F, Braunschweig R, Bosman FT, Benhattar J. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int J Cancer*. 2002 Oct 1;101(4):335–41.
56. Holt SE, Wright WE, Shay JW. Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. *European Journal of Cancer Part A*. 1997 Apr;33(5):761–6.
57. Barthel FP, Wei W, Tang M, Martinez-Ledesma E, Hu X, Amin SB, et al. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat Genet*. 2017 Mar 1;49(3):349.
58. Renaud S, Loukinov D, Abdullaev Z, Guilleret I, Bosman FT, Lobanenkov V, et al. Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucleic Acids Res*. 2007 Feb;35(4):1245–56.
59. Castelo-Branco P, Choufani S, Mack S, Gallagher D, Zhang C, Lipman T, et al. Methylation of the TERT promoter and risk stratification of childhood brain tumours: An integrative genomic and molecular study. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):534–42.

60. Seynnaeve B, Lee S, Borah S, Park Y, Pappo A, Kirkwood JM, et al. Genetic and Epigenetic Alterations of TERT Are Associated with Inferior Outcome in Adolescent and Young Adult Patients with Melanoma. *Sci Rep.* 2017;7(March):1–9.
61. Lee DD, Leão R, Komosa M, Gallo M, Zhang CH, Lipman T, et al. DNA hypermethylation within TERT promoter upregulates TERT expression in cancer. *Journal of Clinical Investigation.* 2019;129(1):223–9.
62. Leão R, Lee D, Figueiredo A, Hermanns T, Wild P, Komosa M, et al. Combined genetic and epigenetic alterations of the TERT promoter affect clinical and biological behavior of bladder cancer. *Int J Cancer.* 2019 Apr 1;144(7):1676–84.
63. Salgado C, Roelse C, Nell R, Gruis N, Van Doorn R, Van Der Velden P. Interplay between TERT promoter mutations and methylation culminates in chromatin accessibility and TERT expression. *PLoS One.* 2020;15(4):1–20.
64. Mutu DE, Avino A, Balcangiu-Stroescu AE, Mehedințu M, Bălan D, Brîndușe L, et al. Histopathological evaluation of cutaneous malignant melanoma: A retrospective study. *Exp Ther Med.* 2022;23(6):1–7.
65. Ricci C, Dika E, Ambrosi F, Lambertini M, Veronesi G, Barbara C. Cutaneous Melanomas: A Single Center Experience on the Usage of Immunohistochemistry Applied for the Diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11):5911.
66. Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia (parte i). *Actas Dermosifiliogr.* 2013 Mar 1;104(2):99–127.
67. Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia (parte ii). *Actas Dermosifiliogr.* 2013 Apr 1;104(3):181–203.
68. Yeh I. Update on classification of melanocytic tumors and the role of immunohistochemistry and molecular techniques. *Semin Diagn Pathol.* 2022;39(4):248–56.
69. Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Bröcker EB, Pinkel D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 1998;58(10):2170–5.

70. Mesbah Ardakani N, Thomas C, Robinson C, Mina K, Harvey NT, Amanuel B, et al. Detection of copy number variations in melanocytic lesions utilising array based comparative genomic hybridisation. *Pathology*. 2017;49(3):285–91.
71. North JP, Vemula SS, Bastian BC. Chromosomal copy number analysis in melanoma diagnostics. *Methods in Molecular Biology*. 2014;1102:199–226.
72. Bauer J, Bastian BC. Distinguishing melanocytic nevi from melanoma by DNA copy number changes: comparative genomic hybridization as a research and diagnostic tool. *Dermatol Ther*. 2006 Jan 1;19(1):40–9.
73. Wiesner T, Kutzner H, Cerroni L, Mihm MC, Busam KJ, Murali R. Genomic aberrations in spitzoid melanocytic tumours and their implications for diagnosis, prognosis and therapy. *Pathology*. 2016;48(2):113–31.
74. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D. Classifying Melanocytic Tumors Based on DNA Copy Number Changes. *American Journal of Pathology*. 2003;163(5):1765–70.
75. Gerami P, Jewell SS, Morrison LE, Blondin B, Schulz J, Ruffalo T, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *American Journal of Surgical Pathology*. 2009;33(8):1146–56.
76. Gerami P, Li G, Pouryazdanparast P, Blondin B, Beilfuss B, Slenk C, et al. A highly specific and discriminatory FISH assay for distinguishing between benign and malignant melanocytic neoplasms. *American Journal of Surgical Pathology*. 2012 Jun;36(6):808–17.
77. Kerl K, Palmedo G, Wiesner T, Mentzel T, Rütten A, Schärer L, et al. A proposal for improving multicolor fish sensitivity in the diagnosis of malignant melanoma using new combined criteria. *American Journal of Dermatopathology*. 2012 Aug;34(6):580–5.
78. Ren M, Bai Q, Kong Y, Zhou X, Chang H, Cai X. Ancillary values of fluorescence in situ hybridization with different gene combination in diagnosis of malignant melanoma. *Chinese Journal of Pathology*. 2020 Aug 8;49(08):827–33.
79. Kerl K, Palmedo G, Wiesner T, Mentzel T, Rütten A, Schärer L, et al. A proposal for improving multicolor fish sensitivity in the diagnosis of malignant melanoma using new combined criteria. *American Journal of Dermatopathology*. 2012 Aug;34(6):580–5.
80. Cheng F, Su L, Qian C. Circulating tumor DNA: A promising biomarker in the liquid biopsy of cancer. *Oncotarget*. 2016;7(30):48832–41.

81. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(9):531–48.
82. Hofman P, Popper HH. Pathologists and liquid biopsies: to be or not to be? Vol. 469, *Virchows Archiv*. 2016. p. 601–9.
83. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer* 2011 11:6. 2011 May 12;11(6):426–37.
84. Diaz LA, Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping Circulating Tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology*. 2014 Feb 2;32(6):579.
85. Van Der Vaart M, Pretorius PJ. The Origin of Circulating Free DNA. *Clin Chem*. 2007 Dec 1;53(12):2215–2215.
86. García-Olmo D, Ontañón J, Martínez E, Vallejo M. Tumor DNA circulating in the plasma might play a role in metastasis. The hypothesis of the genometastasis. *Histol Histopathol*. 1999;14(4):1159–64.
87. Mohanty A, Mohanty SK, Rout S, Pani C. Liquid Biopsy, the hype vs. hope in molecular and clinical oncology. *Semin Oncol*. 2021;48(3):259–67.
88. Huang N, Lee KJ, Stark MS. Current Trends in Circulating Biomarkers for Melanoma Detection. *Front Med (Lausanne)*. 2022;9(April):1–8.
89. Marczyński GT, Laus AC, dos Reis MB, Reis RM, Vazquez V de L. Circulating tumor DNA (ctDNA) detection is associated with shorter progression-free survival in advanced melanoma patients. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–11.
90. Váraljai R, Wistuba-Hamprecht K, Seremet T, Diaz JMS, Nsengimana J, Sucker A, et al. Application of Circulating Cell-Free Tumor DNA Profiles for Therapeutic Monitoring and Outcome Prediction in Genetically Heterogeneous Metastatic Melanoma. *JCO Precis Oncol*. 2019;(3):1–10.
91. Sobczuk P, Kozak K, Kopeć S, Rogala P, Świtaj T, Kosela-Paterczyk H, et al. The Use of ctDNA for BRAF Mutation Testing in Routine Clinical Practice in Patients with Advanced Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2022 Feb 1;14(3).
92. Sanmamed MF, Fernández-Landázuri S, Rodríguez C, Zárata R, Lozano MD, Zubiri L, et al. Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR

- in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin Chem*. 2015 Jan 1;61(1):297–304.
93. Santiago-Walker A, Gagnon R, Mazumdar J, Casey M, Long G, Schadendorf D, et al. Correlation of BRAF Mutation Status in Circulating-Free DNA and Tumor and Association with Clinical Outcome across Four BRAFi and MEKi Clinical Trials. *Clinical Cancer Research*. 2016;22(3):567–74.
94. Corless BC, Chang GA, Cooper S, Syeda MM, Shao Y, Osman I, et al. Development of Novel Mutation-Specific Droplet Digital PCR Assays Detecting TERT Promoter Mutations in Tumor and Plasma Samples. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2019;21(2):274–85.
95. McEvoy AC, Calapre L, Pereira MR, Giardina T, Robinson C, Khattak MA, et al. Sensitive droplet digital PCR method for detection of TERT promoter mutations in cell free DNA from patients with metastatic melanoma. *Oncotarget*. 2017;8(45):78890–900.
96. Welti M, Dimitriou F, Gutzmer R, Dummer R. Triple Combination of Immune Checkpoint Inhibitors and BRAF/MEK Inhibitors in BRAFV600 Melanoma: Current Status and Future Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2022 Nov 8;14(22):5489.
97. Seyhan AA, Carini C. Insights and Strategies of Melanoma Immunotherapy: Predictive Biomarkers of Response and Resistance and Strategies to Improve Response Rates. *Int J Mol Sci*. 2023 Jan 1;24(1).
98. Lee S, Opresko P, Pappo A, Kirkwood JM, Bahrami A. Association of TERT promoter mutations with telomerase expression in melanoma. Vol. 29, *Pigment Cell and Melanoma Research*. 2016. p. 391–3.
99. Pópulo H, Boaventura P, Vinagre J, Batista R, Mendes A, Caldas R, et al. TERT Promoter Mutations in Skin Cancer: The Effects of Sun Exposure and X-Irradiation. *Journal of Investigative Dermatology*. 2014 Aug 1;134(8):2251–7.
100. Gandini S, Zanna I, De Angelis S, Palli D, Raimondi S, Ribero S, et al. TERT promoter mutations and melanoma survival: A comprehensive literature review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2021;160(January 2021):103288.
101. Castelo-Branco P, Leão R, Lipman T, Campbell B, Lee D, Price A, et al. A cancer specific hypermethylation signature of the TERT promoter predicts biochemical relapse in prostate cancer: A retrospective cohort study. *Oncotarget*. 2016;7(36):57726–36.

102. Vinagre J, Almeida A, Pópulo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun.* 2013;4.
103. Kreutz M, Hochstein N, Kaiser J, Narz F, Peist R. Pyrosequencing: powerful and quantitative sequencing technology. *Curr Protoc Mol Biol.* 2013;104.
104. Xin Y, Dong K, Cao F, Tian Y, Sun J, Peng M, et al. Studies of hTERT DNA methylation assays on the human age prediction. *Int J Legal Med.* 2019;133(5):1333–9.
105. Jung HS, Lefferts JA, Tsongalis GJ. Utilization of the oncoscan microarray assay in cancer diagnostics. *Applied Cancer Research.* 2017;37(1):1–8.
106. Yang S, Leone DA, Biswas A, Deng A, Jukic D, Singh R, et al. Concordance of somatic mutation profiles (BRAF, NRAS, and TERT) and tumoral PD-L1 in matched primary cutaneous and metastatic melanoma samples. *Hum Pathol.* 2018;82(2018):206–14.
107. Chang GA, Wiggins JM, Corless BC, Syeda MM, Tadepalli JS, Blake S, et al. TERT, BRAF, and NRAS Mutational Heterogeneity between Paired Primary and Metastatic Melanoma Tumors. Vol. 140, *Journal of Investigative Dermatology.* Society for Investigative Dermatology; 2020. 1609-1618.e7 p.
108. Hugdahl E, Kalvenes MB, Mannelqvist M, Ladstein RG, Akslen LA. Prognostic impact and concordance of TERT promoter mutation and protein expression in matched primary and metastatic cutaneous melanoma. *Br J Cancer.* 2018;118(1):98–105.
109. Stern JL, Paucek RD, Huang FW, Ghandi M, Nwumeh R, Costello JC, et al. Allele-Specific DNA Methylation and Its Interplay with Repressive Histone Marks at Promoter-Mutant TERT Genes. *Cell Rep.* 2017;21(13):3700–7.
110. Baltzarsen PB, Georgsen JB, Nielsen PS, Steiniche T, Stougaard M. Detection of mRNA of Telomerase Protein in Benign Naevi and Melanomas Using RNAscope. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology.* 2020;28(1):36–41.
111. Fullen D, Zhu W, Thomas D, Su L. hTERT expression in melanocytic lesions: an immunohistochemical study on paraffin-embedded tissue. *J Cutan Pathol.* 2005 Nov 1;32(10):680–4.
112. Shaughnessy M, Njauw CN, Artomov M, Tsao H. Classifying Melanoma by TERT Promoter Mutational Status. *Journal of Investigative Dermatology.* 2020 Feb 1;140(2):390-394.e1.

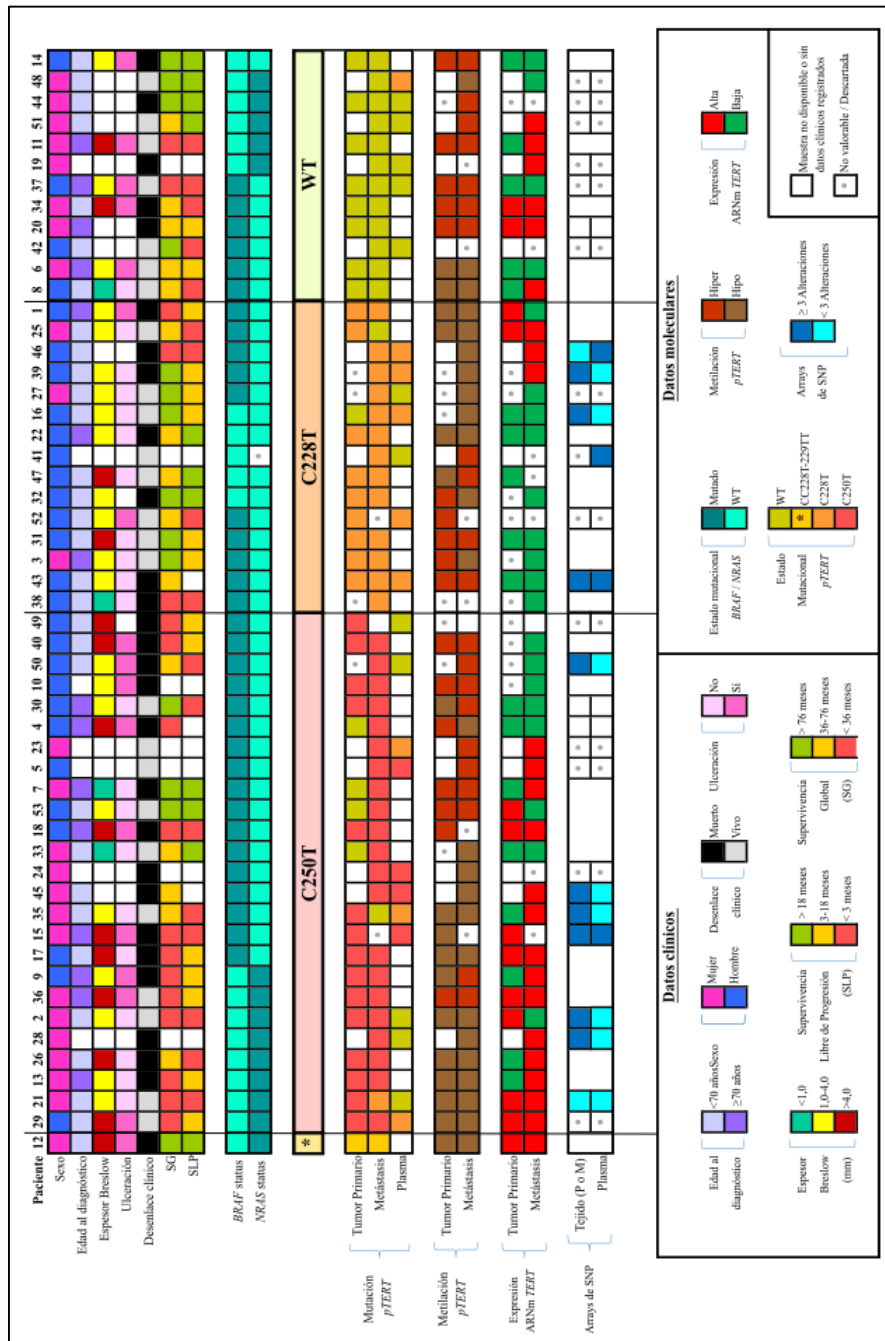
113. Li Y, Zhou QL, Sun W, Chandrasekharan P, Cheng HS, Ying Z, et al. Non-canonical NF- κ B signalling and ETS1/2 cooperatively drive C250T mutant TERT promoter activation. *Nat Cell Biol.* 2015 Oct 3;17(10):1327–38.
114. Liu R, Zhang T, Zhu G, Xing M. Regulation of mutant TERT by BRAF V600E/MAP kinase pathway through FOS/GABP in human cancer. *Nat Commun.* 2018;9(1).
115. Del Bianco P, Stagni C, Giunco S, Fabozzi A, Elefanti L, Pellegrini S, et al. TERT Promoter Mutations Differently Correlate with the Clinical Outcome of MAPK Inhibitor-Treated Melanoma Patients. *Cancers (Basel).* 2020 Apr 1;12(4).
116. Bateau P, Coyaud E, Laurent E, Béganton B, Ducros V, Chauchard G, et al. TERT Promoter Mutation as an Independent Prognostic Marker for Poor Prognosis MAPK Inhibitors-Treated Melanoma. *Cancers (Basel).* 2020 Aug 1;12(8):1–15.
117. Reyes-Uribe P, Adrianzen-Ruesta MP, Deng Z, Echevarria-Vargas I, Mender I, Saheb S, et al. Exploiting TERT dependency as a therapeutic strategy for NRAS-mutant melanoma. *Oncogene.* 2018;37(30):4058–72.
118. Thielmann CM, Matull J, Zaremba A, Murali R, Chorti E, Lodde G, et al. TERT promoter mutations are associated with longer progression-free and overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving BRAF and MEK inhibitor therapy. *Eur J Cancer.* 2022;161:99–107.
119. Tan J, Liu R, Zhu G, Umbricht CB, Xing M. TERT promoter mutation determines apoptotic and therapeutic responses of BRAF-mutant cancers to BRAF and MEK inhibitors: Achilles Heel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(27):15846–51.
120. Egberts F, Krüger S, Behrens HM, Bergner I, Papaspyrou G, Werner JA, et al. Melanomas of unknown primary frequently harbor TERT-promoter mutations. *Melanoma Res.* 2014;24(2):131–6.
121. Li J, Li Z, Zhang C, Zhang C, Wang H. Male patients with TERT mutation may be more likely to benefit from immunotherapy, especially for melanoma. *Aging.* 2020;12(17):17288–94.
122. Bagheri S, Nosrati M, Li S, Fong S, Torabian S, Rangel J, et al. Genes and pathways downstream of telomerase in melanoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jul 7;103(30):11306.
123. Schreuer M, Meersseman G, Van Den Herrewegen S, Jansen Y, Chevolet I, Bott A, et al. Quantitative assessment of BRAF V600 mutant circulating cell-free tumor DNA as a tool for

- therapeutic monitoring in metastatic melanoma patients treated with BRAF/MEK inhibitors. *J Transl Med.* 2016;14(1):95.
124. Cheng ML, Pectasides E, Hanna GJ, Parsons HA, Choudhury AD, Oxnard GR. Circulating tumor DNA in advanced solid tumors: Clinical relevance and future directions. *CA Cancer J Clin.* 2021 Mar 1;71(2):176–90.
125. Santiago-Walker A, Gagnon R, Mazumdar J, Casey M, Long G V., Schadendorf D, et al. Correlation of BRAF Mutation Status in Circulating-Free DNA and Tumor and Association with Clinical Outcome across Four BRAFi and MEKi Clinical Trials. *Clin Cancer Res.* 2016 Feb 1;22(3):567–74.
126. Newman AM, Bratman S V., To J, Wynne JF, Eclow NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med.* 2014 Apr 6;20(5):548–54.
127. Avanzini S, Kurtz DM, Chabon JJ, Moding EJ, Hori SS, Gambhir SS, et al. A mathematical model of ctDNA shedding predicts tumor detection size. *Sci Adv.* 2020;6(50):1–9.

ANEXOS

Anexo 1: Recopilación de los datos clínicos, histológicos y moleculares de los 53 pacientes con melanoma avanzado incluidos en el estudio

Cada paciente está representado en una columna, en la que se incluyen los datos clínicos e histológicos relevantes para el estudio; y los resultados obtenidos en sus muestras pareadas de tejido FFPE de melanoma primario y metástasis; y, si procede, su biopsia líquida (plasma). Los datos se agrupan de acuerdo con el estado de mutación de *pTERT* (mutado en C250T, C228T o C228-229TT; o de tipo salvaje, WT).



Anexo 2: Publicación científica relacionada con los resultados de la tesis doctoral

Blanco-García L, Ruano Y, Blanco Martínez-Illescas R, Cubo R, Jiménez Sánchez P, Sánchez-Arévalo Lobo VJ, Riveiro Falkenbach E, Ortiz Romero P, Garrido MC, Rodríguez Peralto JL. *pTERT* C250T mutation: A potential biomarker of poor prognosis in metastatic melanoma. *Heliyon*. 2023 Aug 6;9(8): e18953. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e18953. PMID: 37609429; PMCID: PMC10440525.

Heliyon 9 (2023) e18953



pTERT C250T mutation: A potential biomarker of poor prognosis in metastatic melanoma

Leyla Blanco-García^{a,1,*}, Yolanda Ruano^{a,1}, Raquel Blanco Martínez-Illescas^{a,b}, Rocío Cubo^a, Paula Jiménez Sánchez^{a,b}, Víctor J. Sánchez-Arévalo Lobo^{a,b}, Erica Riveiro Falkenbach^a, Pablo Ortiz Romero^c, María C. Garrido^{d,e,2}, José L. Rodríguez Peralto^{d,e,2}

^a Research Institute 12 de Octubre Hospital, Madrid, Spain

^b Biosanitary Research Institute, Faculty of Experimental Sciences, Francisco de Vitoria University, Pozuelo de Alarcón, Madrid, Spain

^c Department of Dermatology, 12 de Octubre University Hospital, Madrid, Spain

^d Department of Pathology, 12 de Octubre University Hospital, Madrid, Spain

^e Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Melanoma
TERT promoter mutations
TERT promoter methylation
Circulating free DNA
Biomarker

ABSTRACT

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer and the leading cause of death from cutaneous tumors. Several studies have associated alterations in the *TERT* promoter region (*pTERT*) with gene overexpression, aggressiveness and poor prognosis of the disease. The aim of this study was to clarify the role of *pTERT* molecular status in paired samples of primary melanoma and metastasis using tissue and plasma to establish a correlation with disease progression and survival.

A total of 88 FFPE tissue samples from 53 patients with advanced melanoma were analyzed. Of these, 35 had paired samples. We also examined cfDNA samples from plasma of 25 patients. We detected a good correlation between primary tumors and metastases in *pTERT* mutation and methylation status. We were also able to identify *pTERT* mutations in plasma samples that correlated with mutational status in tissue samples. Interestingly, the C250T mutation was associated with worse survival and higher *TERT* mRNA expression, compared to the other most common mutation: C228T. In addition, hyper-methylation of the promoter region seems to be related to the progression of *pTERT* wild type (WT) patients. These results suggest that *TERT* gene alterations plays an important role during tumor progression, with the detection of the C250T mutation in tissue and plasma as a potential biomarker of poor prognosis in patients with advanced melanoma.