



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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



Universitat Autònoma de Barcelona

## **TESIS DOCTORAL**

# **CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAJERO EN DISTINTOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE CARCINOMA BASOCELULAR**

**PATRICIA BASSAS FREIXAS**

2018





Universitat Autònoma de Barcelona

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ÁCIDO RIBONUCLEICO  
MENSAJERO EN DISTINTOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE CARCINOMA  
BASOCELULAR**

**TESIS DOCTORAL presentada por:**

**PATRICIA BASSAS FREIXAS**

**DIRECTORES**

**DR. VICENÇ GARCÍA-PATOS BRIONES**

**DR. ALEIX PRAT APARICIO**

**TUTOR**

**DR. VICENÇ GARCÍA-PATOS BRIONES**

Barcelona, 2018



**A mis padres, Javier y Aurora**



# **AGRADECIMIENTOS**





Al **Prof. Dr. Vicenç García-Patos Briones**, director y tutor de esta tesis, jefe del Servicio de Dermatología del Hospital Universitari Vall d'Hebron, por la toda la dedicación y ayuda que me ha dado durante la realización de este trabajo. Porque siempre va "más allá" con sus reflexiones y consejos.

Al **Dr. Aleix Prat Aparicio**, jefe del Servicio de Oncología Médica del Hospital Clínic i Provincial, por poner a mi alcance la tecnología necesaria para desarrollar este trabajo y encontrar tiempo para dedicarse a él.

A la **Dra. Berta Ferrer Fàbrega**, facultativa especialista del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Vall d'Hebron. Por su disponibilidad y ayuda; su colaboración ha sido fundamental para hacer posible este trabajo.

A **Laia Paré Brunet**, bióloga del "*Translational Genomics and Targeted Therapeutics in Solid Tumors Lab*" IDIBAPS y a **Patricia Galván Jurado**, técnica de laboratorio en el VHIO, por encontrar tiempo para mi proyecto en su ajetreado día a día.

A mis compañeros del Servicio de Dermatología del **Hospital** y a todos mis amigos, que me han prestado apoyo moral y animado a realizar este trabajo.

Y sobre todo a mi familia. A mi marido **Christian**, que ha compartido conmigo muchas horas de trabajo, momentos buenos, momentos difíciles... siempre apoyándome y animándome. A mis dos hijos, **Sofía** y **Hugo**, por todas las horas que "les he robado". A mis hermanos, **Javier** y **Alejandro**, porque siempre están ahí. Y, sobre todo, a mis padres, **Javier** y **Aurora**; a ellos les debo todo lo que soy. No tengo palabras para agradecerles la confianza que han depositado en mi durante toda mi etapa académica y la motivación y energía que me han brindado durante todo este tiempo. Sin ellos no habría llegado "hasta aquí". Gracias.



## RESUMEN

El carcinoma basocelular (CBC) es el tumor maligno más frecuente en el ser humano y su incidencia está en aumento. Existe un subgrupo de CBC que presentan un comportamiento más agresivo, son más destructivos e invasivos y tienen un mayor riesgo de recurrencia y de metástasis. Desconocemos los mecanismos moleculares que condicionan las diferentes formas clínico-patológicas y las implicaciones que pueden tener en la respuesta a los diferentes tratamientos. En este trabajo hemos estudiado 25 CBC (superficiales, nodulares, morfeiformes e infiltrantes), para investigar su heterogeneidad molecular mediante análisis de expresión de ARNm. Hemos identificado un grupo de 120 genes relacionados con el sistema inmune que presentan una elevada expresión en la mayoría de CBC infiltrantes, una expresión intermedia en los superficiales y baja en los morfeiformes y nodulares. Para corroborar estos datos hemos analizado la expresión de estos 120 genes y hallado que la expresión de PD-L1 es significativamente superior en el grupo de CBC infiltrantes en comparación con el resto ( $p=0,01$ ). Estos resultados sugieren que el eje PD-1/PD-L1 desempeña un papel importante en la mayor agresividad intrínseca de los CBC infiltrantes y, por lo tanto, su bloqueo podría ser útil como tratamiento de este subtipo de CBC.

Basal cell carcinomas (BCC) are the most common cancers worldwide and their incidence is increasing annually. A subset of BCC behaves more aggressively and are associated with a higher risk of recurrence, local tissue destruction, deeper invasion, subclinical spread, morbidity and distant metastasis risk. The molecular basis for the aggressive behavior, for the different clinical and pathological forms of BCC and their response to the treatments available remains to be elucidated. In this study we evaluated 25 BCC (superficial, nodular, morpheaform and infiltrative) to delineate their molecular heterogeneity by means of mRNA expression analysis. We identified 120 immune-related genes linked to immune response with high expression in most of infiltrative CBC, medium expression in

superficial CBC and low in morpheaform and nodular. To corroborate these findings we analyzed these 120 genes and discovered that PD-L1 expression was associated with infiltrative BCC samples compared to nodular, superficial, morpheaform and basosquamous BCC ( $p=0,01$ ). Overall, our results suggest that the PD-1/PD-L1 axis may play an important role in locally infiltrative BCC and provide support for PD-1/PD-L1 blockade.

# ABREVIATURAS



## ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adenocorticotropa
AD	Herencia autosómica dominante
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígeno
AJCC	<i>American Joint Comitee on Cancer</i>
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
aPKC	Proteína cinasa C $\iota/\lambda$
AR	Herencia autosómica recesiva
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CBC	Carcinoma basocelular
CBCIa	Carcinoma basocelular localmente avanzado
CBCm	Carcinoma basocelular metastásico
CCM	Carcinoma de células de Merkel
CCNM	Cáncer cutáneo no melanoma
CD	Células dendríticas
CEC	Carcinoma escamoso cutáneo
CK1	Caseín cinasa 1
CL	Células de Langerhans
CMH I	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
CMH II	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase II
CMM	Cirugía micrográfica de Mohs
CPA	Célula presentadora de antígenos
CPNM	Cáncer de pulmón no microcítico
CRI	Comité de revisión independiente
CTLA-4	Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico
Desert Hh	Desert hedgehog
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Foxp3	Factor de transcripción <i>forkhead/winged-helix</i>
Gli	Factores de transcripción asociados a glioma
GPCR	Proteína G



GSK3 $\beta$	Glucógeno sintasa cinasa 3
Hh	Hedgehog
HHIP1	<i>Hedgehog interacting protein</i>
HUVH	Hospital Universitari Vall d'Hebron
IARC	Agencia internacional de investigación sobre cáncer
IFN- $\alpha$	Interferón alfa
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IHQ	Inmunohistoquímica
IL-2	Interleucina 2
IC	Intervalo de confianza
Indian Hh	Indian Hedhehog
KIF7	<i>Kinesin family member 7</i>
LAG-3	Gen 3 de activación del linfocito
LB	Linfocito B
LIT	Linfocitos infiltrantes del tumor
LT	Linfocito T
LTreg	Linfocitos T reguladores
LX	Herencia ligada al cromosoma X
MC1R	Receptor de la melanocortina 1
MITF	Factor de transcripción asociado con microftalmia
MM	Melanoma maligno
MMF	Mofetil micofenolato
mTOR	Molécula diana de la rapamicina en mamíferos
OR	Razón de probabilidades
ORR	Tasa de respuesta objetiva
PD-1	Molécula de muerte programada 1
PD-L1	Ligando de la molécula de muerte programada 1
PD-L2	Ligando de la molécula de muerte programada 2
PDGF	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PKA	Proteína cinasa A
POMC	Péptidos derivados de la proopiomelanocortina
Ptch	Patched
RLT	Receptor del linfocito T

RECIST	Evaluación de la respuesta en tumores sólidos
REDECAN	Red española de registros del cáncer
RHC	<i>Red hair color</i>
RI	Radiación ionizante
RMRP	Endoribonucleasa procesadora del ácido ribonucleico mitocondrial
RNA-seq	<i>RNA-sequencing</i>
RT	Radioterapia
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RTOS	Receptor de trasplante de órgano sólido
RUV	Radiación ultravioleta
SG	Síndrome de Gorlin o del carcinoma basocelular nevoide
Smo	Smoothened
SNPs	Polimorfismos de un solo nucleótido
Sonic Hh	Sonic hedgehog
SUFU	Factor supresor de Fused
SW	Síndrome de Werner
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEM	Transición epitelio-mesénquima
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TNF- $\gamma$	Factor de necrosis tumoral gamma
XL	Herencia ligada al cromosoma X
XP	Xenoderma pigmentoso
$\alpha$ -MSH	Hormona estimulante de los melanocitos $\alpha$



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Epidemiología	3
1.2. Patogenia	4
1.2.1. Origen	4
1.2.2. Vía de señalización Hedgehog	7
1.2.3. Otras alteraciones genéticas en el carcinoma basocelular	12
1.3. Factores de riesgo	18
1.4. Variantes clínicas	31
1.5. Variantes histológicas	32
1.6. Carcinoma basocelular avanzado	36
1.7. Tratamiento	39
<b>2. INMUNIDAD Y CÁNCER</b>	<b>45</b>
2.1. Respuesta inmunológica frente al cáncer	50
2.1.1. Linfocitos infiltrantes del tumor (LIT)	50
2.1.2. Moléculas correguladoras de la inmunidad	53
2.1.3. Eje PD-1/PD-L1 en tumores malignos: valor pronóstico y como biomarcador	55
2.1.4. Inmunoterapia y cáncer	58
<b>3. INMUNIDAD Y CARCINOMA BASOCELULAR</b>	<b>63</b>

3.1. Radiación ultravioleta e inmunosupresión	65
3.2. Carcinoma basocelular en el paciente receptor de trasplante de órgano sólido (RTOS)	66
3.3. Regresión espontánea	68
3.4. Infiltrados inflamatorios tumorales	69
3.5. Eje PD-1/PD-L1 e inmunoterapia en el carcinoma basocelular	69
<b>4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>71</b>
4.1. Hipótesis	73
4.2. Objetivos	74
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>75</b>
5.1. Recogida de las muestras	77
5.2. Procedimientos del estudio	78
5.2.1. Secuenciación de ARN	78
5.2.2. Análisis estadístico	78
5.3. Consideraciones éticas	79
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>81</b>
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>93</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>109</b>

<b>9. LÍNEAS DE FUTURO</b>	<b>113</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>117</b>
<b>11. ANEXO</b>	<b>141</b>



# 1. INTRODUCCIÓN





## 1.1. EPIDEMIOLOGÍA

El carcinoma basocelular (CBC) es el tumor maligno más frecuente en el ser humano, con una incidencia anual estimada del 0,1 al 0,5%. Representa el 75% del total de las neoplasias malignas de la piel, el 80% de los cánceres cutáneos no melanoma (CCNM) y aparece con una proporción de 5:1 respecto al carcinoma escamoso cutáneo (CEC) (1,2).

La alta incidencia del CBC y las dificultades en su cuantificación hace que no sea habitualmente incluido en los diferentes registros de cáncer. Tejera-Vaquerizo y colaboradores realizaron una revisión sistemática de artículos publicados en Medline, Embase, en la red Española de Registros del Cáncer (REDECAN) y en la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) para definir la incidencia del CBC en España. Se incluyeron un total de 332 trabajos. La tasa de incidencia del CBC global cruda en España fue de 113,05 (95% intervalo de confianza [IC]: 89,03-137,08)/100.000 personas-año (para los estudios que emplean la metodología de los registros de cáncer con tumores confirmados histológicamente y contando uno solo por persona). La tasa de incidencia mediante criterios clínicos e histológicos, y contando tumores en lugar de personas, fue de 253,23 (95% IC: 273,01-269,45)/100.000 personas-año (3). Este dato se basa en el estudio realizado por Bielsa y colaboradores, el único estudio referido a nuestro ámbito (población de residentes en el Barcelonès Nord), en el que se contabilizan también CBC tratados sin confirmación histológica y tumores sucesivos en un mismo paciente (4).

## 1.2. PATOGENIA

### 1.2.1. Origen

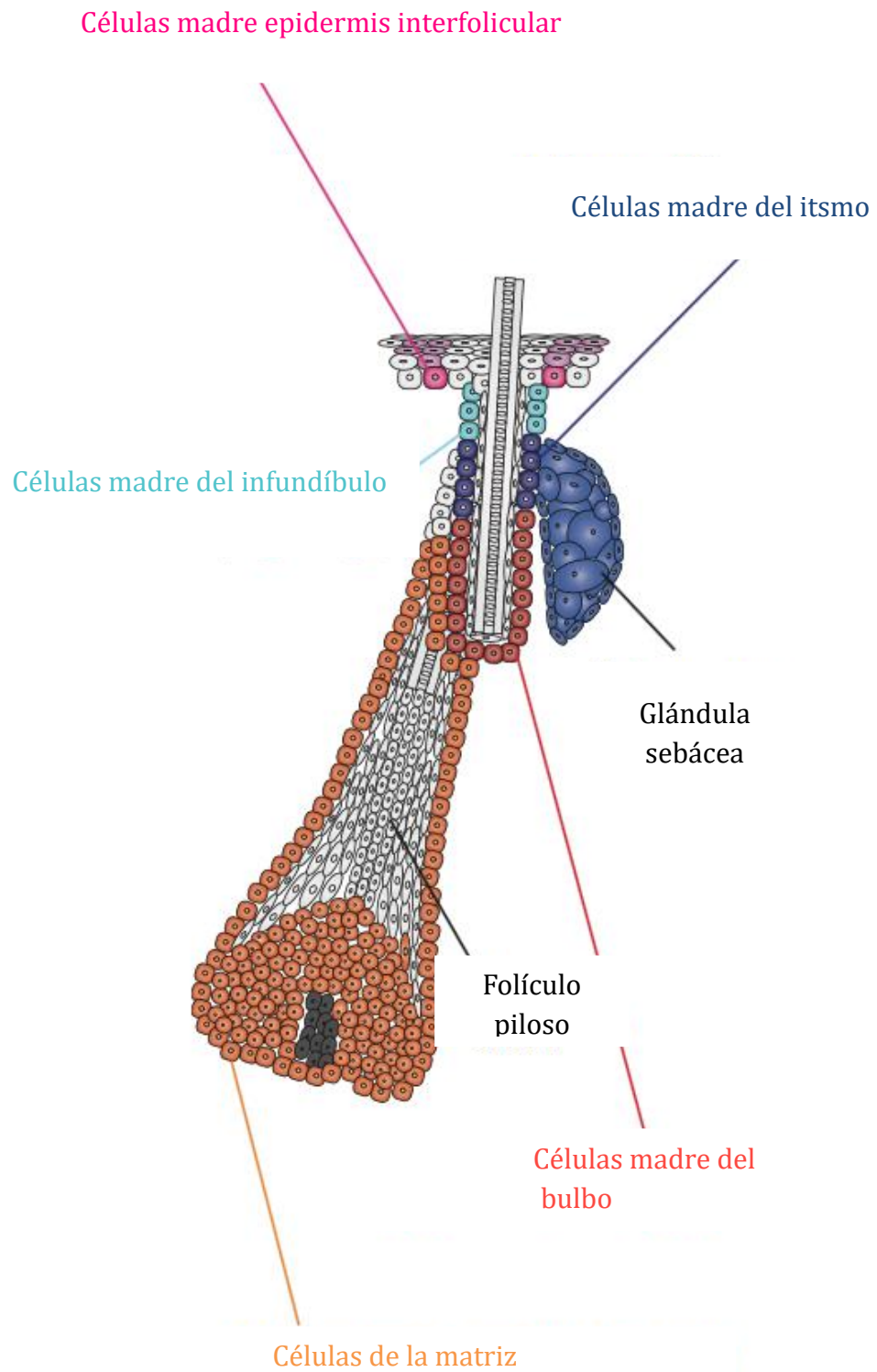
El origen preciso del CBC sigue siendo, hoy en día, motivo de controversia. Clásicamente se ha señalado que se originaría en las células madre del folículo piloso (5). Sin embargo, hay autores que sostienen que el CBC se origina de las células progenitoras de la epidermis interfolicular y ocasionalmente de la porción superior del infundíbulo. El principal trabajo que fundamenta esta teoría es el de Yousseff y colaboradores, que emplearon modelos murinos que expresaban un mutante de *Smoothed* (Smo) constitutivamente activado (SmoM2) en diferentes compartimentos celulares de la epidermis para determinar en qué compartimento la activación de la vía de señalización Hh inducía la formación del CBC. La activación de SmoM2 en las células madre de la protuberancia (en inglés, *bulge*) del folículo piloso no inducía la formación del tumor. Sin embargo, la activación de Smo2 en las células progenitoras residentes en la epidermis interfolicular y en la porción superior del infundíbulo sí que indujo la aparición de CBC (6,7). Este hallazgo fue inesperado, dado que había varios estudios previos con modelos murinos que señalaban su origen en las células madre de la protuberancia. Conviene destacar que en ninguno de estos estudios previos se indujo la activación de la vía Hh en las células madre de los diferentes compartimentos del folículo, con lo que resultaba imposible excluir de forma categórica la posibilidad de que la célula mutante apareciese en un determinado compartimento y solo cuando dicha célula migrase hacia otro compartimento del folículo el crecimiento tumoral se hiciese posible (8). Más adelante, Peterson y colaboradores rebatieron la teoría de Yousseff y colaboradores demostrando en modelos murinos con delección de *PATCHED 1* (*PTCH1*) que las diferentes células madre del folículo piloso podían ser el origen del CBC y no así las de la epidermis interfolicular (9).

Resulta interesante el estudio de Grachtchouk y colaboradores, en el que emplean modelos murinos con expresión variable de *GLI2ΔN* (activador de Gli2) para inducir la activación de la vía Hh controlando el momento en que se activa dicha vía con respecto al ciclo del folículo piloso, su nivel de activación y las poblaciones celulares en las que se inicia la activación. Concluyen que el

potencial de transformación maligna y los diferentes fenotipos de CBC están determinados por: a) la población celular diana en la que se inicia la activación de la vía, b) el momento del ciclo del folículo piloso en el que se produce la activación de la vía Hh y c) el grado de activación de ésta. Hallaron que hay múltiples compartimentos celulares en la piel con potencial de desarrollar CBC, pero el tipo histológico particular dependerá de las células en las que se activa la vía. Por ello, a pesar de que la activación de la vía Hh es suficiente para iniciar el tumor, el fenotipo de éste estaría influenciado por la célula de origen. Postulan que, en sus modelos murinos, los CBC nodulares se originan de las células madre en reposo del folículo piloso y los CBC superficiales de las células de la epidermis interfolicular. Afirman que estos hallazgos concuerdan con las variantes histológicas de CBC en humanos, donde los CBC superficiales se originarían en la epidermis, los nodulares en el folículo piloso y los CBC con diferenciación sebácea en las glándulas sebáceas. El nivel de activación de la vía Hh también resulta determinante para el desarrollo del CBC; modelos murinos con niveles bajos de  $GLI2\Delta N$  desarrollaban hamartomas basaloides y una activación intensa conducía a la formación de CBC nodulares (8).

Las teorías comentadas con anterioridad no explican la aparición de CBC en zonas corporales no pilosas, como el área genital y los pezones, hecho infrecuente pero descrito. Hay autores que defienden que estas formas poco habituales de CBC derivarían de las células madre del epitelio glandular (10,11).

**Figura 1.** Representación esquemática de la unidad pilosebácea y los diferentes compartimentos de células madre. Adaptada de Blanpain C (12).



### 1.2.2. Vía de señalización Hedgehog

La vía de señalización Hedgehog (Hh) o del erizo desarrolla un papel esencial en la organogénesis durante la embriogénesis en múltiples especies, ya que está implicada en la proliferación y diferenciación celulares, la transición epitelio-mesénquima (TEM) y el reordenamiento celular mediante cambios en la motilidad y adhesión tisular. En la edad adulta solo está activa en el folículo piloso y en las células madre, donde ejerce un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis tisular y en la reparación celular (13).

En 1980 aparece el primer artículo en el que se identifica el receptor Ptch durante el estudio embriogénico de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. La vía Hh resulta crucial para el desarrollo embrionario normal de *Drosophila* (14). La función anómala o mutación de las proteínas de esta vía de señalización conllevaba la aparición de larvas mutantes de *Drosophila* con un fenotipo corto y espiculado que recordaban a un erizo.

*Drosophila* tiene un único ligando de Hh, mientras que en vertebrados se han identificado tres ligandos Hh homólogos: Sonic Hh (Sh), Desert Hh (Dh) e Indian Hh (Ih), de los cuales el mejor conocido es el primero. El receptor de Hh en *Drosophila* es Ptch, una proteína de membrana con doce dominios transmembrana y del que hay dos homólogos en vertebrados Ptch1 y Ptch2. Ptch1 es el homólogo mejor conocido.

La vía de señalización Hh se inicia cuando cualquiera de los ligandos Hh se une, y por tanto activa la proteína supresora Ptch, que regula negativamente la vía. El sistema de transducción de la señal de Hh implica a Smo, una proteína con siete dominios transmembrana que es el regulador positivo de la vía. En mamíferos solo hay un gen *SMO*. En ausencia de los ligandos, Ptch reprime la actividad de Smo. Sin embargo, con la unión de los ligandos a Ptch, la inhibición sobre Smo cesa y éste a su vez activa los factores de transcripción asociados a glioma (Gli) a través de la represión del factor supresor Fused (SUFU).

Los cilios primarios están involucrados en numerosas vías de señalización, entre ellas la Hh. Se trata de cilios no móviles que contienen la mayoría de

las células de los vertebrados, constituidos por una protrusión de la membrana en la zona apical de las células polarizadas, que actúan como sensores de las señales extracelulares. Ptch se encuentra en cantidades abundantes en el cilio primario en ausencia de Hh y se elimina de éstos en presencia de Hh. Cuando se une el ligando, Ptch se mueve hacia fuera del cilio y Smo hacia dentro, activando los factores de transcripción Gli (15).

Los factores Gli son las principales moléculas efectoras de la vía. Se han identificado tres factores Gli homólogos: Gli1, Gli2 y Gli3. El factor Gli1 actúa como un activador transcripcional de los genes diana de Hh, Gli3 actúa como un potente supresor de la transcripción y Gli2 puede actuar como activador o supresor de la expresión génica dependiendo de modificaciones translacionales o postranscripcionales (16).

Hay otros componentes implicados en la activación de la vía Hh, especialmente en la regulación de la actividad de los factores Gli, además de SUFU, como la *kinesin family member 7* (KIF7), la proteína cinasa A (PKA), la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3 $\beta$ ) y la caseína cinasa 1 (CK1).

SUFU es un regulador negativo de la vía. Cuando la vía permanece inactiva los factores de transcripción Gli se encuentran secuestrados físicamente por SUFU, que evita su acumulación nuclear y la activación de los genes diana de la vía Hh. Si por el contrario la vía se activa y SUFU libera los factores Gli, éstos son trasladados al núcleo y activan la transcripción de genes diana.

Entre los genes diana de la vía Hh hay genes propios de la vía como *GLI1*, *PTCH1*, *PTCH2*, *hedgehog interacting protein (HHIP1)*, genes relacionados con la proliferación celular (*MYCN*, *CCND1*, *CCND2*, *CCNE*, *FOXM1*, *CCNB1*, *CDC25B*), con la TEM (*FOXC2*, *SNAI1*, *TWIST2*, *ZEB1*, *ZEB2*), con la red de señalización de células madre (*JAG2*, *FST*, *GREM1*, *BMP4*, *WNT2B*, *WNT5A*, *PDGFRA*), genes relacionados con la supervivencia celular (*BCL2*, *CFLAR*) y otros como *BMI1*, *LGR5*, *CD44*, *CD133*, *FOXF1*, *FOXL1*, *PRDM1* y *PTHLH* (17).

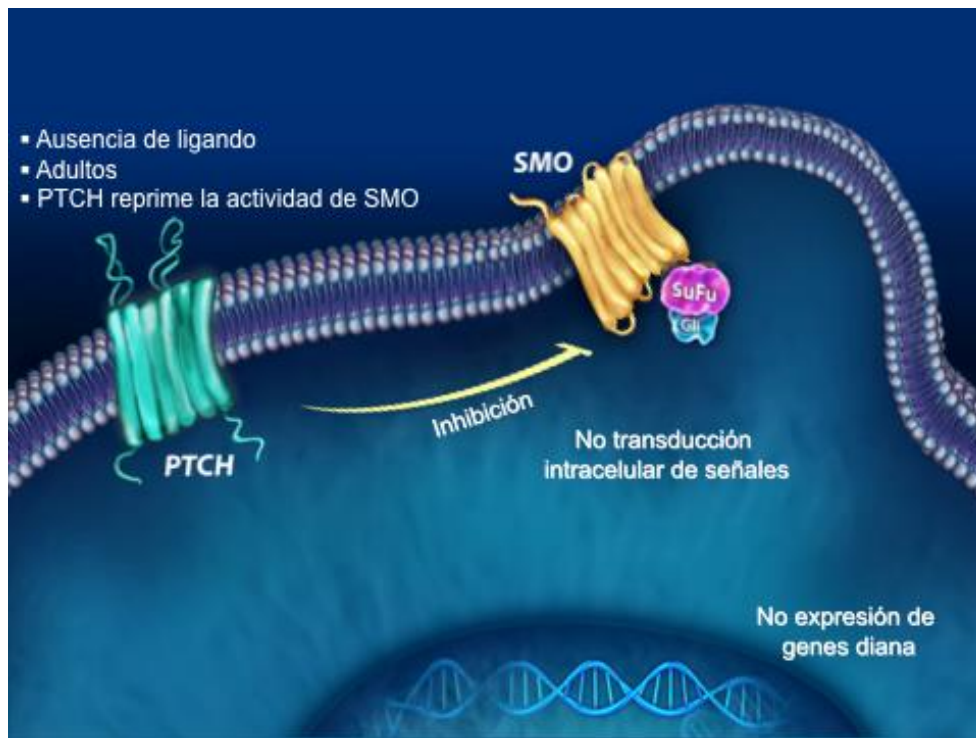
La importancia de la vía Hh en el desarrollo del CBC queda claramente de manifiesto en el síndrome del carcinoma basocelular nevoide o síndrome de

Gorlin (SG), descrito por Gorlin y Goltz en 1960 (18). Es una enfermedad autosómica dominante (AD) debida a mutaciones en el gen supresor tumoral *PTCH*, que está localizado en el cromosoma 9q22.3-q31. Esto condiciona una activación de la vía de señalización Hh que conlleva la aparición de múltiples CBC, “pits” palmo-plantares, anomalías en el desarrollo, queratoquistes odontogénicos mandibulares y otros tumores.

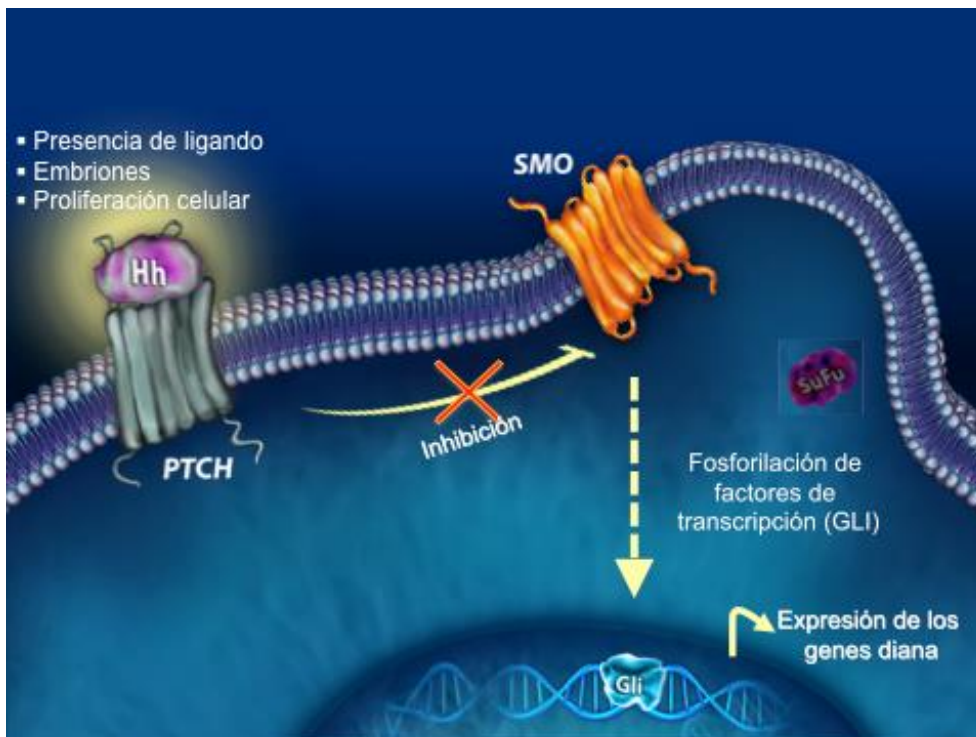
En todos los CBC esporádicos existen mutaciones adquiridas en la vía Hh, que permanece así constitucionalmente activada. En un 80-90% se trata de mutaciones inactivadoras de *PTCH1*, un 10-20% se deben a mutaciones activadoras de *SMO* y menos de un 1% son el resultado de mutaciones en *SUFU* y *PTCH2* (19–22).



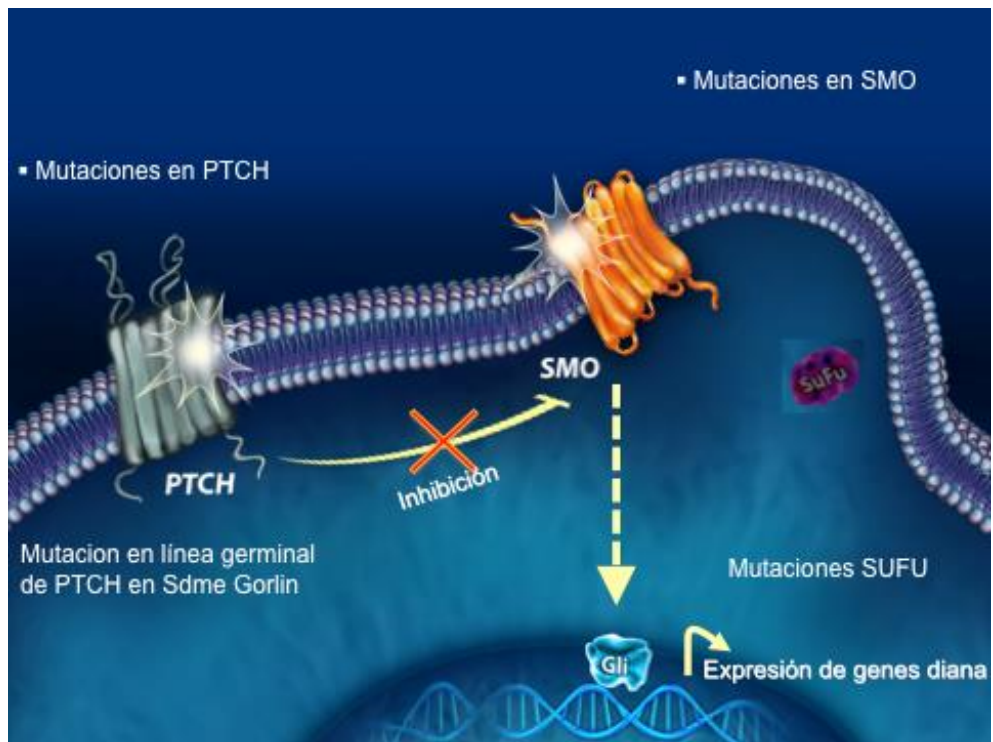
**Figura 2.** Vía de señalización Hedgehog inactiva en ausencia de ligando.



**Figura 3.** Vía de señalización Hedgehog activa en presencia de ligando.



**Figura 4.** Vía de señalización Hedgehog activa en el carcinoma basocelular.



### **1.2.3. Otras alteraciones genéticas en el carcinoma basocelular**

Es evidente que la activación aberrante de la vía de señalización Hh es necesaria para el desarrollo del CBC. Sin embargo, parece que pueden estar implicadas alteraciones en otras vías de señalización.

En primer lugar, existen interacciones entre la vía Hh y diversas vías de señalización como RAS/RAF/MEK/ERK, PI3K /AKT/mTOR, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), proteína cinasa C  $\alpha/\lambda$  (aPKC), BMP/TGF- $\beta$ , Wnt/ $\beta$ -catenina y Notch en el desarrollo y progresión del CBC (23,24). La relevancia de cada una de ellas es desconocida y cómo interaccionan entre sí (*crosstalk*) sigue siendo motivo de muchas investigaciones. Parece ser que las proteínas Gli, sobre todo Gli1, son un nexo crítico entre la vía Hh y otras vías de señalización en el cáncer. Sin embargo, no queda claro si la diana primaria de las vías oncogénicas sería Gli u otras proteínas de la vía como SUFU, que regulan la actividad de Gli.

#### **Vía RAS/RAF/MEK/ERK**

La vía de señalización RAS/RAF/MEK/ERK está implicada en la proliferación, crecimiento y supervivencia celulares. Se han identificado mutaciones y activaciones simultáneas de Hh y RAS/RAF/MEK/ERK en tumores de colon, pulmón, páncreas, ovario, leucemia y melanoma maligno (MM) (25,26). La activación de la vía RAS/RAF/MEK/ERK promueve el crecimiento tumoral y las metástasis en líneas celulares de meduloblastoma con activación de la vía Hh a pesar de la inhibición de Smo con LDE225. Así pues, la activación alternativa de esta vía elude la dependencia exclusiva del tumor de la vía Hh. Más aún, se postula que la activación de la vía RAS/MAPK desempeña un papel crucial en la transformación escamosa y resistencia adquirida de CBC tratados con inhibidores de Smo (27).

#### **PI3K/Akt/mTOR**

La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR también desempeña un papel crucial en numerosos aspectos del crecimiento, metabolismo, motilidad, proliferación, diferenciación, supervivencia celular y angiogénesis. Se conocen muchos factores de crecimiento y reguladores fisiológicos que la modulan. Su activación

anómala da lugar a una alteración de los mecanismos de control del crecimiento y supervivencia celulares. Existe interferencia entre las vías PI3K/Akt/mTOR y Hh a través de las proteínas Gli: PI3K regula la degradación de Gli2. La vía PI3K/Akt/mTOR está activada en el CEC y en el CBC, lo que sugiere su participación en la fisiopatogenia de ambos tumores. Sin embargo, no se conocen los mecanismos exactos de activación (28–30). Más aún, en situaciones en las que la vía Hh permanece inhibida de forma continuada, la vía PI3K se encuentra sobreactivada. Esta activación de PI3K/Akt/mTOR podría ser uno de los mecanismos de resistencia al tratamiento con inhibidores de Smo (31).

### **Vía del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR)**

El EGFR (también conocido como ErbB1) es un receptor tirosin cinasa que se encuentra mutado o sobreexpresado en diversos tumores como carcinomas y glioblastomas. La activación del EGFR promueve procesos tumorales mediante la regulación de la proliferación y supervivencia celulares, angiogénesis y metástasis a través de la activación de otras vías de señalización como SRC/FAK, STAT, MAPK, PI3K/AKT/mTOR y fosfolipasa C (25,32,33). Neil y colaboradores demostraron que la vía EGFR actúa de forma sinérgica con Gli1 y Gli2 para activar de forma selectiva la transcripción de un subgrupo de genes diana de Gli a través de la estimulación de la vía RAS/RAF/MEK/ERK (34). La vía del EGFR también coopera con la vía Hh y es un mediador crítico en el proceso de invasión en tumores con desregulación de esta vía. El tratamiento de líneas celulares de CBC en modelos murinos con gefitinib y ciclopamina reduce su proliferación y viabilidad más eficazmente que cualquiera de los dos fármacos en monoterapia (35,36).

### **Proteína cinasa C $\alpha$ (aPKC)**

La aPKC potencia la vía de señalización de Hh a través de la fosforilación y activación del factor Gli1. Es esencial para el funcionamiento máximo de la vía Hh. La aPKC está activada y sobreexpresada en tumores resistentes a inhibidores de Smo; tratamientos con inhibidores de aPKC disminuyen los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de Gli1 e inhiben el desarrollo de líneas celulares de CBC resistentes a ciclopamina (inhibidor de Smo). Por todo ello, aPKC es crítica en la progresión del CBC dependiente de la vía de

señalización Hh y se postula como una posible diana molecular para el tratamiento de tumores resistentes a inhibidores de Smo (37,38).

### **Wnt/ $\beta$ -catenina**

La vía de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina juega un papel decisivo en los procesos de regulación, diferenciación, proliferación y muerte celular. Colabora con la vía Hh en la morfogénesis del folículo piloso y sus ligandos son dianas conocidas de la vía de señalización Hh. Hay estudios que avalan el papel de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina en el desarrollo del CBC. Esta vía también está involucrada en otros tumores cutáneos; se han identificado mutaciones activadoras de  $\beta$ -catenina hasta en el 75% de los pilomatrixomas y la desregulación de la vía Wnt se ha vinculado a la progresión del MM (39,40). La actividad de esta vía depende de la concentración citoplasmática de  $\beta$ -catenina. En condiciones normales los niveles citoplasmáticos de  $\beta$ -catenina se mantienen bajos gracias a un proceso de degradación dependiente de ubiquitina-proteosoma. Salto-Tellez y colaboradores realizaron un estudio con *microarrays* tisulares de 75 muestras de CBC y 75 muestras de piel normal para analizar la expresión de  $\beta$ -catenina y RUNX3, efectores nucleares de las vías Wnt y BMP/TGF- $\beta$ , respectivamente. Demostraron que un 41% de los CBC tenían acumulación nuclear de  $\beta$ -catenina y un 100% de los CBC sobreexpresión de la proteína RUNX3 en el núcleo de las células tumorales. Este hallazgo sugiere que la vía Wnt estaría involucrada en la patogenia y progresión de algunos CBC; aún así, posiblemente no es un mecanismo primario en su desarrollo (39).

La proteína RUNX3 es un efector nuclear de la vía BMP/TGF- $\beta$  que tiene un papel supresor en diversos tumores (41). Sin embargo, está sobreexpresada en el CBC, MM y CEC, por lo que en estos tumores cutáneos actuaría como un oncogén y no como un supresor tumoral (42).

### **Notch**

La vía de señalización Notch tiene un papel importante durante el desarrollo embrionario y durante las diferentes etapas del desarrollo celular. Esta vía está formada por cuatro receptores Notch y numerosos ligandos de los grupos *Delta*, *Jagged* y *Serrate*. Hay una gran variedad de tumores asociados a alteraciones

en Notch, que puede actuar como supresor o promotor tumoral dependiendo del tipo celular y contexto (43,44). Nicolas y colaboradores realizaron un estudio con modelos murinos con deficiencia de Notch1 que vincula esta vía con el desarrollo de CCNM. La pérdida de Notch1 en la epidermis de los ratones dio lugar a niveles elevados y mantenidos de Gli2 y al posterior desarrollo de CBC. Así pues, la pérdida de Notch1 en la piel conlleva un incremento en la actividad de la vía Hh y, por tanto, mayor susceptibilidad para desarrollar CBC. Esto sugiere que, en este contexto, Notch1 funcionaría como supresor tumoral (44). De hecho, estudios secuenciando el exoma de CBC esporádicos han demostrado mutaciones en los genes *NOTCH1* y *NOTCH2* en algunos tumores (45). Otra publicación reciente corrobora la inhibición de la vía Notch en el CBC, permitiendo que las células basales epidérmicas escapen de los mecanismos de regulación y proliferación habituales (43).

### **BMP/TGF- $\beta$**

La TEM es un proceso coordinado que aparece durante el desarrollo embrionario y también un fenómeno patogénico en el cáncer y la fibrosis. Las células epiteliales sometidas a este proceso pierden la expresión de E-cadherina y otras moléculas de adhesión. En su lugar, desarrollan un citoesqueleto celular mesenquimal y adquieren motilidad y propiedades invasivas. El TGF- $\beta$  es un potente inductor de la TEM (46).

TGF- $\beta$  desempeña un papel en la carcinogénesis de tumores cutáneos como el CEC (47). Hay varios estudios que también analizan la expresión de TGF- $\beta$  y proteínas Smad en el CBC mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ), hibridación *in situ* y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Se ha demostrado la sobreexpresión de TGF- $\beta$ 1 en el estroma desmoplásico del CBC en comparación con muestras de piel normal (48). Schmidt y colaboradores analizaron y compararon el patrón de expresión de ARNm de las tres isoformas de TGF- $\beta$  de mamíferos (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 y TGF- $\beta$ 3) en muestras de CBC mediante hibridación *in situ*. En la mayoría se evidenció un incremento de la expresión de TGF- $\beta$ 1 y del receptor TGF- $\beta$ II en el estroma de los CBC en comparación con las muestras de piel normal (49). Mediante técnicas IHQ también se ha demostrado la acumulación de TGF- $\beta$ 1 en las

células del estroma de algunos CBC (50); por el contrario, otros investigadores han observado niveles disminuidos de TGF- $\beta$ 1 en el CBC (51). Utilizando técnicas de RT-PCR también se han detectado niveles significativamente más elevados de TGF- $\beta$  en el CBC en comparación con muestras de piel normal (52). En modelos murinos es crucial el papel del TGF- $\beta$ 2 para el desarrollo de tumores mediados por la vía Hh. Todos estos estudios sugieren que la vía de señalización del TGF- $\beta$  desempeña un papel en la patogenia del CBC. Sin embargo, a pesar de que esta vía resulta crítica en la carcinogénesis mediada por la vía Hh, parece que no es suficiente (53).

### **Proteínas Winged-helix/FOX**

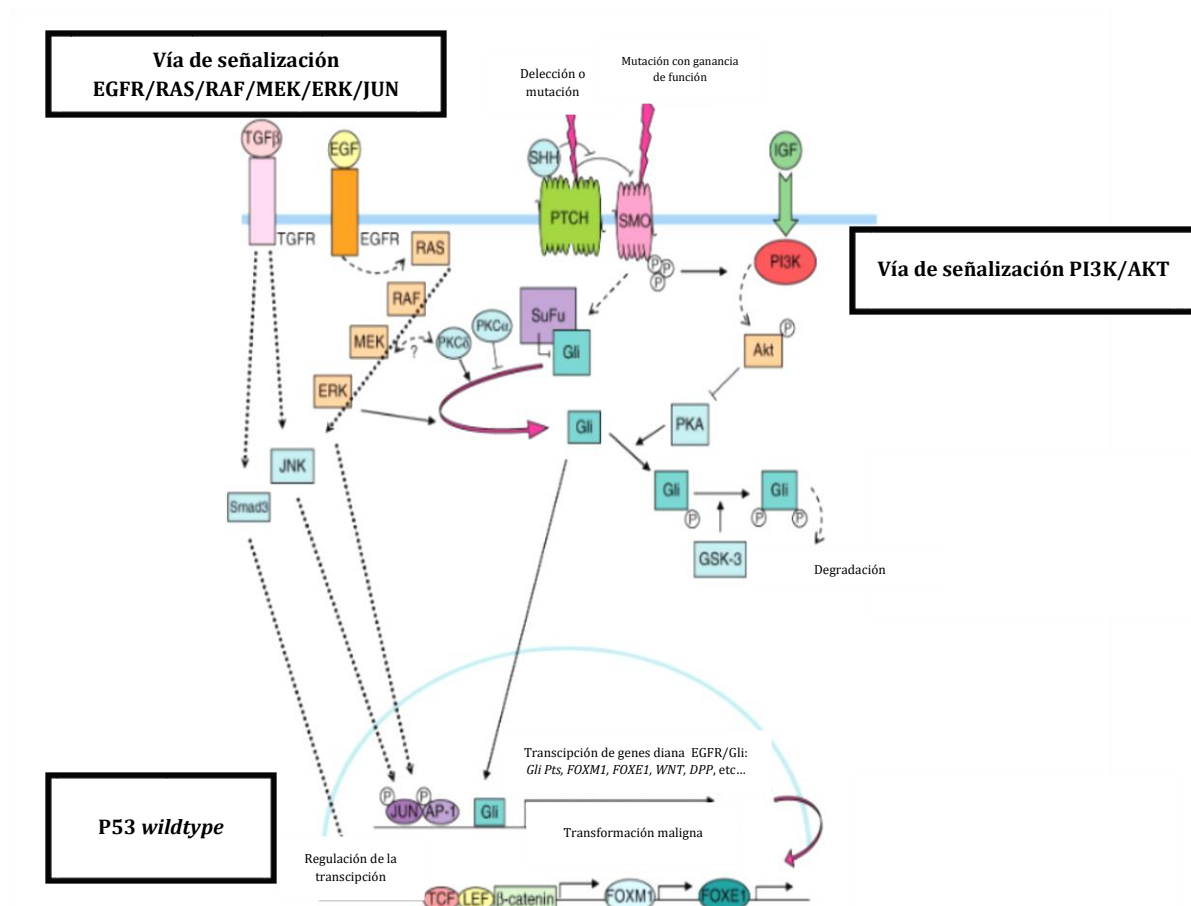
Las proteínas Winged-helix/FOX (proteínas de la familia FOX) constituyen una gran familia de factores de transcripción que desarrollan un papel importante en la regulación de la expresión de genes involucrados en la proliferación, crecimiento, diferenciación, longevidad y transformación celulares. Hay estudios que demuestran que determinados genes de la familia FOX (*Foxd2*, *Foxa2*, *Foxf1*) son dianas directas de la vía de señalización Hh durante el desarrollo embrionario de ratones (54). Se ha demostrado mediante RT-PCR que FOXM1 está significativamente sobreexpresada en el CBC y no en el CEC, piel normal y cultivos de queratinocitos. Esto sugiere que la expresión de FOXM1 es característica del CBC y su sobreexpresión no es consecuencia de un incremento en la proliferación celular (55). Incluso se ha postulado que *FOXE1* podría ser un gen diana de Gli2 en queratinocitos humanos (56).

### **Alteración en p53**

El gen *P53*, localizado en el cromosoma 17p13.1, codifica la proteína supresora tumoral p53 y es uno de los genes mutados con mayor frecuencia en los cánceres humanos. Se le conoce como el "guardián del genoma" puesto que interviene en el mantenimiento de su integridad (57). La acumulación nuclear de p53 produce un bloqueo transitorio del ciclo celular en G1, justo antes de iniciar la duplicación del ADN, permitiendo su reparación. Si la célula no es capaz de reparar el ADN, p53 induce la muerte celular. Las células que contienen p53 mutada no son capaces de mantener su integridad genética dando como resultado clones que van acumulando mutaciones gradualmente.

Hasta un 30-50% de CBC tienen mutaciones en p53 y más de la mitad de éstas son específicamente inducidas por la RUV (C→T o CC→TT) (58). Dichas mutaciones se han identificado en CBC esporádicos y de pacientes con xenoderma pigmentoso (XP) (59,60). Se ha sugerido una correlación positiva entre la agresividad histológica del CBC y la sobreexpresión nuclear de p53 determinada mediante técnicas IHQ (61). Sin embargo, las mutaciones en p53 pueden ser un evento secundario, no necesario para el inicio ni el desarrollo tumoral (62).

**Figura 5.** Esquema de la interacción de la vía de señalización Hedgehog con otras vías. Adaptado de Dreier J (63).





### 1.3. FACTORES DE RIESGO

#### Radiación ultravioleta (RUV)

La RUV es parte del espectro electromagnético emitido por el sol e incluye un rango de longitud de onda de 100 a 400 nm: la RUV-C (100-280 nm), RUV-B (280-315 nm) y RUV-A (315-400 nm). El oxígeno y el ozono de la atmósfera absorben casi por completo la RUV-C y la mayor parte de la RUV-B (aproximadamente el 90%) (64). La epidermis absorbe la mayor parte de la RUV irradiada sobre la piel; solo la radiación con longitudes de onda mayores alcanza la dermis.

La RUV-A produce hiperplasia epidérmica, induce aparición de células de quemadura en la epidermis (*sunburn cells* o queratinocitos dañados por la RUV) y aumenta la expresión de p53 en los queratinocitos (65,66). Es menos mutagénica e induce más estrés oxidativo que la RUV-B, inhibe la reparación del ADN e induce la síntesis de metaloproteinasas (67). La RUV-B tiene mayor capacidad mutagénica y es la principal responsable del eritema y quemadura solares y del cáncer cutáneo (68).

Los sistemas de reparación del ADN desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la integridad del genoma. La absorción de los fotones de la RUV por el ADN de las células de la epidermis induce la formación de fotoproductos o dímeros de pirimidina. En las células normales estos fotoproductos son eliminados mediante mecanismos de escisión y reparación de nucleótidos mediados por p53. Sin embargo, si estos fotoproductos no son reparados y persisten, se transmiten durante la replicación celular como mutaciones C→T o CC→TT (*UV fingerprints*), constituyendo la característica más destacada de la mutagénesis inducida por la RUV.

La fotocarcinogénesis involucra la disfunción de genes supresores como *P53*. La proteína p53, como se ha comentado previamente, está involucrada en la reparación del ADN y en la apoptosis de células con daño excesivo en el mismo. La RUV induce alteraciones genéticas en el gen supresor tumoral *P53*, de manera que los fotoproductos no reparados en dicho gen se convierten en mutaciones que inician el proceso de carcinogénesis: los queratinocitos con

mutaciones en *P53* que siguen expuestos al sol y desarrollan nuevas mutaciones por la RUV tienen menos capacidad para ser reparados o eliminados por apoptosis ante esta falta de función de p53 (69).

El principal factor de riesgo para el desarrollo de CBC es la exposición a la RUV, sobre todo por razones sociales o de ocio, con un patrón de exposición intermitente (70). De hecho, la mayoría de CBC aparecen en zonas corporales expuestas al sol (62). La exposición a la RUV, sobre todo durante la infancia y adolescencia, se asocia con un mayor riesgo (71,72). Sin embargo, la aparición de CBC en zonas corporales no fotoexpuestas sugiere que hay otros factores de riesgo implicados en su desarrollo.

También se ha apuntado que el patrón de exposición a la RUV es determinante del tipo histológico de CBC que se desarrollará; la exposición crónica parece involucrada en los CBC nodulares, mientras que la intermitente está más relacionada con los CBC superficiales (73).

Además, la RUV tiene efectos inmunosupresores dosis-dependientes que pueden ser determinantes en la patogenia del CBC (74). Este apartado será comentado con más profundidad en el apartado 3.1. RUV e inmunosupresión.

### **Pigmentación cutánea**

Las personas con piel clara, ojos claros, pelo rubio o pelirrojo tienen más riesgo de desarrollar CBC (75,76).

El gen del receptor de la melanocortina 1 (*MC1R*) es el principal determinante genético de la pigmentación cutánea y del pelo. Está localizado en una terminación telomérica del cromosoma 16q24.3 y codifica para el receptor MC1R acoplado a la proteína G (GPCR), que está formada por 7 dominios transmembrana. En respuesta a la RUV se secretan la hormona estimulante de los melanocitos  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH), la hormona adenocorticotropa (ACTH) y péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC). Éstos estimulan la expresión del receptor por los melanocitos de la piel, activando la adenilato ciclasa. El aumento de los niveles de AMP cíclico (AMPc) activa la PKA y aumenta la transcripción del factor de transcripción asociado a la microftalmía (*microphthalmia transcription factor*, MITF). Dicho factor es responsable de la transcripción de varios genes

(incluidos *TYR* y *TYRP1*), que a su vez participan en la regulación de la síntesis de eumelanina y feomelanina, determinantes de la pigmentación de la piel (77).

El gen *MC1R* es altamente polimórfico; se han identificado más de 100 variantes no sinónimas (78). Análisis funcionales de algunas de estas variantes han revelado la pérdida parcial de la habilidad del receptor para estimular la vía de AMPc, lo que conlleva un cambio en la síntesis de eumelanina a feomelanina (79). La feomelanina se asocia con el fenotipo RHC (del inglés “*red hair color*”, es decir, pelo pelirrojo, lentigos actínicos, elevada tendencia a quemarse tras la exposición al sol y baja capacidad de broncearse) (80). Se han identificado variantes en el gen *MC1R* que se asocian de forma significativa e independiente con el riesgo de desarrollar CBC, lo que sugiere que también contribuiría en la patogenia del CBC a través de mecanismos no relacionados con la pigmentación (81,82). El primer estudio de asociación del genoma completo realizado en pacientes con CBC tuvo lugar en 2008, y desde entonces se han llevado a cabo 6 en total. Se han hallado 17 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) distintos en 16 regiones cromosómicas diferentes. Las razones de probabilidades (*odds ratio*, OR) estudiadas son pequeñas, entre 1,15 y 1,55, salvo para variantes de *P53*, que son de 2,16 (83–88).

### **Radiación ionizante (RI)**

El cáncer de piel fue el primer tipo de cáncer documentado asociado a la exposición a la RI, siete años después del descubrimiento de los rayos X.

Se han descrito varios mecanismos por los cuales las RI son capaces de inducir la carcinogénesis. El efecto más deletéreo sobre el ADN es la inducción de rupturas en la doble cadena que conllevan la aparición de deleciones (89). Además, se ha documentado que individuos expuestos a altas dosis de RI presentan con mayor frecuencia pérdida de heterocigosidad en el locus del gen *PTCH*, en comparación con individuos expuestos a dosis bajas. Esto sugiere que el gen *PTCH* es una diana clave en el desarrollo de CBC tras la exposición a RI. Por otro lado, los CBC de individuos expuestos a altas dosis de RI tienen con mayor frecuencia mutaciones en *p53* que los CBC de la población control (90). Sin embargo, hay otros estudios que contradicen estos hallazgos: Tessone y colaboradores analizaron mediante *arrays* de ADN CBC de pacientes tratados

con RT y CBC de pacientes control y no hallaron diferencias genéticas entre los tumores de ambos grupos (91).

Estudios epidemiológicos realizados tras la detonación de las bombas de Hiroshima y Nagasaki pusieron de manifiesto un incremento dosis-dependiente del riesgo de desarrollar CBC en individuos expuestos a RI hasta 50 años después de la exposición, especialmente en aquellos en los que la exposición ocurrió en edades tempranas (92).

La literatura recoge múltiples artículos que describen un riesgo incrementado de desarrollar CBC en mineros que han trabajado en minas de uranio, en radiólogos y en individuos tratados con radioterapia (RT) por *tinea capitis* o por tumores malignos (93–95).

Es posible que la RUV aumente el efecto carcinógeno de la RI sobre la piel. Hay estudios que demuestran mayor riesgo atribuible por Gy de desarrollar tumores cutáneos en la piel expuesta a la RUV en comparación con áreas corporales no fotoexpuestas (96). Sin embargo, los datos son contradictorios dado que otro estudio con la misma cohorte demostró que el exceso absoluto de riesgo de CBC por unidad corporal no difería entre zonas expuestas y no fotoexpuestas a la RUV (97).

### **Arsénico**

El arsénico inorgánico es un contaminante natural presente en el agua, tierra, comida y aire. Durante años se ha utilizado como agente medicinal, quimioterápico, pesticida y veneno. La exposición a arsénico inorgánico presente en el medio ambiente no suele ser perjudicial para la salud, salvo en determinadas áreas geográficas cercanas a fuentes naturales que contienen niveles elevados (98). Sus efectos en el organismo son dosis-dependientes y pueden ser agudos o crónicos. Se han propuesto varios mecanismos de toxicidad: el más estudiado es la formación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, que inducen daño citogenético, inflamación y carcinogénesis (99). También ejerce un efecto genotóxico al inhibir la reparación del ADN, alterar la transducción intracelular y extracelular de señales e inducir la proliferación celular (98).

Existe suficiente evidencia científica para afirmar que la exposición crónica a bajas cantidades de arsénico induce la aparición de tumores de vejiga, pulmón y piel (100). En individuos expuestos de forma crónica a arsénico, las manifestaciones cutáneas son las más frecuentes y suelen ser las primeras en aparecer. Los tumores cutáneos inducidos por el arsénico con frecuencia aparecen en áreas no fotoexpuestas y son tanto CBC como CEC, histológicamente indistinguibles de los que aparecen en otros contextos. Otras manifestaciones cutáneas inducidas por el arsenicismo crónico son hiperqueratosis, sobre todo palmo-plantares, e hiperpigmentación cutánea más intensa en el tronco (98,101,102).

### **Cicatrices**

En 1986 Noodleman y Pollack señalaron la posible relación entre el desarrollo de CBC y la existencia de traumatismos previos (103). Hay varias publicaciones, generalmente de casos aislados, sobre CBC que aparecen sobre cicatrices traumáticas, quirúrgicas, quemaduras y secundarias a vacunas (104–107).

### **Vitamina D**

La RUV-B cataliza la conversión de 7-dehidrocolesterol (también llamado provitamina D3) a previtamina D3 en los queratinocitos, que es el primer paso en la formación de la vitamina D3. Luego, la vitamina D3 es excretada y viaja a través del torrente sanguíneo hasta el hígado, donde se hidroxila para formar el compuesto 25-hidroxivitamina D3 o 25(OH)D3 o calcidiol. El calcidiol es posteriormente hidroxilado en el riñón a la forma más activa de vitamina D que es la 1,25-hidroxivitamina D3, calcitriol o 1,25(OH)2D.

En la literatura se pueden encontrar diversos estudios donde se intenta determinar qué relación existe entre los niveles de vitamina D y distintos tipos de cáncer. En un metaanálisis reciente donde se investiga la relación entre la vitamina D y la evolución de distintos tipos de cáncer, concluyen que niveles elevados de vitamina D se asocian a menor riesgo de muerte (26%) y menor riesgo de progresión de la enfermedad (16%) (108).

Con respecto al CCNM los datos son contradictorios: hay estudios que relacionan los niveles de vitamina D con el riesgo de desarrollar CCNM. Tang y

colaboradores determinaron los niveles de 25(OH)vitamina D en pacientes caucásicos y hallaron que niveles elevados se asociaban con un descenso en el riesgo de desarrollar CCNM (109). Sin embargo, en otro estudio se demostró que niveles elevados de 25(OH)vitamina D se asociaban con un leve incremento en el riesgo de desarrollar CBC (110). Eide y colaboradores también hallaron que niveles basales más elevados de 25(OH)vitamina D estaban significativamente asociados a un incremento en el riesgo de desarrollar CCNM (CBC y CEC) (111). Conviene señalar que resulta difícil comparar los estudios publicados dado que se han realizado en áreas geográficas distintas, con metodologías diferentes y en algunos no se diferencia entre CBC y CEC. Además, la relación entre la vitamina D y el CBC es compleja debido a la interrelación de ambos con la RUV.

Por otro lado, hay estudios que demuestran que la vitamina D inhibe la vía de señalización Hh (112). Postulan que Ptch1 podría translocar la provitamina D3 al medio extracelular y ésta actuaría como antagonista de Smo en la misma célula o en células vecinas (113).

### **Inmunosupresión y carcinoma basocelular en el paciente receptor de trasplante de órgano sólido (RTOS)**

Este apartado será comentado en el apartado 3.2.

#### **Síndromes hereditarios**

##### **- Síndromes hereditarios con carcinoma basocelular como característica principal**

En la **tabla 1** se describen los principales síndromes hereditarios con CBC como característica principal (114–128). En la **tabla 2** se describen los criterios diagnósticos de SG.

##### **- Síndromes hereditarios con carcinoma basocelular como característica secundaria**

En la **tabla 3** se describen los principales síndromes hereditarios con CBC como característica secundaria (129–168).

**Tabla 1.** Síndromes hereditarios con carcinoma basocelular como característica principal.

<b>Enfermedad</b>	<b>Herencia</b>	<b>Gen (es)</b>	<b>Manifestaciones cutáneas adicionales</b>	<b>Manifestaciones extra-cutáneas principales</b>	<b>Neoplasias asociadas principales</b>
SG	AD	<i>PTCH1, PTCH2 y SUFU</i>	Quistes epidérmicos, de milio, “pits” palmo-plantares	Calcificaciones de la hoz del cerebro, fascies tosca, macrocefalia, queratoquistes odontogénicos, malformaciones orofaciales y esqueléticas	Meduloblastomas, rabdomiosarcomas
Síndrome de Bazex-Dupré-Christol	LX	<i>UBE2A</i>	Hiperpigmentación en flexuras, atrofodermia folicular, hipohidrosis, hipotricosis, quistes de milio	No	Tricoepiteliomas
Síndrome de Rombo	AD	Desconocido	Eritema acral, atrofodermia vermiculada, quistes de milio, telangiectasias, hipotricosis	No	Tricoepiteliomas

XP	AR	<i>XPA-XPG, POLH</i>	Queratosis/queilitis actínicas, lentigos, atrofia, fotosensibilidad, telangiectasias, hipo/hiperpigmentación moteada	Retraso mental y del desarrollo, anomalías oculares, fotofobia, neuropatía periférica	MM, CEC, tumores cerebrales y viscerales
Hamartomas foliculares basaloides múltiples	AD	<i>PTCH</i>	Comedones, hipohidrosis, hipotricosis, quistes de milio	No	No
AD: herencia autosómica dominante, AR: herencia autosómica recesiva, XL: herencia ligada al cromosoma X.					



**Tabla 2.** Criterios diagnósticos de síndrome de Gorlin.

<b>CRITERIOS MAYORES</b>	<b>CRITERIOS MENORES</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 CBC en &lt;20 años o número excesivo de CBC para la exposición solar y fototipo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Costillas bífidas, fusionadas, o marcadamente expandidas</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Queratoquistes odontogénicos mandibulares histológicamente confirmados en &lt;20 años</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Macrocefalia</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• “Pits” palmares o plantares</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Malformaciones congénitas: fisura labial o palatina, fascies tosca, hipertelorismo moderado o severo, estrabismo, cataratas, coloboma</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Calcificación lamelar de la hoz del cerebro</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Otras alteraciones esqueléticas: deformación de Sprengel, deformación pectoral marcada, sindactilia</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Meduloblastoma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anomalías radiológicas: puente en silla turca, anomalías vertebrales (hemivértebras, fusión o elongación de los cuerpos vertebrales), defectos de modelaje de manos y pies, radiolucideces en forma de llamas en manos o pies</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Familiar de primer grado con SG</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibromas cardíacos / ováricos</li> </ul>
<p>Para el diagnóstico de SG se precisa el cumplimiento de 2 criterios mayores o 1 criterio mayor y 2 menores (121).</p>	

**Tabla 3.** Síndromes hereditarios con carcinoma basocelular como característica secundaria.

Enfermedad	Herencia	Gen (es)	Manifestaciones cutáneas principales	Manifestaciones extra-cutáneas principales	Neoplasias asociadas principales
<i>Síndromes con replicación/repación defectuosa del ADN</i>					
<b>Síndrome de Bloom</b>	AR	<i>BLM/RECQL3</i>	Máculas café con leche, fotosensibilidad, telangiectasias		Neoplasias hematológicas, colorrectales, laringe, mama
<b>Síndrome de Rothmund-Thomson</b>	AR	<i>RECQL4</i>	Hipotricosis, distrofia ungueal, queratodermia palmo-plantar, fotosensibilidad, poiquilodermia, alteraciones dentales	Cataratas, retraso crecimiento, mielodisplasia, osteoporosis, hipoplasia/agenesia rótula, defectos congénitos del radio	CEC, osteosarcomas
<b>Síndrome de Muir-Torre</b>	AD	<i>MSH2, MSH1</i>	Adenoma sebáceo, epiteloma sebáceo, queratoacantoma		Carcinoma sebáceo, adenocarcinoma colorrectal, tumores de endometrio, ovario, páncreas, hepatobiliares, uroteliales, mama pulmón

<b>Síndrome de Werner</b>	AR	<i>WRN/RECQL2</i>	Atrofia, calcificaciones, hiperqueratosis plantar, arrugas periorcarias y peribucales	Talla baja, fascies de pájaro, hipogonadismo, cataratas, diabetes, atrofia muscular	MM, (osteosarcomas)
<b>Síndromes con tumores anexiales cutáneos</b>					
<b>Síndrome de Brooke-Spiegler</b>	AD	<i>CYLD1</i>	Cilindromas múltiples, tricoepiteliomas, espiradenomas		Adenomas de células basales, adenocarcinomas de glándulas salivales
<b>Síndrome de Schöpf-Schultz-Passarge</b>	AD o AR	<i>WNT10A</i>	Hipotricosis, hipo u oligodontia, distrofia ungueal, queratodermia palmo-plantar, telangiectasias, hidrocistomas apocrinos palpebrales		Tumor infundibular folicular, poroma ecrino, siringofibroadenoma ecrino maligno, hidrocistoma ecrino, CEC
<b>Síndrome de Cowden</b>	AD	<i>PTEN</i>	Queratosis acrales y palmo-plantares, fibromas cutáneo-mucosos, triquilemomas, manchas café con leche, lipomas	Fibromas mamarios, enfermedad de Lhermitte-Duclos, macrocefalia, alteraciones tiroideas	Cáncer de mama, ovario, tiroides, útero, pólipos hamartomatosos gastrointestinales

<b>Síndromes con inmunodeficiencia</b>					
<b>Síndrome hipoplasia cartilago-pelo</b>	AR	<i>RMRP</i>	Hipotricosis, alopecia	Talla baja, extremidades cortas, arqueamiento del fémur, alteraciones osteocondrales, defectos variables en la inmunidad celular	Linfoma no Hodgkin
<b>Epidermodisplasia verruciforme</b>	AR (AD, XL)	<i>EVER1 (TMC6)</i> <i>EVER2 (TMC8)</i>	Máculas descamativas hipo e hiperpigmentadas, pápulas verrugosas y queratosis seborreica-like		CEC
<b>Síndromes con alteraciones en la síntesis de melanina</b>					
<b>Albinismo oculocutáneo</b>	AR	<i>TYR, OCA2, TYRP1, SLC45A2, SLC24A5, C10ORF11</i>	Hipopigmentación cutánea, del pelo e iris	Fotofobia, disminución agudeza visual, estrabismo, nistagmo	CEC, MM
<b>Síndrome de Hermansky-Pudlak</b>	AR	<i>HPS1, AP3B1, HPS3, HPS4, HPS5, HPS6 DTNBP1, BLOC1S3, BLOC1S6</i>		Diátesis hemorrágica, fibrosis pulmonar, colitis granulomatosa, inmunodeficiencia, estrabismo, nistagmo, disminución de la agudeza visual	

<b>Síndromes del nevo epidérmico</b>					
<b>Síndrome de Schimmelpenning</b>			Nevos sebáceos de distribución blaschkoide	Anomalías esqueléticas (displasia de cadera, dismorfia facial), oculares (coloboma, anomalías del nervio óptico), del sistema nervioso central (hemimegalocéfalia, defectos en la migración neuronal, agenesia del cuerpo calloso, malformación de Dandy-Walker y malformaciones vasculares cerebrales)	
<b>Facomatosis pigmentoqueratósica</b>			Nevos epidérmicos o sebáceos extensos y nevos de spilus	Hemiatrofia, disestesia, hiperhidrosis segmentarias, retraso mental, convulsiones, sordera, ptosis palpebral, estrabismo	

#### 1.4. VARIANTES CLÍNICAS

Se distinguen varias formas de presentación del CBC: nodular, superficial e infiltrante/morfeiforme.

- El **CBC nodular** es la forma más frecuente. Se trata de pápulas o nódulos perlados con telangiectasias, de tamaño variable y bordes bien definidos. Pueden presentar ulceración o costras en el centro. Suelen estar localizados en zonas fotoexpuestas de la cara.
- El **CBC superficial** se presenta como una mácula o una placa eritematosa y descamativa, a veces con un aspecto clínico inespecífico y otras con una superficie brillante característica. La localización más frecuente es el tronco.
- El **CBC infiltrante/morfeiforme** se manifiesta como placas induradas blanquecinas, pálidas, con una superficie ligeramente brillante y con límites imprecisos, que en ocasiones remedan cicatrices. Su comportamiento infiltrativo es especialmente preocupante en zonas periorificiales (perioculares, perinasal y alrededor del conducto auditivo externo), donde puede requerir procedimientos quirúrgicos complejos y mutilantes para su curación.

Los CBC también pueden estar pigmentados, sobre todo las formas nodulares y superficiales. La presencia de pigmento no tiene valor pronóstico. En ocasiones se ulceran, especialmente los infiltrantes (*ulcus rodens*).

Por orden de frecuencia el 80% de los CBC asientan en la cara y cuello, y el 15% en el tronco, seguido de las extremidades (2).

La presencia de un CBC supone un factor de riesgo para el desarrollo de más CBC: el riesgo acumulado a los 3 años varía entre un 33% y 70% (riesgo medio de 44%) (169).

## 1.5. VARIANTES HISTOLÓGICAS

El CBC, a diferencia del CEC, se suele clasificar atendiendo al patrón morfológico y no al grado de diferenciación celular. Ciertos subtipos histológicos, incluidos en el grupo de CBC de alto riesgo, están asociados a un mayor riesgo de extensión subclínica, extirpación quirúrgica incompleta, recurrencia y comportamiento más agresivo. En este grupo incluimos los tipos histológicos morfeiforme, infiltrante, micronodular y basoescamoso (170). Dentro del grupo de CBC de bajo riesgo incluimos los tipos histológicos nodular y superficial (que se corresponden con las formas clínicas nodular y superficial, respectivamente). En ocasiones algunos CBC muestran patrones histológicos mixtos (171).

Los CBC se componen de islotes o nidos de células basaloides, con una disposición en empalizada en la periferia y aleatoria en el interior. Las células tumorales presentan un núcleo hipercromático con citoplasma relativamente pequeño y mal definido. La mayoría de CBC tienen conexión evidente con la epidermis suprayacente o con los folículos pilosos (epitelio folicular). En ocasiones puede verse ulceración. Los islotes de células tumorales están rodeados por un estroma diferente al de la dermis normal. Habitualmente existe un infiltrado inflamatorio celular variable, principalmente compuesto de LT, la mayoría CD4+. Hasta en un 20% de los tumores se observa regresión focal (1).

Se han descrito múltiples subtipos histológicos:

1. El **CBC nodular o sólido** es la variante histológica más frecuente y supone aproximadamente el 70% de todos los CBC. Se compone de islotes de células basaloides que suelen ser grandes, en la dermis papilar o reticular. Con frecuencia se observan hendiduras o grietas denominadas “artefactos o espacios de retracción” alrededor de los nidos tumorales. Las figuras de mitosis y las células tumorales apoptóticas son poco frecuentes. Algunos CBC nodulares presentan formas histológicas mixtas superficiales y micronodulares (171).

2. El **CBC superficial** se caracteriza por la existencia de una proliferación de células basaloides atípicas que se disponen en empalizada confinadas a la dermis papilar y que pueden afectar los folículos pilosos. Con frecuencia se pueden observar espacios de retracción. Es poco frecuente encontrar figuras de

mitosis y células tumorales apoptóticas. Aproximadamente el 10-15% de CBC son de variante superficial (170). En ambas formas, superficial y nodular, es frecuente observar elastosis solar en la dermis peritumoral.

3. El **CBC micronodular** clínicamente es indistinguible de la variante nodular. Histológicamente presenta islotes de células similares a los del CBC nodular pero de menor tamaño, con una distribución más dispersa, asimétrica que se expanden hacia la dermis y en ocasiones hasta el tejido celular subcutáneo. La retracción peritumoral del estroma es poco frecuente. Los CBC micronodulares tienen mayor incidencia de recurrencia local que los nodulares (172).

Cualquier variante de CBC puede estar pigmentada. Las formas nodular, superficial y micronodular son las que se presentan pigmentadas con mayor frecuencia: se puede observar pigmentación melánica de las células tumorales y macrófagos cargados de melanina en el estroma adyacente (173).

4. El **CBC infiltrante** representa hasta el 5% del total de CBC (174). Presenta nidos celulares angulosos, de tamaños irregulares o espiculados, con un patrón de crecimiento más infiltrativo que expansivo (175). Característicamente los islotes están formados por grupos de 5 a 8 células y no muestran empalizada periférica o retracción peritumoral del estroma. Las células basaloides que los componen y sus núcleos muestran pleomorfismo. Existen abundantes figuras de mitosis y células necróticas. A diferencia de lo que ocurre en el CBC morfeiforme, no presentan reacción significativa del estroma (no existe incremento en el número de fibroblastos del estroma ni mayor densidad del colágeno). Hasta un tercio de los CBC infiltrantes presentan un componente nodular (170).

5. El **CBC morfeiforme o esclerosante** representa entre el 1 y 5% del total de CBC. Se compone de cordones celulares angostos y angulados e islotes de 1 a 5 células tumorales, inmersas en un estroma fibroso denso. Encontrar espacios de retracción es menos frecuente que en las variantes superficial y nodular y la presencia de empalizada nuclear periférica puede no ser evidente. El estroma que rodea al tumor es un estroma colagenizado, a veces con fibroblastos abundantes y otras con haces densos de colágeno, hipocelulares, engrosados y eosinofílicos, que remedan a los de los queloides. En ocasiones coexiste con otras formas histológicas (170).



En estos dos últimos subtipos histológicos, CBC infiltrantes y morfeifomes, los límites del tumor suelen ser imprecisos y pueden extenderse hacia el tejido celular subcutáneo, músculo e infiltrar otras estructuras. Pueden presentar invasión perineural.

6. El **CBC basoescamoso o metatípico** (este último término está actualmente en desuso) presenta áreas características de CBC con focos de células con diferenciación escamosa. Los islotes de células tumorales basales son dentados y en algunos se pierde la empalizada. Las células de las áreas con diferenciación escamosa tienen citoplasmas eosinofílicos, núcleos de mayor tamaño, puentes intercelulares y/o queratinización citoplasmática. En ocasiones puede ser difícil de diferenciar del CEC y hay controversia con respecto a la clasificación de estos tumores dado que muestran diferenciación escamosa y basaloide (174,176).

Además de estos 6 subtipos histológicos, existen otros menos frecuentes como:

- Los CBC queratósicos, que son histológicamente similares a los CBC nodulares con nidos e islotes de células basaloides con empalizada periférica y pequeños quistes o grandes masas de queratina en los centros de los islotes (1).
- En el CBC quístico se aprecian espacios quísticos de tamaños variables en algunos islotes tumorales. En ocasiones se evidencia mucina (177).
- El CBC infundibulo-quístico o folicular con frecuencia se confunde con la forma queratósica. En esta variante aparecen pequeñas estructuras infundibulares que contienen tapones de queratina centrales y células basaloides en la periferia. Los nidos tumorales se disponen en un patrón que remeda los folículos en fase telógena (1,177).
- El CBC adenoide contiene bandas finas de células basaloides que adoptan una arquitectura cribiforme o pseudoglandular. Con frecuencia se observa mucina en el estroma. Puede coexistir con la forma nodular (177).
- Algunos autores sostienen que el fibroepitelioma de Pinkus se trata de una variante de CBC bien diferenciada y otros de una lesión premaligna (174). Histológicamente presenta columnas ramificadas de células basaloides inmersas en un estroma fibrovascular prominente.

- CBC con diferenciación anexial: esta variante se caracteriza por la presencia de diferenciación anexial en forma de diferenciación ductal (ecrina o apocrina con presencia de formaciones ductales tapizadas por una doble hilera de células cuboideas en el interior de los islotes), sebácea (presencia de sebocitos y/o conductos sebáceos en el seno de los islotes de células tumorales), o folicular (comentado previamente). Dentro del grupo con diferenciación folicular se han descrito diferentes subtipos según la zona en la que potencialmente se originan: infundibular tricolémica, hacia la vaina radicular interna, matricial y folicular en anágeno (178). En ocasiones es difícil diferenciar formas de CBC con diferenciación anexial de tricoepiteliomas, tricoblastomas, triquilemomas y hamartomas foliculares (177).

Otras variantes aún menos frecuentes son los CBC de células granulares, de células claras, calcificante, de “células de anillo”, cilindromatoso, con diferenciación neuroendocrina, mioepitelial y queloidal (1).

## 1.6. CARCINOMA BASOCELULAR AVANZADO

Generalmente, el pronóstico de los pacientes con CBC es bueno. La modalidad terapéutica más empleada es la cirugía, que suele ser curativa en la mayoría de las ocasiones. Sin embargo, hay un número pequeño, pero significativo, de pacientes que presenta tumores agresivos, localmente avanzados, recurrentes y/o de gran tamaño, que suponen un verdadero reto terapéutico. Algunos tumores localmente avanzados son consecuencia de una demora en el acceso a la atención médica o de tratamientos repetidamente inadecuados, otros son especialmente agresivos desde su inicio o bien son refractarios a las modalidades convencionales de tratamiento bien realizadas (179).

En un estudio retrospectivo realizado por Chren y colaboradores en el que se incluyeron 1253 pacientes con 1585 tumores (CEC y CBC) se evidenció un riesgo de recurrencia a los 5 años del 3,4% para el CBC (180). A pesar de que este riesgo de recurrencia es, en general, bajo, este pequeño porcentaje acaba convirtiéndose en un número absoluto considerable dada la elevada incidencia de CBC en la población general.

Dentro del grupo de CBC avanzados se definen dos categorías: los CBC localmente avanzados (CBCla) y los CBC metastásicos (CBCm). Los CBCla suponen entre el 1% y el 10% de todos los CBC. Solo entre un 0,0028% y un 0,5% de CBC van a desarrollar metástasis (179). Sin embargo, estos datos son estimaciones dado que, como se ha comentado en el apartado 1.1., resulta difícil determinar la incidencia exacta del CBC.

Los CBCm son aquellos tumores que desarrollan metástasis a distancia a otros órganos y/o piel y/o ganglios linfáticos no locorreionales. Los sitios más frecuentes de metástasis son, por orden decreciente: ganglios linfáticos, pulmón y hueso, ya sea por vía linfática o hematológica (181,182).

El término CBCla engloba aquellos tumores cuyo tratamiento es un desafío por el tamaño y la localización anatómica. Estos tumores suponen un verdadero reto terapéutico: algunos son claramente inoperables, mientras que otros, a pesar de ser operables, tienen un riesgo extremadamente alto de recidiva (179).

No existe una definición formal de CBCIa. De hecho, la definición de CBCIa es un desafío, no solo por la heterogeneidad en las formas clínicas de presentación, si no por la variabilidad de tratamiento en la práctica clínica habitual. En la literatura médica se han empleado varios términos para hacer referencia a este tipo de tumores, como CBC "grave", "avanzado" y "agresivo". Con la intención de estandarizar y homogeneizar la definición de CBCIa, un panel multidisciplinar de expertos reunidos en Reino Unido propuso definir como CBCIa aquellos CBC con estadio 2 (**tabla 4**) o superior según el *American Joint Comitee on Cancer* (AJCC) en los que las modalidades habituales de tratamiento se consideran potencialmente contraindicadas por las características del tumor o del paciente. Dentro de los factores dependientes del tumor se incluyen el tamaño de la lesión, la localización (zona H, proximidad a la órbita), el número de tumores, subtipos histológicamente agresivos (morfeiformes) y la probabilidad de recurrencia tras el tratamiento. Dentro de los factores dependientes del paciente se incluyen la edad, comorbilidades, calidad de vida, opinión del paciente y existencia de una genodermatosis subyacente (183,184). Estos criterios de consenso están en concordancia con los criterios de inclusión de pacientes en los estudios ERIVANCE, STEVIE Y BOLT (185–187).

Dreier y colaboradores realizaron un estudio retrospectivo de 9652 pacientes con CBC. Definieron como "CBC graves" aquellos pacientes con 10 o más CBC en un periodo de 5 años, "evolución clínica de gravedad" (complicaciones, metástasis, pacientes con tumores no tributarios de RT o cirugía) o que requerían tratamientos agresivos (resecciones quirúrgicas que afectan a estructuras más allá de la piel, cirugía con RT adyuvante, tratamiento sistémico). Un total de 640 casos fueron clasificados como "CBC moderados" (pacientes con 4 a 9 CBC durante 5 años) y 58 casos como "CBC graves". Los autores estimaron que hasta un 7% de todos los CBC requieren una "especial atención" y que un 0,6% (n=58 de 9652) de pacientes tienen "CBC graves" que se pueden beneficiar de tratamientos con inhibidores de Smo. Dos datos relevantes de este estudio son que contemplan el grado de deformidad después de la cirugía en tumores potencialmente operables, factor que no se considera en la reunión de consenso, y el número de tumores en un mismo paciente (188).

El manejo de los pacientes con CBC avanzados es un reto terapéutico que debe ser abordado en comités de tumores de forma individualizada y multidisciplinaria (involucrando a dermatólogos, cirujanos plásticos, oncólogos radioterápicos, oncólogos médicos y anatómicos patólogos). En la actualidad disponemos de opciones limitadas de tratamiento. La introducción de nuevos tratamientos dirigidos a dianas moleculares es clave para poder ofrecer alternativas terapéuticas.

**Tabla 4.** Carcinoma basocelular estadio 2 según la AJCC (183).

<b>CBC estadio 2 según la AJCC</b>
Tamaño tumoral > 2 cm o al menos dos factores de alto riesgo como: <ul style="list-style-type: none"><li>- Profundidad de invasión &gt; 2 mm</li><li>- Nivel de Clark IV</li><li>- Invasión perineural</li><li>- Localización en pabellón auricular o labio</li><li>- Variantes histológicas poco diferenciadas</li></ul>

## 1.7. TRATAMIENTO

El tratamiento del CBC depende de varios factores como son la localización y el tamaño del tumor, el subtipo histológico, los tratamientos previos realizados y las comorbilidades y preferencias del paciente. Además, se debe tener en cuenta si la intención del tratamiento es curativa o paliativa.

Existe poca evidencia científica y de calidad que compare los diferentes tratamientos disponibles para el CBC (189). Muchos de los estudios publicados están financiados por la Industria Farmacéutica y se compara el tratamiento a estudio con placebo. Por estos motivos, la elección del tratamiento depende en gran medida del facultativo. Disponemos de **tratamientos quirúrgicos con intención escisional** (extirpación quirúrgica con márgenes predeterminados y cirugía micrográfica de Mohs), **técnicas quirúrgicas destructivas** (curetaje y electrocoagulación, crioterapia, láser de CO<sub>2</sub>) y **tratamientos no quirúrgicos** (imiquimod, terapia fotodinámica, 5-fluorouracilo, RT, moléculas inhibitoras de la vía de señalización Hh y quimioterapia). Nos centraremos en los tratamientos sistémicos con fármacos inhibidores de la vía de señalización Hh.

### **Inhibidores de la vía de señalización Hedgehog**

Existen pocas opciones terapéuticas en pacientes con CBC avanzado. La mejor comprensión de los mecanismos patogénicos implicados en su oncogénesis y la identificación de dianas moleculares ha permitido el diseño de tratamientos sistémicos dirigidos (184). Se está investigando sobre terapias dirigidas, sobre todo inhibidores de la vía de señalización Hh, crucial en el desarrollo del CBC (**figura 6**). El primer tratamiento sistémico de administración por vía oral aprobado por la Agencia Europea de Medicamentos en julio de 2013 para el tratamiento de pacientes con CBCm y CBCla no tributarios de cirugía o RT es vismodegib (Erivedge®), un inhibidor potente y selectivo de Smo.

El ensayo pivotal ERIVANCE fue un estudio de dos cohortes, internacional, multicéntrico, con un solo grupo de tratamiento con vismodegib a dosis de 150 mg/día (n=104), en pacientes con CBCla (n=71) o CBCm (n=33), inoperables o en los que la cirugía no se consideraba apropiada. La variable principal fue la tasa de respuesta objetiva (ORR) evaluada por un Comité de Revisión

Independiente (CRI). La respuesta objetiva se define como la respuesta parcial o completa determinada en dos evaluaciones consecutivas separadas al menos 4 semanas. En la cohorte de CBCm, la respuesta tumoral se evaluó de acuerdo con criterios RECIST (Criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos), versión 1.0. En la cohorte de CBCla la respuesta tumoral se evaluó basándose en una evaluación visual del tumor externo y ulceración, tomografía axial computarizada del tumor (cuando fue apropiado) y una biopsia. La ORR evaluada por el CRI fue del 30% (95% IC, 16 a 48; P= 0,001) en el grupo de CBCm y del 43% (95% IC, 31 a 56; P<0,001) en el grupo de CBCla. Un 21% (n=13) presentaron respuesta completa. La duración media de respuesta fue de 7,6 meses en las dos cohortes (185). Según la actualización a 30 meses, la duración media de respuesta incrementó a 14,8 meses en la cohorte de pacientes con CBCm y a 26,2 meses en la cohorte de pacientes con CBCla, con tasas de eficacia similares a las presentadas en ERIVANCE (190).

En 2015 la *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó sonidegib (Odomzo®), otro antagonista de Smo administrado por vía oral, para el tratamiento de CBCla. En el ensayo pivotal aleatorizado BOLT, un estudio fase II multicéntrico, se incluyeron 230 pacientes con CBCla (n=194) y CBCm (n=36) no tributarios de RT o cirugía curativa que fueron randomizados en dos grupos para recibir 200 mg (n=79, 66 CBCla y 13 CBCm) y 800 mg (n=151, 128 CBCla y 23 CBCm) diarios de sonidegib. La variable principal fue la proporción de pacientes que alcanzó una respuesta objetiva (respuesta parcial y respuesta completa) según los criterios RECIST versión 1.1. para el grupo de CBCm y criterios mRECIST para el grupo de CBCla (que integra estudios de imagen con resonancia magnética mediante criterios RECIST 1.1., fotografías en color bidimensionales según las guías de la WHO y múltiples biopsias del área tumoral) evaluada por el comité central en evaluaciones consecutivas, separadas al menos 4 semanas. En el análisis a 12 meses, las tasas de respuesta en los pacientes con CBCla fueron del 57,6% y 43,8% en los grupos de 200 mg y 800 mg, respectivamente. Según el investigador *in situ* la duración media de respuesta fue de 20,2 y 19,8 meses para los grupos de 200 y 800 mg, respectivamente. No se alcanzó la duración media de respuesta Kaplan-Meier según la evaluación por el comité central en el grupo de 200 mg, porque pocos respondedores presentaron progresión del tumor

o murieron, y fue de 15,7 meses en el brazo de 800 mg. Las tasas de respuesta en el grupo de pacientes con CBCm fueron 7,7% y 17,4% en los grupos de 200 mg y 800 mg respectivamente. No se alcanzó la duración media de respuesta Kaplan-Meier según la evaluación por el comité central para el grupo con CBCm en ninguno de los dos brazos de tratamiento. Según el investigador, la duración media de respuesta fue de 17,7 meses y 10,2 meses para los grupos tratados con 200 mg y 800 mg, respectivamente (191).

En el ensayo BOLT, los criterios de respuesta tumoral en el grupo de pacientes con CBCla son más rigurosos que en el estudio pivotal ERIVANCE, ya que para alcanzar la respuesta completa según los criterios mRECIST se requería una biopsia libre de tumor y una respuesta completa en todas las pruebas de imagen realizadas durante la evaluación. Sin embargo, en el estudio ERIVANCE para alcanzar la respuesta completa se requería la existencia de una biopsia libre de tumor y respuesta parcial o completa en la tomografía axial computarizada o en las fotografías tumorales (191).

A pesar de que estos tratamientos ofrecen una posibilidad terapéutica para pacientes con CBC avanzados, existe incertidumbre en lo que respecta a la eficacia y tolerabilidad a largo plazo, sobre todo en pacientes con SG. Además, desde su aprobación se han ido notificando casos de resistencia. El primer caso se publicó en un paciente con un meduloblastoma debido a una mutación en *PTCH1* (*PTCH1-W844C*) y en otros genes implicados en la vía Hh, provocando una rápida progresión de la enfermedad (192). Posteriormente se han publicado casos de mutaciones aisladas principalmente en heterocigosis en *SMO* (193). Por ello, actualmente los esfuerzos se centran en investigar nuevas dianas terapéuticas y desarrollar inhibidores de segunda generación que conserven actividad en presencia de mutaciones, y que sean capaces de bloquear otras vías que interaccionan con la vía de señalización Hh y que conducen a una estimulación de Gli independiente de Smo, como EGFR, la aPKC, la PKA y las vías RAS/MAPK y PI3K (27,31,37,194–196).

### **Otros tratamientos**

La **ciclopamina** es un alcaloide esteroideo aislado de la planta *Veratrum californicum* que bloquea directamente Smo. Su escasa solubilidad y sensibilidad



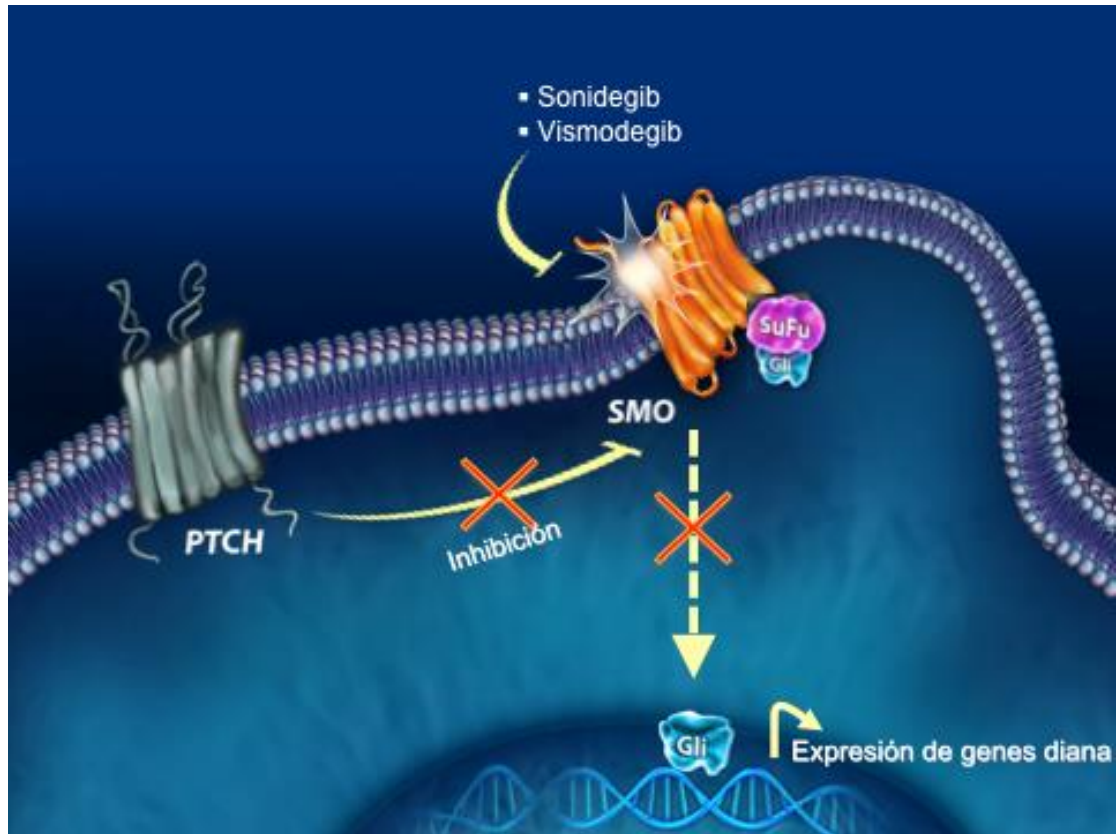
al ácido ha impulsado la obtención de derivados con mejor biodisponibilidad y tolerancia en modelos murinos. Se ha empleado como tratamiento tópico en el CBC en ratones con buenos resultados (197). A pesar de que está en desuso, sigue siendo un agente importante en modelos preclínicos de inhibición de la vía Hh.

**Itraconazol** y **posaconazol** son dos antifúngicos que han demostrado ser potentes inhibidores de la actividad de Smo de forma distinta a vismodegib y ciclopiamina. También previenen la acumulación de Smo en el cilio primario (198,199). Existe evidencia científica que avala el uso de itraconazol oral en el tratamiento del CBC como fármaco de segunda línea en pacientes que desarrollan resistencia a vismodegib, o en combinación con otros fármacos (200). Una de las principales limitaciones de itraconazol es su elevado número de interacciones farmacológicas, por lo que posaconazol se perfila como una alternativa útil dado su mejor perfil de efectos secundarios y mínimas interacciones farmacológicas (199).

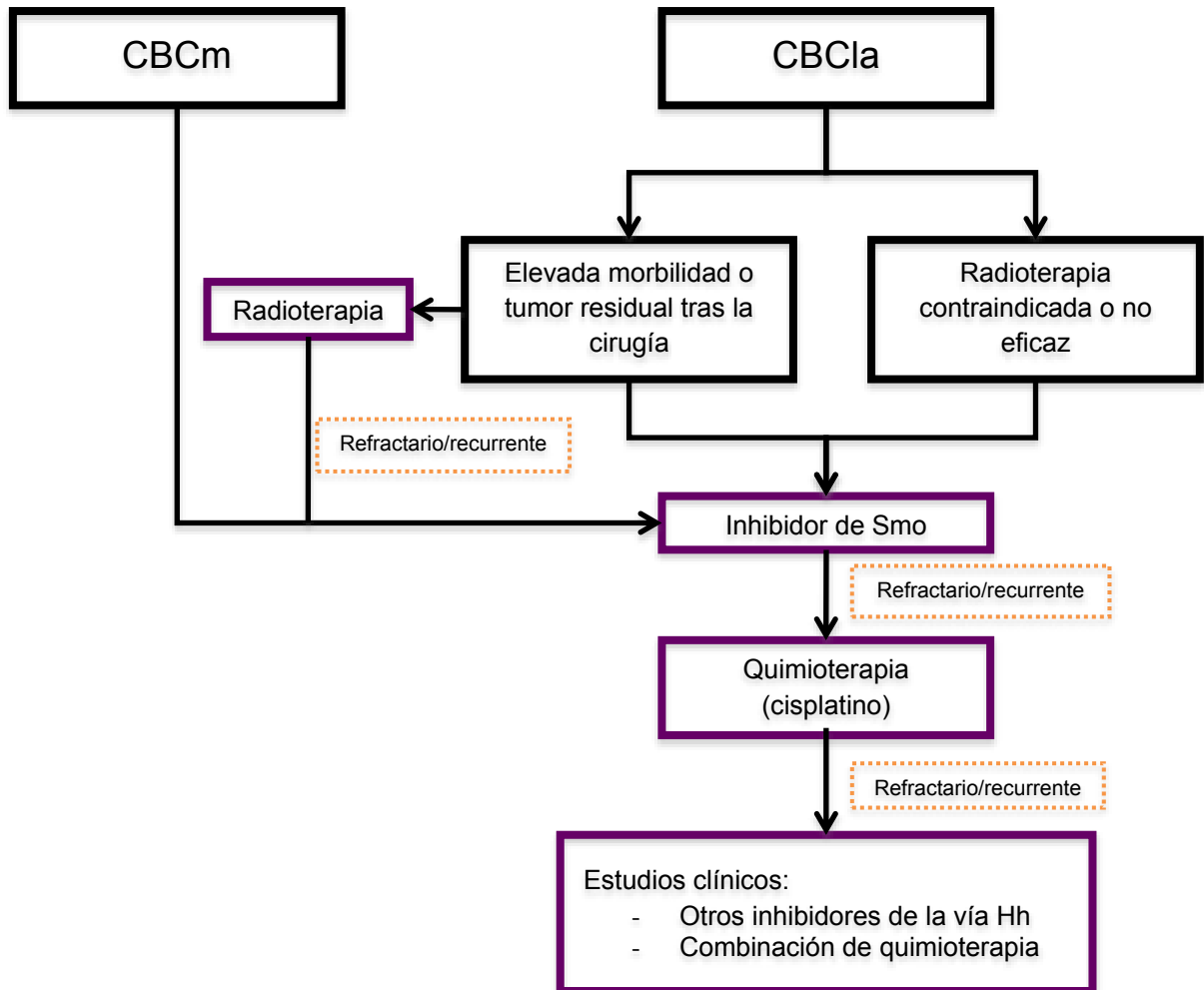
Existe evidencia científica sobre el efecto inhibitorio del **trióxido de arsénico** sobre la vía de señalización Hh. El trióxido de arsénico está aprobado para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda e inhibe el factor de transcripción Gli2. Ally y colaboradores demostraron que la administración de trióxido de arsénico intravenoso en combinación con itraconazol oral a pacientes con CBCm resistentes a vismodegib reducía en un 75% la actividad de la vía Hh. Sin embargo, a pesar de que 3 pacientes permanecieron con enfermedad estable, en ninguno se evidenció una reducción del tamaño tumoral (201).

Se están investigando otros fármacos, sobre todo en combinación, para pacientes con CBC refractarios a las modalidades actuales de tratamiento. Como se ha comentado en el apartado 1.2.3., **gefitinib**, un inhibidor del EGFR, inhibe el crecimiento de líneas celulares de CBC en combinación con ciclopiamina o GANT61, de forma más potente que cualquiera de estos dos fármacos en monoterapia (35). Existe un estudio en marcha para evaluar la eficacia de sonidegib y **buparlisib** (inhibidor PI3K) en CBCla y CBCm (NCT02303041) (202).

**Figura 6.** Mecanismo de acción de vismodegib y sonidegib sobre la vía de señalización Hedgehog.



**Esquema 1.** Esquema del tratamiento del carcinoma basocelular localmente avanzado y metastásico.



## **2. INMUNIDAD Y CÁNCER**



## 2. INMUNIDAD Y CÁNCER

La interacción entre las estrategias que pone en marcha el tumor para iniciarse y progresar y los mecanismos antitumorales del huésped son clave en el desarrollo del cáncer.

Tanto en la fase de iniciación como de progresión de tumores epiteliales malignos se deben producir varios fenómenos. En primer lugar, la aparición de **alteraciones genéticas** en células epiteliales es crítica. Las mutaciones suelen activar **oncogenes** o inactivar **genes supresores tumorales** que confieren a las células las propiedades necesarias para el crecimiento descontrolado. En segundo lugar, el **microambiente tumoral**, en el que intervienen las células tumorales, el estroma y las células inmunes, puede ser un potente supresor o promotor de fenotipos tumorales malignos iniciados por mutaciones oncogénicas. Hay tumores que pierden su capacidad de crecimiento cuando se implantan en tejidos normales o cuando están sujetos a manipulaciones que simulan un microambiente supresor. Un ejemplo de ello son las células del teratocarcinoma, que cuando son trasplantadas a determinados tejidos son capaces de formar tumores malignos; sin embargo, cuando se implantan en blastocistos murinos forman tejidos normales, originando como resultado ratones quiméricos (203,204). Las células epiteliales dependen del **estroma** subyacente para su organización y función. Se trata de una estructura rica en colágeno, adyacente a la membrana basal, sobre la que descansan las células epiteliales. Está producido por **fibroblastos**, que segregan factores solubles implicados en la supervivencia y diferenciación del epitelio. Los fibroblastos del estroma juegan un papel importante en la génesis de tumores epiteliales malignos (205–207). Las células epiteliales preneoplásicas sufren una transformación maligna cuando entran en contacto con fibroblastos estromales que han sido activados por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) (208). De forma recíproca, las células epiteliales malignas son capaces de activar los fibroblastos adyacentes y otras células tumorales próximas (209).

Además de los factores mencionados, parece que las **células senescentes** también desempeñan un papel relevante en el desarrollo de los tumores epiteliales malignos. Son células que entran en un estado quiescente como

respuesta a agresiones o al estrés. Se trata de un mecanismo que previene la génesis tumoral. Con el envejecimiento se produce un incremento en el número de mutaciones somáticas en las células del organismo, algunas de las cuales tienen potencial oncogénico, y una acumulación progresiva de células senescentes en los tejidos. Ambos hechos incrementan la probabilidad de que coexistan células senescentes en la proximidad de células portadoras de mutaciones oncogénicas (210,211). Las células senescentes favorecen el desarrollo de un microambiente procarcinogénico. Son capaces de segregar factores que estimulan el crecimiento de células epiteliales portadoras de mutaciones oncogénicas y alteran la arquitectura de los tejidos. En modelos murinos los fibroblastos senescentes son capaces de promover la proliferación de células epiteliales premalignas y malignas, pero no de las normales, dando lugar a tumores. En resumen, a pesar de que en adultos jóvenes la senescencia celular evita la génesis tumoral, en organismos envejecidos sería capaz de promover su desarrollo favoreciendo un microambiente que facilita la progresión de otras células ya alteradas genéticamente (212).

Por último, el **sistema inmunológico** es clave en el desarrollo del cáncer. Los tumores son capaces de desarrollar mecanismos que les permiten escapar de la respuesta inmunológica del huésped. De hecho, la modulación del sistema inmune como instrumento terapéutico es motivo de numerosas investigaciones y un enfoque novedoso y prometedor en el tratamiento oncológico.

Las células neoplásicas emplean diversos mecanismos para evadir la respuesta antitumoral, conocidos en MM y potencialmente extrapolables a otros cánceres:

1. Reducción de la expresión de antígenos tumorales o del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH I) (213,214).
2. Inhibición de la actividad citolítica de las células NK modulando ligandos específicos (215).
3. Inducción de apoptosis de los LT a través de la expresión de Fas ligando (216).
4. Secreción de moléculas de señalización inhibitoras (citocinas, TGF- $\beta$ , prostaglandina E2) (217,218).

5. Expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH II), actuando como células presentadoras de antígeno (CPA) ineficaces en ausencia de señal coestimuladora (219).
6. Expresión de proteínas coinhibidoras del eje PD-1/PD-L1 que evitan que el LT ejerza su actividad citolítica.
7. Reclutamiento de LTreg, cuyo efecto inmunosupresor se puede ver potenciado por moléculas inhibidoras como el antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) y el ligando de la molécula de muerte programada 1 (PD-L1) (220–223).
8. Agotamiento de la respuesta de los LT por estimulación antigénica prolongada (224).

Seguidamente trataremos con más profundidad algunos de estos aspectos.



## 2.1. RESPUESTA INMUNOLÓGICA FRENTE AL CÁNCER

### 2.1.1. Linfocitos infiltrantes del tumor (LIT)

Los tumores malignos a menudo tienen células inmunológicas en su interior y en el frente de progresión tumoral, entre las que se incluyen tipos celulares involucrados en la inmunidad innata y adaptativa. Entre macrófagos, células dendríticas (CD) y mieloides supresoras, predominan los linfocitos, ya sea de estirpe T (LT) (CD4+, CD8+, CD45Ro+ y Foxp3+), B (LB) y células NK (225,226).

El término "*tumor-infiltrating lymphocytes*" (LIT) fue propuesto por Clark en 1969 para referirse a la respuesta inmune del huésped frente a un tumor, concretamente frente al MM. Posteriormente se ha visto que estos LIT están en contacto directo con las células neoplásicas y/o infiltran los nidos tumorales de muchos cánceres, incluyendo tumores primarios y metástasis. Esta interacción temprana entre las células tumorales y los linfocitos intenta contener el desarrollo tumoral; de forma más tardía, este control se pierde y el tumor progresa ("*cancer immunoediting*" o teoría de la inmunovigilancia) (227).

Todas las células nucleadas expresan el CMH I en la superficie. Cuando una célula tumoral presenta antígenos aberrantes del CMH I es reconocida y destruida por los LT citotóxicos (CD8+). El CMH II lo expresan las CPA y es crucial para la presentación de antígenos solubles derivados de proteínas extracelulares a los LT colaboradores (CD4+). Para que se produzca la activación de los LIT, las moléculas del CMH I o II de la CPA deben unirse al receptor del LT (RLT) (señal 1) y simultáneamente deben interaccionar otros ligandos y sus respectivos receptores coestimuladores de una y otra célula (señal 2). Gracias a esta doble interacción se produce una activación completa y la expansión clonal de los LT específicamente dirigidos contra el tumor (228). También existen moléculas coinhibidoras, comúnmente denominadas "*checkpoint inhibitors*", que frenan la respuesta antitumoral (**figura 7**) (229). Es evidente que, en vista de estos conocimientos, la mejor comprensión del funcionamiento de los LIT en el microambiente tumoral es crucial para diseñar nuevos enfoques terapéuticos.

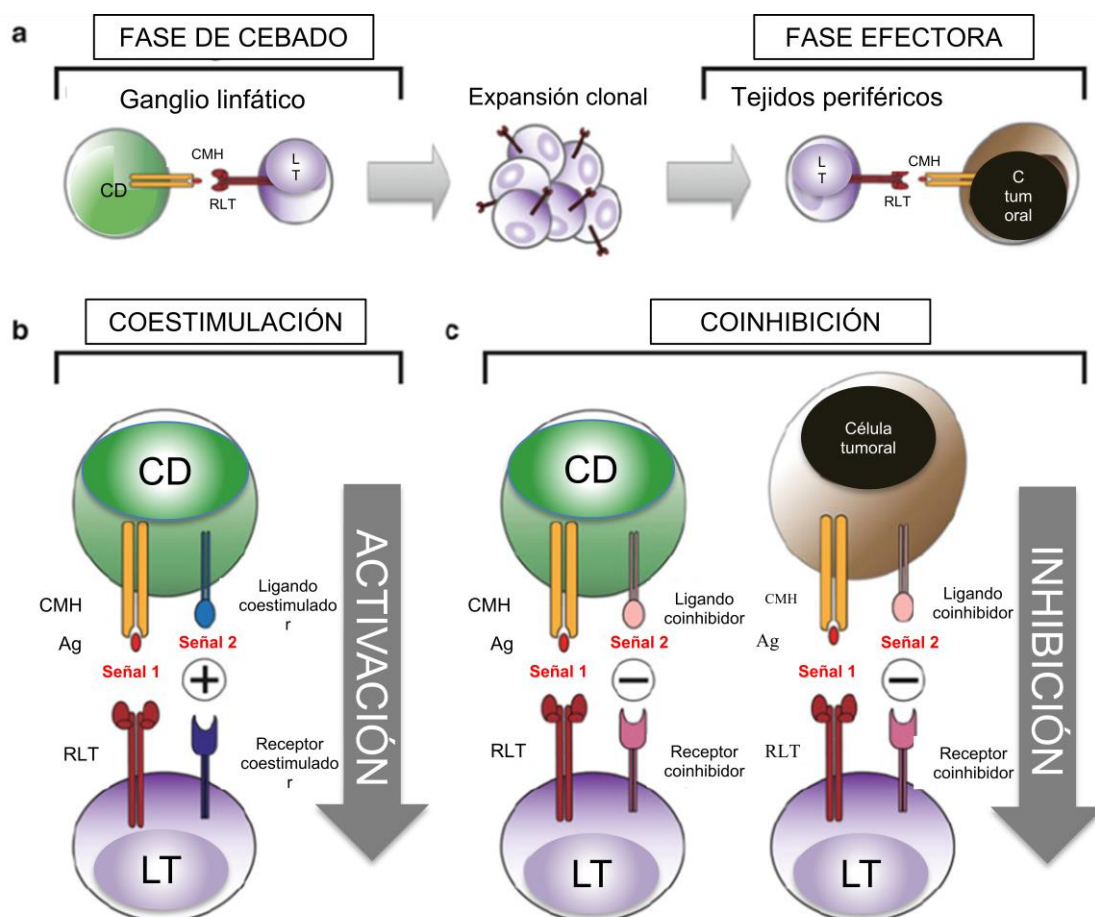
A pesar de que la existencia de abundantes LIT se suele asociar con un mejor pronóstico, existe una subpoblación de células que favorece la inmunosupresión local y el desarrollo tumoral. A este subgrupo de LIT se les conoce como **linfocitos T reguladores** (Tregs). Son LT CD4+ que intervienen en la prevención de la autoinmunidad fomentando la tolerancia inmunológica frente a antígenos propios. Ejercen su función supresora en los LT CD4+ y CD8+ autorreactivos por mecanismos, entre los que se incluye la secreción de citocinas reguladoras como TGF- $\beta$  e IL10 (230,231). Expresan CD25, el factor de transcripción *forkhead/winged-helix* (Foxp3), el gen 3 de activación del linfocito (LAG-3) y CTLA-4. En individuos sanos representan entre un 5% y un 10% del total de los LT CD4+ (232). Fueron identificados entre los LIT y su proporción entre ellos es mucho mayor que en sangre periférica (constituyen el 20% o más de los LIT) (233). Se han identificado en cantidades superiores a las habituales en sangre periférica de pacientes con ciertos tipos de cáncer (234,235). Sin embargo, los resultados de algunos estudios son cuestionables pues la proteína CD25 también es expresada por LT CD4+ activados (236).

### **Linfocitos infiltrantes del tumor en melanoma maligno**

El valor pronóstico de los LIT en MM ha sido investigado y debatido en las últimas décadas con resultados discordantes. Hay estudios que respaldan que su presencia en el frente de invasión vertical es indicativa de un mejor pronóstico, con mayor supervivencia y menor riesgo de metástasis (237–239). De forma similar, aquellos pacientes con mayor infiltrado inflamatorio por LIT en los ganglios linfáticos metastásicos tendrían mayores tasas de supervivencia (240). Sin embargo, otros estudios no han podido demostrar esta relación; a pesar de que la presencia de LIT se asociaría con la ausencia de afectación ganglionar, no tendría impacto en la supervivencia o en el riesgo de recurrencia (241,242). Aún así, la mayoría respaldan su relevancia en MM primarios en fase de crecimiento vertical, confiriendo un mejor pronóstico.

Por otro lado, sí que existe consenso sobre el pronóstico desfavorable en MM que supone la presencia de LTreg entre las células neoplásicas y en la periferia del tumor (243–245).

**Figura 7. Esquema de activación del LT dependiente de antígeno.** **a.** El cebado de los LT se produce en el ganglio linfático tras su interacción con las CD. El LT reconoce a través del RLT péptidos antigénicos asociados al CMH II. Sin embargo, la interacción entre el CMH II y el RLT (señal 1) no es suficiente para su activación. **b.** Para la activación del LT se requieren dos señales, la señal 1 y la señal coestimuladora entre el ligando de la CD y el receptor coestimulador del LT (señal 2). Cuando se producen de forma simultánea se inicia la activación del LT y la expansión clonal de la población de LT específica. **c.** En presencia de la señal 1 pero ausencia de la señal 2 se liberan citocinas que inducen un estado de anergia que se manifiesta mediante tolerancia inmunológica frente al estímulo antigénico, apoptosis del LT y modulación de la función supresora de los LTreg. Hay células tumorales que expresan el CMH I, CMH II y ligandos coinhibidores. Adaptado de Schatton T (246).



CD: célula dendrítica, LT: linfocito T, CMH: complejo mayor de histocompatibilidad, RLT: receptor del linfocito T, Ag: antígeno.

### 2.1.2. Moléculas correguladoras de la inmunidad

Las moléculas de coestimulación son glicoproteínas esenciales para la comunicación entre los LT y el resto de células del sistema inmune. Como se ha comentado, el proceso de activación de los LT precisa de dos señales, una inicial mediada por el reconocimiento de un antígeno presentado por el CMH al RLT y una segunda señal, o señal coestimuladora, que permite la expansión clonal y una respuesta efectora específica.

La molécula de muerte programada 1 (PD-1 o CD279) es un receptor inmune coseñalizador expresado por los LT activados que media en la inmunosupresión. PD-1 está implicado en promover la muerte celular, controlar la activación de los linfocitos y el daño tisular durante la respuesta inmune y mantener la tolerancia. Por lo tanto, es un regulador negativo de los LT y actúa como un receptor coinhibidor para frenar la activación inmunológica.

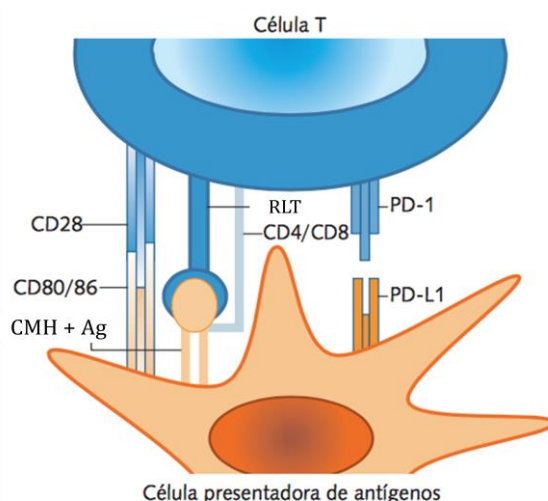
En tejidos sanos, la vía de PD-1 en el LT regula la respuesta inmune para minimizar el daño al tejido adyacente y evitar el desarrollo de autoinmunidad, promoviendo la tolerancia de autoantígenos. La unión de PD-1 a PD-L1 (B7-H1 o CD274) de los macrófagos u otras CPA inhibe la producción de numerosas citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2), la proliferación linfocitaria y promueve la apoptosis del LT (**figura 8**).

PD-1 funciona principalmente en tejidos periféricos donde los LT pueden encontrar sus ligandos inmunosupresores (PD-L1 y el ligando de la molécula de muerte programada 2, PD-L2 o B7-DC). PD-L2 es expresado por CPA y células epiteliales mientras que PD-L1 es expresado por una amplia variedad de células inmunes y no inmunes, incluyendo algunas células tumorales (247–249).

Los tumores desarrollan mecanismos de evasión a las respuestas del sistema inmune para perpetuar su persistencia y crecimiento. PD-L1 se expresa en la superficie de células tumorales y CPA en numerosos cánceres (tumores escamosos de cabeza y cuello, MM, tumores cerebrales, de tiroides, timo, esófago, pulmón, mama, renales, adrenales, tracto gastrointestinal, colorrectales, hepáticos, de páncreas, vejiga, uroteliales, ovario y piel). Se trata de un mecanismo adaptativo del tumor inducido por el microambiente tumoral, capaz

de bloquear el efecto antitumoral de los LT. Este mecanismo se ha denominado "resistencia inmune adaptada" (250). La expresión de PD-L1 por las células tumorales y otras células promotoras tumorales en el microambiente tumoral se puede producir por dos mecanismos: constitutivo e inducido (251). Por ejemplo, en MM con la mutación BRAFV600, la expresión de PD-L1 puede ser el resultado de procesos oncogénicos que conllevan su expresión constitutiva en las células tumorales, o ser inducida por citocinas segregadas por células inmunológicas (252–254).

**Figura 8. Esquema de la vía PD-1/PD-L1.** Durante el proceso de activación celular, la primera señal está dada por el reconocimiento del antígeno presentado por el CMH al RLT. La segunda señal, imprescindible para que se produzca una respuesta efectora, depende de la unión de las moléculas coestimuladoras a sus ligandos, expresados por los LT y las CPA, respectivamente. En situaciones normales, 24 horas después de la activación celular, comienza la expresión de las moléculas de coestimulación negativa como PD-1, que al unirse a sus ligandos envía señales inhibitoras para evitar la perpetuación de la respuesta inmune que lleve al desarrollo de una inflamación crónica.



CMH: complejo mayor de histocompatibilidad, RLT: receptor del linfocito T. Ag: antígeno, PD-1: molécula de muerte programada 1, PD-L1: ligando de la molécula de muerte programada 1.

### **2.1.3. Eje PD-1/PD-L1 en tumores malignos: valor pronóstico y como biomarcador**

No queda clara la correlación entre la expresión de PD-L1 en las células tumorales y el pronóstico. La mayoría de estudios señalan que su expresión es un marcador de mal pronóstico, dado que facilita la evasión inmunológica antitumoral a través de la inhibición de la función de los LT citotóxicos (255–257). Sin embargo, otros estudios defienden que la expresión de PD-L1 entraña un mejor pronóstico (251). De hecho, su expresión podría estar condicionada por la producción de IFN- $\gamma$  por los LT activados, factor que se ha relacionado con un pronóstico más favorable (258). El metaanálisis realizado por Wang y colaboradores en 1157 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) demuestra que la expresión de PD-L1 está significativamente asociada a tumores poco diferenciados y a una menor supervivencia (259). En MM hay estudios que señalan que la expresión de PD-L1 en las células tumorales y en los LIT se asocia a fenotipos más agresivos y a un peor pronóstico (260).

Sin embargo, lo que sí queda claro es que no todos los pacientes con tumores que expresan PD-L1 responden a inhibidores de PD-1/PD-L1 y a la inversa, algunos pacientes con tumores sin expresión de PD-L1 sí responden a los tratamientos dirigidos frente a estas moléculas. En MM hasta un 20% de los tumores PD-L1 negativos responden a tratamientos anti-PD-1/PD-L1; por ello, la ausencia de expresión de PD-L1 en un tumor no justifica excluir al paciente de dichos tratamientos (261,262).

Se desconocen los motivos que justifican las discrepancias en el valor pronóstico y biomarcador de la IHQ de PD-L1; sería lógico pensar que la respuesta a inhibidores de PD-L1 y PD-1 es mejor en aquellos tumores con mayor expresión. Esta aparente incongruencia puede tener varias explicaciones:

- En primer lugar, no existe consenso sobre los niveles de corte para considerar qué es sobreexpresión de PD-L1 y en la mayoría de las ocasiones su determinación IHQ es subjetiva. Los porcentajes utilizados como nivel de corte varían entre el 1% y el 50% de las células tumorales (263,264).

- En segundo lugar, la expresión de PD-1/PD-L1 en las células tumorales e inmunes es un proceso dinámico en el tiempo (265). Dependiendo del momento en el que se realiza el estudio los resultados pueden ser variables (251).
- Tercero, el patrón de expresión de PD-L1 puede ser focal o difuso. Así pues, la realización de una biopsia incisional en un lugar poco representativo del tumor también supondría un sesgo. Además, está por consensuar si su expresión se debe valorar dentro del tumor y/o en el tejido peritumoral. En las metástasis, la expresión de estas moléculas puede ser diferente a la del tumor primario.
- Cuarto, el uso de técnicas IHQ que emplean metodologías y anticuerpos monoclonales diferentes puede ser otro factor de variabilidad. Existen diversos anticuerpos anti-PD-L1 disponibles, con diferentes sensibilidades y especificidades, que dificulta la comparación de los resultados obtenidos en uno u otro estudio (266).
- Quinto, la expresión de PD-L1 podría estar alterada por el uso de tratamientos previos como la quimioterapia, RT o agentes antiangiogénicos, que pueden inducir su expresión a través del reclutamiento de LIT secretores de TNF- $\gamma$  (267). Deng y colaboradores demostraron sobreexpresión de PD-L1 en modelos murinos después de ser irradiados (268).
- Por último, hay que tener en cuenta que la positividad IHQ de PD-L1 puede ser de membrana y/o citoplasmática. Parece ser que solo la positividad de membrana tendría significado biológico (229). (**Tabla 5**).

Todos estos factores explicarían la variabilidad de los resultados obtenidos en diferentes estudios que analizan el papel de PD-L1 y PD-1 como biomarcadores predictores de la respuesta a sus inhibidores. A pesar de ello, en la actualidad la detección IHQ de PD-L1 sigue siendo el biomarcador más empleado (255,269).

**Tabla 5.** Dificultades en la valoración inmunohistoquímica de la tinción con anticuerpos anti-PD-L1.

<b>Dificultades para usar la IHQ de PD-L1 como biomarcador para el tratamiento con anticuerpos anti-PD-L1</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Su expresión en biopsias incisionales pequeñas de algunos tumores puede no ser representativa.</li><li>• Su expresión en distintas lesiones tumorales/metástasis en un mismo individuo puede variar según la localización anatómica o el momento de realización de la biopsia.</li><li>• Su expresión en biopsias de tumores realizadas meses o años atrás podría no reflejar de forma precisa el estatus de PD-L1 en el momento de iniciar el tratamiento; su expresión puede depender de los tratamientos previos.</li><li>• Los epítomos de PD-L1 detectados por algunos anticuerpos son poco estables, sobre todo si las muestras no se procesan correctamente.</li><li>• Los anticuerpos empleados para la detección de PD-L1 tienen diferentes afinidades y especificidades.</li><li>• La expresión de la proteína PD-L1 puede ser de membrana y/o citoplasmática; solo la positividad de membrana tendría significado biológico.</li><li>• PD-L1 puede expresarse en múltiples tipos celulares del microambiente tumoral, lo que supone un reto para su cuantificación e interpretación.</li></ul>



#### **2.1.4. Inmunoterapia y cáncer**

La inmunoterapia del cáncer es una nueva y prometedora herramienta terapéutica desde el descubrimiento de inhibidores de proteínas coseñaladoras, ya sean con función de receptor o sus ligandos, entre los que destacan CTLA-4, PD-1 y PD-L1 (251). Desde el punto de vista dermatológico se están empleando en el MM, el carcinoma de células de Merkel (CCM) y el CEC.

##### **Inmunoterapia en el melanoma maligno**

CTLA-4 es una molécula que pertenece al grupo de los receptores coinhibidores de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se expresa en la superficie de los LT activados (CD4+, CD8+) y de forma constitutiva en los LTreg. En una primera fase de la respuesta inmune, las CPA exponen los antígenos tumorales a los LT en los tejidos linfoides. Los receptores del LT, CTLA-4 (molécula inhibidora) y CD28 (molécula estimuladora) compiten para unirse con las moléculas B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) de la CPA. La unión de CTLA-4 a su ligando B7 provoca una señal inhibidora que bloquea la respuesta de los LT en fases precoces de su cebado en los ganglios linfáticos. En cambio, la unión de PD-1 con sus ligandos disminuye la magnitud de la respuesta de los LT ya sensibilizados frente a antígenos tumorales e involucrados en la respuesta efectora en los tejidos periféricos. En el contexto de la inmunoterapia, el primer fármaco aprobado por la FDA para pacientes con MM metastásico fue ipilimumab (anticuerpo anti-CTLA-4). Estudios posteriores respaldaron la aprobación de fármacos anti-receptor PD-1 (pembrolizumab, nivolumab) al demostrar un incremento de la supervivencia en comparación con la quimioterapia convencional e ipilimumab (270–274). Parece que el bloqueo del eje PD-1/PD-L1 es más selectivo en la respuesta antitumoral y potencialmente tiene menos efectos adversos inmunomediados que el de CTLA-4 (275,276). Los inhibidores de la vía PD-1/PD-L1 también son eficaces en el tratamiento de tumores menos inmunogénicos como el CPNM, el cáncer de mama triple negativo y carcinomas uroteliales, entre otros (274,277).

##### **Inmunoterapia en el carcinoma de células de Merkel**

EL CCM es un tumor neuroendocrino agresivo e inmunogénico, que aparece con mayor frecuencia y tiene peor pronóstico en individuos inmunodeprimidos (278).

El 80% se asocian con un poliomavirus y tienen una baja carga mutacional, al contrario de los CCM inducidos por la RUV que contienen muchas más alteraciones genéticas (279–283). Hay estudios que demuestran que en casi el 50% de los CCM los LIT expresan PD-1 y las células tumorales y macrófagos del frente tumoral PD-L1 (284,285). La inmunoterapia emerge como una modalidad terapéutica prometedora para este tumor. Se han estudiado tres anticuerpos frente al eje PD-1/PD-L1 en CCM: nivolumab, avelumab y pembrolizumab. Todos han demostrado tasas de respuesta y duración considerables, brindando una opción terapéutica a pacientes con enfermedad metastásica, a los que la quimioterapia convencional solo ofrecía 3 meses de supervivencia libre de progresión (286–288).

En marzo de 2017 la FDA aprobó avelumab (Bavencio®), un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1, para el tratamiento de pacientes con CCM metastásico a raíz de los resultados del estudio clínico JAVELIN Merkel 200 (289).

### **Inmunoterapia en el carcinoma escamoso cutáneo**

Como ocurre con el CCM, el CEC también es un tumor inmunogénico que se considera un buen candidato para el tratamiento con inmunoterapia. Hay estudios que demuestran que PD-L1 y PD-L2 desempeñan un papel importante en la progresión del tumor, por lo que se perfilan como posibles dianas terapéuticas (290,291). Existe poca evidencia científica sobre el uso de la oncoinmunoterapia en este tumor; la experiencia se reduce a observaciones puntuales, pero los resultados son esperanzadores y justifican futuras investigaciones (292,293).

Resaltar un artículo publicado en abril de 2017, en el que se evaluaba 38 biopsias de CEC de 24 pacientes mediante tecnología *NanoString*. Esta tecnología permite estudiar la expresión de ARNm en muestras tumorales parafinadas. Los autores seleccionaron 10 CEC con invasión perineural, 12 infiltrantes, 6 superficiales, 10 tumores de pacientes RTOS y 7 muestras de piel normal como control. De todos los subgrupos, los que presentaron mayor expresión de PD-1 y PD-L2 en comparación con los controles fueron los CEC con invasión perineural. También se observó mayor expresión de PD-1 en los CEC con estadios 2B (de 2 a 3 factores de alto riesgo de metástasis, recurrencia

y muerte) y 3 (4 o más factores de alto riesgo de metástasis, recurrencia y muerte) según la clasificación de *Brigham and Women's Hospital tumor Staging*. Los hallazgos del estudio de ARNm codificador de PD-1 y PD-L2 se correlacionaron con su expresión IHQ en las muestras tumorales. Además, compararon la expresión IHQ de PD-1, PD-L1 y PD-L2 en 5 CEC y 3 muestras de piel normal; demostraron mayor intensidad de expresión de todas las tinciones en todas las muestras tumorales en comparación con las de piel normal. La intensidad de expresión de la tinción frente a PD-L2 fue superior a la de PD-L1.

En tres muestras de tumores, paralelamente a las tinciones anti-PD-L1 y PD-L2, identificaron mediante inmunofluorescencia frente a CD11c las CD, pudiendo detectarse un doble marcaje. Esto sugiere la presencia de CD CD11c<sup>+</sup> en el tumor que expresan simultáneamente PD-L1 o PD-L2 y apoya su participación en la inducción de un estado de anergia en los LT activados mediando en la inmunosupresión del microambiente en el CEC.

Los autores concluyeron que los CEC expresaban niveles superiores de PD-1 y sus ligandos que las muestras de piel normal. Quizás el bloqueo del eje PD-1/PD-L1 con anticuerpos monoclonales resulte útil para activar la respuesta inmunológica del huésped frente al tumor y ofrece una alternativa terapéutica a pacientes con CEC avanzados y/o metastásicos sin más opciones de tratamiento. Con estas expectativas, la expresión IHQ de PD-L1 podría ser un biomarcador para identificar aquellos pacientes que potencialmente se beneficiarían de estos fármacos (294).

De forma puntual se ha utilizado la inmunoterapia (ipilimumab, pembrolizumab y nivolumab) en pacientes con CEC localmente avanzados y metastásicos obteniendo, en la mayoría, respuestas parciales. Destacar el paciente publicado por Falchook y colaboradores, con un CEC metastásico que recibió tratamiento con REGN2810 (anticuerpo monoclonal anti-PD-1 en el ensayo clínico en fase 1 NCT02383212) obteniendo una respuesta completa mantenida a los 16 meses de finalizar (292,293,295–298).

En la reunión de este año de la *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) se han presentado los resultados preliminares de un estudio fase 2 en el que se han

tratado 59 pacientes con CEC metastásico con cemiplimab (anticuerpo anti-PD-1). La tasa de respuesta objetiva es del 47,5% (28/59), con una duración de respuesta de más de 6 meses en el 57% de los pacientes respondedores y un perfil de seguridad aceptable. Estos resultados han sido publicados recientemente (299,300).

A pesar de que estos tratamientos emergen con optimismo para pacientes con tumores avanzados, la mayoría no responden. Se están diseñando estrategias para mejorar las respuestas e incrementar la supervivencia libre de enfermedad ensayando combinaciones de fármacos inhibidores de dianas moleculares. El principal problema son sus efectos adversos inmunomediados, sobre todo autoinmunes, frecuentes y potencialmente graves (272,273,301).



### **3. INMUNIDAD Y CARCINOMA BASOCELULAR**



### 3. INMUNIDAD Y CARCINOMA BASOCELULAR

Todos los CBC comparten la activación aberrante de la vía de señalización Hh. Actualmente no existen biomarcadores que permitan diferenciar los CBC de alto y bajo riesgo (como mutaciones en *P53*, pérdida de la expresión de E-cadherina o *bcl-2*, sobreexpresión de  $\alpha$ -catenina nuclear...). Es posible que la progresión del CBC de alto riesgo sea favorecida por un microambiente inmunológicamente permisivo y no solo por potenciales alteraciones moleculares diferentes a las que aparecen en subtipos histológicos de bajo riesgo. Estos dos mecanismos pueden ser determinantes en la transformación de fenotipos de CBC indolentes a agresivos y también para explicar su baja capacidad metastásica.

#### 3.1. RADIACIÓN ULTRAVIOLETA E INMUNOSUPRESIÓN

Uno de los factores que se ha postulado como responsable en la patogenia del CBC es la inmunosupresión inducida por la RUV. En particular la RUV-B, tiene efectos inmunosupresores a largo plazo, incluso a dosis bajas, afectando principalmente las reacciones inmunitarias mediadas por los LT (302).

Hay varios estudios que han asociado el efecto inmunosupresor de la RUV a su efecto sobre las **células de Langerhans** (CL), habiéndose descrito cambios cuantitativos, morfológicos y funcionales (303,304).

Las CL son cruciales para el funcionamiento del sistema inmune cutáneo, dada su capacidad de procesamiento de antígenos. Tras entrar en contacto con un antígeno lo internalizan y lo procesan, inducen cambios locales en la producción de citocinas y migran hacia tejidos linfoides para presentar los péptidos antigénicos a los LT. La RUV, además de reducir el número de CL en la epidermis, altera sus mecanismos de fagocitosis y/o migración, hecho que interfiere en la presentación de antígenos a los LT y modifica el perfil de citocinas liberadas, disminuyendo la respuesta inflamatoria (305,306).

Se ha observado que los efectos de la RUV sobre la CL son diferentes en función del grado de pigmentación cutánea. Un estudio australiano demostró que en aborígenes el descenso en el número de CL tras la exposición a la RUV estaba mediado por mecanismos de apoptosis; sin embargo, en descendientes



australianos celtas el descenso en estas células era secundario a la ruptura de la membrana celular y a daño en organelas celulares. Además, en los aborígenes la pérdida de CL fue menor y la recuperación más rápida, lo que sugiere que el grado de inmunosupresión local ejercido por la RUV es menor en personas con piel más oscura. Esto podría contribuir a la menor incidencia de cáncer cutáneo en la raza negra (307,308).

Por otro lado, la RUV induce la aparición de **LTreg CD4/CD25+**, que desempeñan un papel crucial durante el fenómeno de fotocarcinogénesis. Son capaces de inhibir funciones efectoras antitumorales y favorecer un microambiente inmunosupresor (302,309,310). Omland y colaboradores demostraron concentraciones elevadas de LTreg y citocinas con efecto quimiotáctico sobre los mismos (CCL17, CCL18, CCL22) en CBC de la cara y en la piel peritumoral y su ausencia en la piel normal no fotoexpuesta de los glúteos. Por tanto, la RUV favorece la formación de un nicho inmunosupresor que permite el desarrollo tumoral (311). Estudios previos en modelos animales demostraron que la exposición a la RUV amortiguaba parcialmente la respuesta inmunológica debido a la activación de los LTreg (309,310). Así pues, la presencia de LTreg alrededor de los nidos tumorales “debilitaría” la función de las CPA y los LT efectores favoreciendo el crecimiento tumoral (312).

### **3.2. CARCINOMA BASOCELULAR EN EL PACIENTE RECEPTOR DE TRASPLANTE DE ÓRGANO SÓLIDO (RTOS)**

Aproximadamente el 40-50% de los RTOS caucásicos en países occidentales y el 70-80% de RTOS en Australia desarrollarán al menos un CCNM durante los 20 años posteriores al trasplante (313). El interés se ha centrado en el CCNM en conjunto o en el CEC, disponiendo de pocos datos específicos sobre el CBC en esta población.

La mayoría de estudios apuntan que el CEC es el tumor cutáneo maligno predominante en RTOS, con una proporción CEC/CBC de 4:1, inversa a la de la población general, pero otros continúan reconociendo al CBC como el CCNM más frecuente en esta población, con una proporción CBC/CEC 1,1/1 (313–317). Los trasplantados tienen entre 10 y 16 veces más riesgo de desarrollar CBC respecto la población general y 65-250 veces más riesgo de desarrollar un CEC;

estas cifras se incrementan conforme aumenta la intensidad y la duración de la inmunosupresión (318). La latencia con la que aparece el primer tumor cutáneo es mayor en pacientes que reciben el trasplante a edades menores de 50 años. Esto se explica principalmente por el efecto acumulativo de la RUV (incluso previa al trasplante) en los pacientes trasplantados a mayor edad (319).

Los tumores cutáneos malignos en pacientes trasplantados tienen ciertas peculiaridades: son más agresivos e invasivos, tienen un índice de recurrencia local más elevado y mayor tendencia a desarrollar metástasis (318).

El principal factor de riesgo para desarrollar CCNM en los RTOS es la RUV. El 90% de los CEC en estos pacientes aparecen en zonas corporales fotoexpuestas y los trasplantados con fototipos altos presentan una menor incidencia de CCNM (320,321). Otros factores implicados son la disminución en la actividad inmunológica secundaria a los tratamientos inmunosupresores y los efectos oncogénicos directos vinculados a algunos de estos tratamientos (322).

Existe evidencia científica creciente de que el riesgo de desarrollar CCNM depende del grado de inmunosupresión y no del efecto de un fármaco en concreto. Los pacientes trasplantados cardíacos suelen requerir mayor inmunosupresión para evitar el rechazo y tienen 3 veces más riesgo de desarrollar un CEC que los trasplantados renales (322).

Los fármacos inhibidores de la calcineurina (tacrolimus, ciclosporina) tienen propiedades oncogénicas, principalmente vinculadas a la producción de citocinas que promueven el desarrollo tumoral y la angiogénesis (323,324). Hay estudios que demuestran un mayor riesgo de desarrollar tumores malignos en pacientes trasplantados de hígado y riñón en tratamiento con tacrolimus con respecto a los tratados con ciclosporina (325). Sin embargo, los datos no son concluyentes ya que un metaanálisis con 4102 pacientes en el que se comparaba el riesgo de desarrollar tumores malignos en pacientes trasplantados de riñón tratados con ciclosporina o tacrolimus no demostró diferencias (326).

La azatioprina, que actúa inhibiendo la síntesis y el metabolismo de las purinas, incrementa la sensibilidad del ADN a la RUV, favoreciendo el desarrollo de tumores cutáneos malignos (327). En el metaanálisis realizado por Jiyad y

colaboradores no se evidenció un incremento en el riesgo de desarrollar CBC en RTOS tratados con azatioprina y sin embargo sí que se evidenció más riesgo de CEC (328). Tampoco parece que el mofetil micofenolato (MMF), que actúa inhibiendo la biosíntesis de purinas *de novo*, incremente el riesgo de desarrollar cáncer cutáneo si se usa en monoterapia (329). Aguiar y colaboradores han publicado un estudio en una cohorte de pacientes trasplantados hepáticos y revelan que los pacientes en tratamiento con MMF en monoterapia tienen menor riesgo de cáncer (incluyendo CCNM) en comparación con los pacientes tratados con ciclosporina (330).

Hay escasos estudios que evalúan el riesgo potencial de CCNM en pacientes en tratamiento inmunosupresor con glucocorticoides. Parece ser que los pacientes que realizan tratamiento prolongado con glucocorticoides tienen más riesgo de CCNM (CEC y CBC) (331,332).

Los nuevos inmunosupresores inhibidores de la molécula diana de la rapamicina en mamíferos (mTOR) (sirolimus y everolimus) tienen efectos antiproliferativos, inmunomoduladores y antiangiogénicos. Existe evidencia científica que demuestra una disminución de la incidencia de CCNM, sin diferenciar CEC y CBC, en pacientes trasplantados en tratamiento con sirolimus en comparación con inhibidores de la calcineurina. En un metaanálisis que engloba a 5876 pacientes trasplantados procedentes de 21 ensayos clínicos, Knoll y colaboradores observaron una reducción del riesgo de desarrollar CCNM del 56% y una disminución global del riesgo de cáncer de cualquier localización en pacientes en tratamiento con sirolimus (333).

### **3.3. REGRESIÓN ESPONTÁNEA**

Otro hecho relevante y al que se ha prestado poca atención es que la regresión espontánea parcial es un fenómeno relativamente común en el CBC. Hay estudios que demuestran un incremento significativo en el número de LT CD3+, CD4+ y CD25+ en los CBC que presentan regresión frente a los que no la presentan. Se postula que la secreción de determinadas citocinas por los LT CD4+ activados podría inducir una respuesta antitumoral (227,334,335). Sin embargo, este fenómeno está poco estudiado y existe poca bibliografía al respecto.

### **3.4. INFILTRADOS INFLAMATORIOS TUMORALES**

El papel de los LIT en los CBC es poco conocido, pero posiblemente esencial. Disponemos de tres evidencias que sugieren que el CBC es un tumor inmunogénico que induce una respuesta inmunológica en el huésped sano. Primero, este tipo de tumores con frecuencia tienen un infiltrado inflamatorio peritumoral abundante. Segundo, los pacientes inmunodeprimidos presentan mayor riesgo de desarrollar CBC. Y tercero, la aplicación de inmunomoduladores tópicos (imiquimod, ingenol mebutato) puede inducir su regresión (227).

### **3.5. EJE PD-1/PD-L1 E INMUNOTERAPIA EN EL CARCINOMA BASOCELULAR**

La implicación del eje PD-1/PD-L1 en el CBC ha sido estudiada mediante técnicas IHQ en dos publicaciones, que apoyan su relevancia, sin diferenciar los distintos subtipos histológicos. En base a estos hallazgos y de forma anecdótica, existe escasa bibliografía sobre el empleo de fármacos inhibidores de puntos de control inmunitario en CBC no tributarios de otros tratamientos convencionales (295,297,336–339).



## **4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



#### **4.1. HIPÓTESIS**

1. A pesar de que las vías moleculares implicadas en el desarrollo del CBC parecen comunes en los diferentes subtipos histológicos, existen diferencias en la carga de alteraciones genéticas en las propias células tumorales o en el microambiente tumoral que explican por qué unos son de bajo riesgo y otros de alto riesgo.
2. Uno de los factores clave para el comportamiento invasivo del CBC puede ser la ausencia o ineficacia de la respuesta inmune antitumoral.
3. La identificación de biomarcadores en el CBC puede favorecer el desarrollo de enfoques terapéuticos novedosos frente a dianas moleculares específicas.



## **4.2. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO PRINCIPAL**

1. Búsqueda de biomarcadores que ayuden a explicar el diferente comportamiento biológico de los diversos subtipos de CBC mediante análisis de expresión de ARNm.

### **OBJETIVOS SECUNDARIOS**

2. Investigar si hay marcadores moleculares de la respuesta inmunológica antitumoral que se correlacionan con un comportamiento local más agresivo, postulando que la respuesta inmunológica antitumoral puede ser determinante como ocurre en otros tumores.
3. Comparar la expresión de ARNm en el CBC respecto a otros tumores extracutáneos.

## **5. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 5.1. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS

Se incluyeron en el estudio 25 CBC del archivo de Anatomía Patológica del Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH): 4 superficiales, 6 nodulares, 7 infiltrantes, 3 morfeiformes y 5 CBC de pacientes con SG diagnosticados según los criterios establecidos. Se utilizaron muestras archivadas en parafina de menos de 3 años de antigüedad. Todos los tumores cumplían las siguientes características:

- Se trataba de extirpaciones completas
- No habían sido tratados previamente con cirugía, tratamientos tópicos, crioterapia ni RT.
- No se había realizado biopsias incisionales

Todas las muestras de tumores fueron revisadas por la autora del trabajo, el Prof Dr. Vicenç García-Patos Briones y la dermatopatóloga del HUVH, Berta Ferrer Fàbrega.

En todos los casos se disponía de los siguientes datos epidemiológicos: edad y sexo del paciente y localización de la lesión. No se incluyeron muestras de pacientes inmunodeprimidos.

## 5.2. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

### 5.2.1. Secuenciación de ARN

Se ha realizado la secuenciación de ARN de 25 muestras de CBC y 7 muestras de cáncer de mama (control) utilizando la plataforma Illumina HiSeq 2500 con un total de 300-1000 ng de ARN total proveniente de tejidos fijados y embebidos en parafina. La creación de la librería se realizó con el protocolo *Illumina TruSeq Stranded Total RNA LT with Ribo-Zero™ Gold (RS-122-2301NA)*. La secuenciación se ha realizado en la plataforma Illumina HiSeq 2500 con 2 librerías multiplexadas por carril utilizando lecturas de “100-bp paired-end”. Tras la secuenciación, utilizamos el paquete CASAVA 1.8.2. para analizar las lecturas y generar los ficheros FASTQ. Los alineamientos de las secuencias detectadas al genoma humano se han realizado utilizando la librería “hg19+chrM\_rCRS”. El paquete “TCGA GAF version 2.1.” se ha utilizado para determinar las isoformas de los genes. El número de lecturas de exones y el RPKM se ha basado en el “MapSplice genome alignment31 (v12\_07)”. Los niveles de transcritos estimados se han evaluado en el formato generado por “RSEM32 (v1.1.13.)”. Los datos normalizados de las lecturas se han evaluado en ficheros independientes.

### 5.2.2. Análisis estadístico

Para comparar los datos de expresión génica entre los diferentes subgrupos de CBC (superficiales, nodulares, infiltrantes, morfeiformes, SG) utilizamos la técnica *Significant Analysis of Microarrays* (SAM) y las técnicas de clasificación supervisada o no supervisada (*cluster*). El display gráfico mediante *heatmaps* se realizó con Java TreeView. Para corregir el valor *P*, dadas las múltiples comparaciones que realizamos, utilizamos la *False Discovery Rate* del paquete SAM. Realizamos análisis de la varianza (ANOVA) para comparar las diferencias significativas entre algunos genes en concreto. Para el análisis pancáncer, utilizamos datos de *RNA-sequencing* (RNA-seq) del proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). Los datos crudos están disponibles en el portal del TCGA (<https://tcga-data.nci.nih.gov/docs/publications/tcga/>). Los datos estadísticos se realizaron mediante código R 3.2.1. ([www.r-project.org/](http://www.r-project.org/)). Finalmente, para identificar procesos biológicos a partir de la lista de genes, utilizamos el programa abierto online DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>).

### 5.3. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Se contactó con los pacientes de los que procedían las muestras y se solicitó autorización mediante consentimiento informado para la utilización en este estudio de los tumores previamente extirpados con finalidad terapéutica (**tabla 6**).

La aprobación del uso del tejido en investigación se obtuvo de Comité Ético del HUVH. El protocolo del estudio y su consentimiento informado fue aprobado por el mismo.

La base de datos del estudio se guardó de forma codificada en un ordenador protegido con usuario y contraseña y solo tenían acceso los investigadores principales del estudio. No se guardó información personal con la que se pudiera inferir en la identidad de los pacientes.

**Tabla 6.** Modelo de consentimiento informado para la utilización de las muestras tumorales.

Título del estudio: VÍAS MOLECULARES IMPLICADAS EN LOS DISTINTOS SUBTIPOS HISTOLÓGICOS DE CARCINOMA BASOCELULAR

Yo (nombre y apellidos) \_\_\_\_\_

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He hablado con: Dra. Patricia Bassas Freixas (Hospital Universitari Vall d'Hebron. Passatge de la Vall d'Hebron 119-129, 08034. Teléfono 93 274 6000)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- 1 Cuando quiera
- 2 Sin tener que dar explicaciones
- 3 Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

**Punto 1:**  DOY  NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que pueda realizarse el estudio sobre posibles factores genéticos relacionados con la enfermedad *CARCINOMA BASOCELULAR* en mi muestra de ADN.

Fecha y firma del participante

Fecha y firma del investigador

## **6. RESULTADOS**





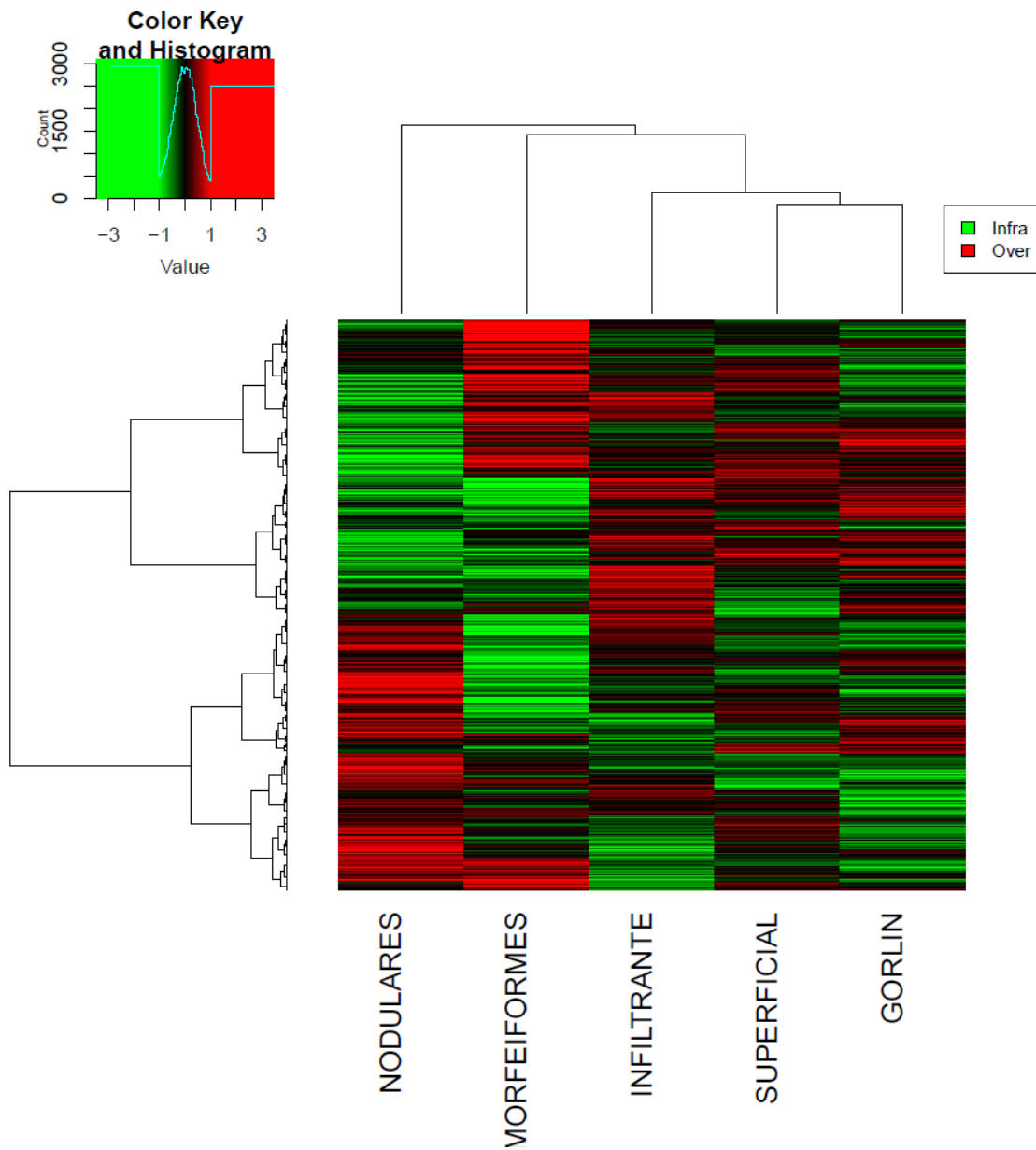
## 6. RESULTADOS

### Identificación de perfiles de expresión asociados a los distintos tipos de carcinoma basocelular

Para identificar genes asociados a cada tipo de CBC, primero realizamos un análisis SAM multiclase con todos los genes ( $n=18.043$ ) y todas las muestras ( $n=25$ ), agrupadas (nodulares, morfeiformes, infiltrantes, superficiales y de pacientes con SG). El resultado fue la identificación de 407 genes cuya expresión se asoció de forma significativa a uno de los 5 grupos de CBC (*False Discovery Rate* < 5%). La gran mayoría de los 407 genes se asociaron a glicoproteínas (p.e. ADAMTS18, BMP5), inmunoglobulinas (p.e. CD4, THY1), producción de IFN- $\gamma$  (p.e. TNF, LTA) y presentación de antígenos (p.e. CD74, HLA-DMA). La lista de genes se expone en el **anexo**.

A continuación, realizamos un análisis supervisado con todos los genes y todas las muestras (combinando las muestras pertenecientes a cada grupo en 1 solo grupo). En general, la expresión génica pudo distinguir cada grupo de CBC. Como se puede observar en la **figura 9**, los CBC nodulares y morfeiformes mostraron un perfil de expresión global muy distinto al resto de grupos (superficiales, asociados a SG e infiltrantes).

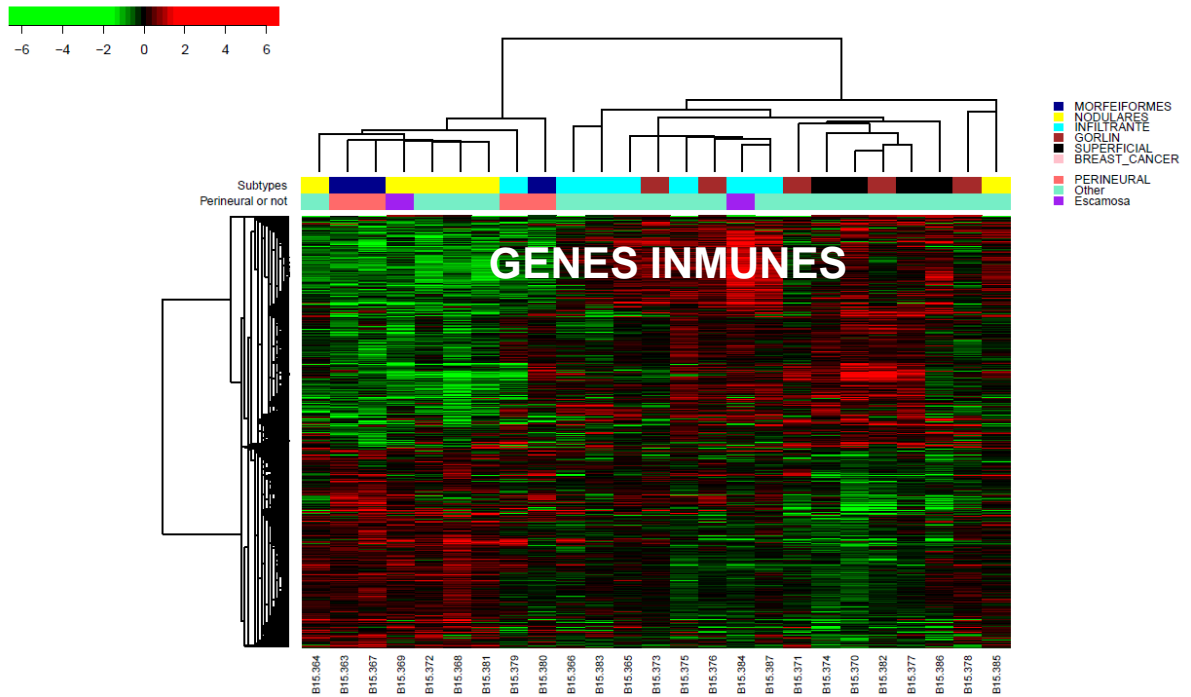
**Figura 9.** Análisis supervisado de todos los genes (n=18.043) y todas las muestras (n=25). Cada fila es un gen y cada columna un grupo. El color rojo representa sobreexpresión del gen y el color verde infraexpresión.



A nivel individual, realizamos un análisis no supervisado con los genes que mostraron más variabilidad de expresión en la base de datos (n=1.761) y las 25 muestras individuales. En la **figura 10**, se observa el resultado. Como era de esperar, 5 de las 6 muestras de CBC nodulares se encontraron juntas en la parte izquierda del *heatmap*. Los CBC superficiales se encontraron en el lado derecho y los CBC infiltrantes en la parte media. Ahora bien, se detectó cierta heterogeneidad. Por ejemplo, las 3 muestras de CBC morfeiformes se encontraron junto a las muestras de CBC nodulares, mientras que las muestras de CBC en el contexto de SG estaban entremezcladas entre las de los tumores infiltrantes y de los superficiales.

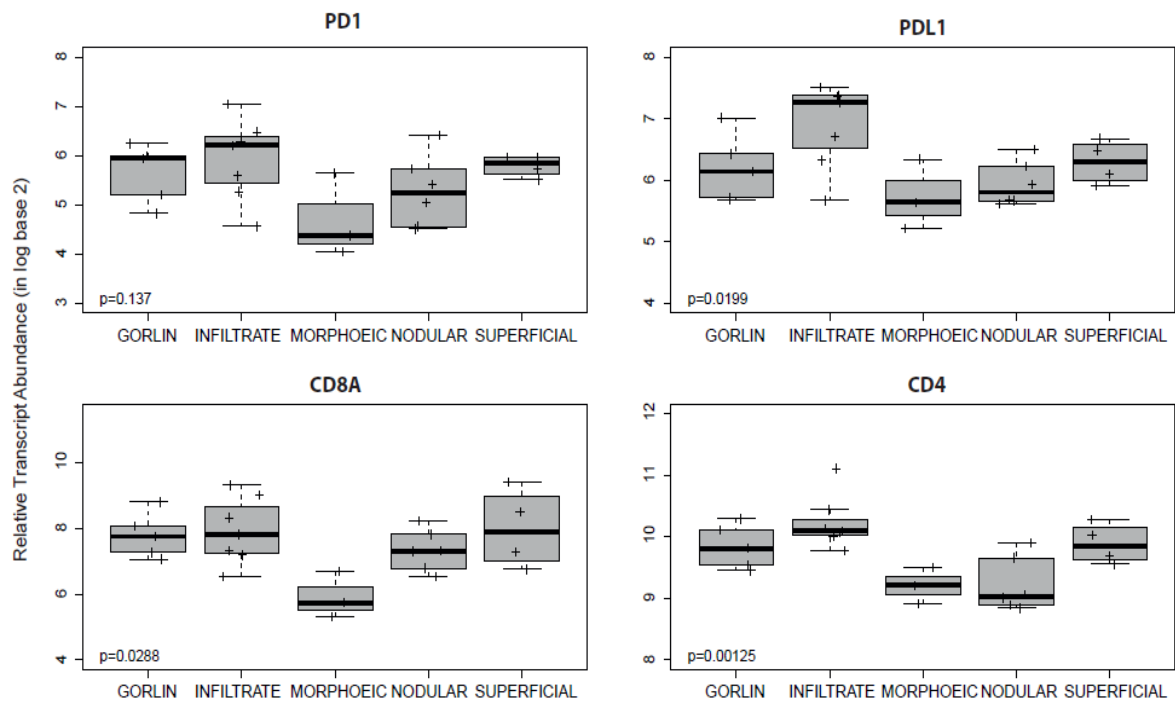
Como hallazgo muy interesante, encontramos que esta clasificación no supervisada estaba explicada, en gran parte, por la expresión de un grupo de genes relacionados con el sistema inmune (p.e. CD8A, GZMM e IL12B). Este grupo de 120 genes mostró una baja expresión en los CBC nodulares y morfeiformes, una elevada expresión en la mayoría de tumores infiltrantes, y una expresión intermedia en los superficiales.

**Figura 10.** Análisis no supervisado de los genes más variables (n=1.761) y todas las muestras (n=25). Cada fila es un gen y cada columna un grupo. El color rojo representa sobreexpresión del gen y el color verde infraexpresión.



Para corroborar estos datos, analizamos la expresión de genes individuales presentes en el *cluster* y relacionados con la infiltración por LT. Como se puede observar en la **figura 11**, los CBC infiltrantes tenían mayor expresión de genes codificadores de proteínas inmunomoduladoras, como *PD-1*, *PD-L1*, *CD8A* y *CD4* comparado con el resto, sobre todo comparado con el grupo de CBC morfeiformes.

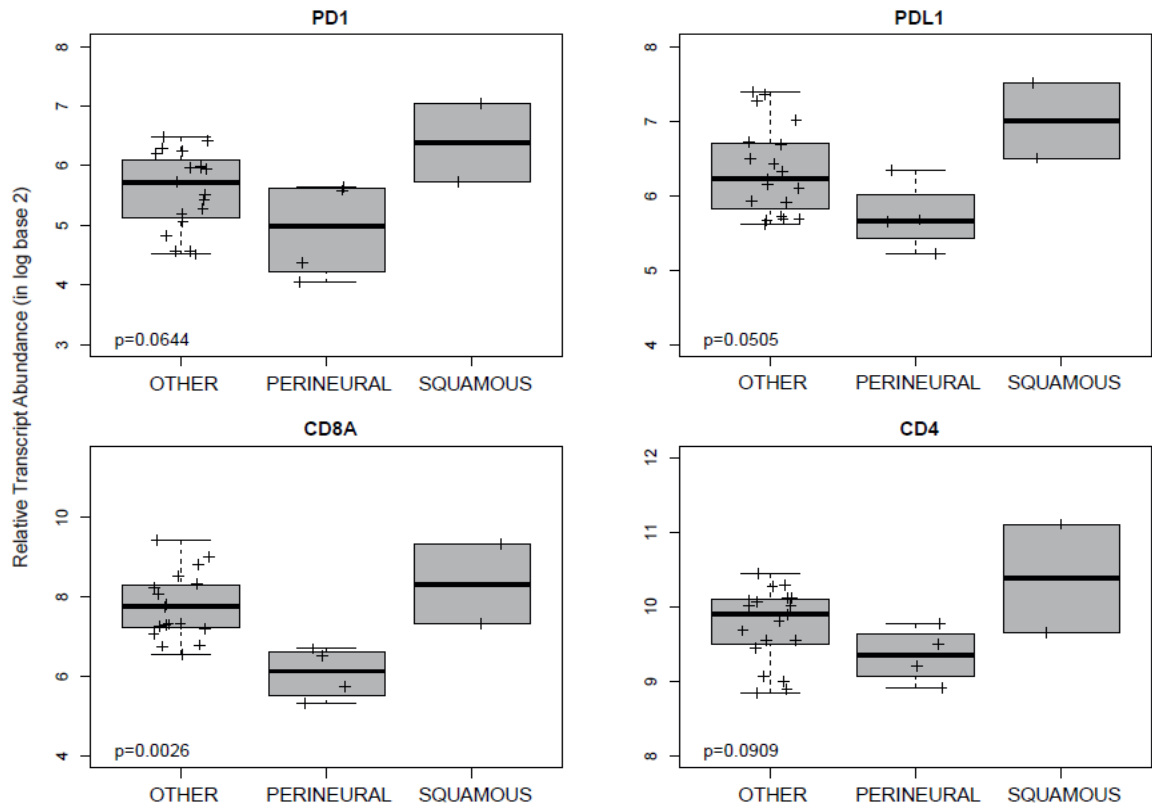
**Figura 11.** Expresión de genes inmunes seleccionados en los carcinomas basocelulares. El valor  $p$  denota si existen diferencias significativas en las medias de expresión de cada gen en los 5 grupos.



En el *heatmap* de la **figura 10**, observamos también que los 4 casos de CBC con infiltración perineural estaban incluidos en el *cluster* asociado a baja expresión de estos genes relacionados con la inmunidad (*PD-1*, *PD-L1*, *CD8A* y *CD4*). En cambio, de los dos casos con diferenciación escamosa, uno tenía una elevada expresión de dichos genes y el otro no. Para visualizar estos datos de una forma más directa, realizamos *whisker-plots* agrupando las muestras en 3 categorías (CBC con invasión perineural, CBC con diferenciación escamosa y otros). Como se puede observar en la **figura 12**, los casos con infiltración perineural, mostraron una expresión más baja de los 4 genes anteriormente citados (*PD-1*, *PD-L1*, *CD8A* y *CD4*) en comparación con los otros dos grupos.



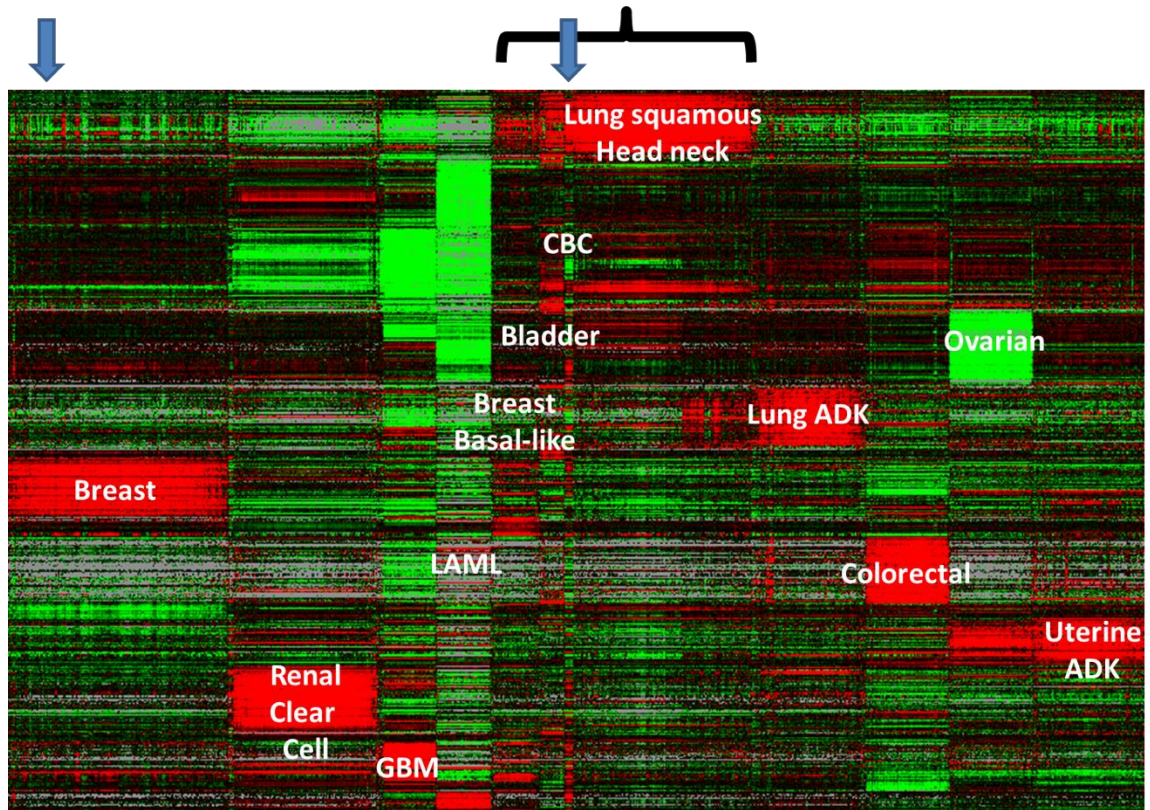
**Figura 12.** Expresión de genes relacionados con la respuesta inmune (*PD-1*, *PD-L1*, *CD8A* y *CD4*) en los subgrupos de carcinoma basocelular con infiltración perineural, diferenciación escamosa y el resto. El valor  $p$  denota si existen diferencias significativas en las medias de expresión de cada gen en los 3 grupos.



## **Comparación molecular del carcinoma basocelular con otros cánceres**

El proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) ha permitido caracterizar molecularmente numerosos tipos de cáncer. Sin embargo, no está previsto incluir en esta caracterización al CBC. Por ello decidimos combinar nuestros datos de expresión génica mediante RNA-seq con los datos de RNA-seq del TCGA. Para realizar este análisis y estar seguros de que los datos eran comparables, añadimos 7 muestras de cáncer de mama del tipo hormon sensible utilizando el mismo protocolo que para las muestras de CBC. Posteriormente, realizamos un análisis supervisado con 16.116 muestras del TCGA (representando 12 tipos de cáncer) más las 25+7 muestras del proyecto, y un total de 550 genes que discriminan los 12 tipos de cáncer (**figura 13**). Como era de esperar, las 7 muestras de cáncer de mama secuenciadas se encontraron dentro del grupo de cáncer de mama. En cambio, las 25 muestras de CBC se encontraron juntas entre los tumores escamosos de pulmón y cabeza y cuello, los tumores de vejiga y los tumores de mama triple negativos.

**Figura 13.** Análisis supervisado de 16.116 muestras de 12 cánceres del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) y las 25+7 muestras del proyecto. Las flechas azules señalan la localización de las muestras del proyecto. El color rojo representa sobreexpresión del gen y el color verde infraexpresión.



## **7. DISCUSIÓN**



## **7. DISCUSIÓN**

### **7.1. CARCINOMA BASOCELULAR: DE ACTOR SECUNDARIO A PRINCIPAL EN DERMATO-ONCOLOGÍA**

El CBC es el tumor maligno más frecuente en caucásicos (si se excluyen las queratosis actínicas) y su incidencia está claramente en aumento. El impacto económico en el gasto oncológico global es enorme; en Estados Unidos es el 5º tumor maligno que más gasto ocasiona en Medicare (340). Posiblemente en el futuro inmediato este gasto aumente en previsión del envejecimiento de la población, los hábitos de exposición al sol y el incremento global en el número de RTOS. A pesar de su elevada incidencia y de que en ocasiones añade una morbilidad significativa, es un "tumor huérfano" desde el punto de vista de la investigación oncológica.

Se presenta de formas clínicas e histológicas distintas, que se traducen en comportamientos biológicos diferentes. A pesar de que la mayoría suelen ser tumores de crecimiento lento y que raramente desarrollan metástasis, algunos son localmente invasivos y pueden causar una morbilidad importante. Disponemos de múltiples modalidades de tratamiento, entre las cuales la cirugía es la más empleada. Sin embargo, existe un pequeño, pero no desdeñable, grupo de pacientes que desarrolla tumores agresivos que en ocasiones suponen un verdadero reto terapéutico.

El descubrimiento de la implicación de la vía de señalización Hh en la patogenia de estos tumores ha sido crucial para diseñar tratamientos dirigidos frente a dianas moleculares como vismodegib y sonidegib. Ambos fármacos han supuesto un avance en el tratamiento del CBCla y CBCm. Sin embargo, su perfil de efectos secundarios y la aparición de resistencias limitan su uso. A pesar de que los CBC comparten determinadas alteraciones moleculares, como mutaciones en diferentes niveles en la vía de señalización Hh, desconocemos el mecanismo por el cual aparecen formas clínicamente distintas que se correlacionan con la presentación histológica y que determinan su comportamiento biológico. Seguramente el grado de activación de la vía de señalización Hh, la proteína de la vía inicialmente alterada y la interacción con

otras vías de señalización son cruciales y tienen un papel determinante en la agresividad intrínseca del CBC, pero posiblemente hay otros factores implicados.

En este estudio hemos pretendido identificar diferencias moleculares que justifiquen el comportamiento biológico de los distintos subtipos histológicos de CBC e identificar nuevas dianas moleculares que posibiliten tratamientos dirigidos en tumores refractarios.

## **7.2. APLICACIÓN DE RNA-SEQ EN EL CARCINOMA BASOCELULAR**

En el proceso de expresión génica, las secuencias de ADN son copiadas a ARNm mediante el proceso denominado "transcripción". La información codificada en la molécula de ARNm es interpretada en un proceso denominado "traducción" que tiene como fin la construcción de la proteína.

El RNA-seq es una de las mejores tecnologías de secuenciación masiva disponibles en la actualidad. Supone un avance importante en la comparación de concentración de ARNm y proteína al ser más precisa que otras técnicas y permitir una mejor cuantificación de los niveles de transcripción que subyacen una determinada proteína (341). Se trata de una herramienta que se ha empleado en el descubrimiento de nuevos marcadores moleculares para el diagnóstico y predicción de la evolución de distintos tipos de cáncer, entre los que se encuentra el CEC, pero su empleo para el estudio de CBC es un hecho novedoso (294). Entre sus ventajas señalar, que permite su realización en muestras de tejido conservadas en parafina.

Hay pocos estudios que investiguen las vías moleculares implicadas en los distintos subtipos de CBC y, aún menos, con técnicas de secuenciación de ARN. En un estudio publicado en 2016 que compara el perfil genético de CBC de alto riesgo de recurrencia (morfeiformes y con diferenciación escamosa) con CBC de bajo riesgo (nodulares y superficiales) hallan que el grupo con elevado riesgo de recurrencia alberga, además de las mutaciones ya bien conocidas en proteínas de la vía Hh (*PTCH1*, *SMO*, *SUFU*), mutaciones en los genes *MYCN* (30%), *PPP6C* (15%), *STK19* (10%), *LATS1* (8%), *ERBB2* (4%), *PIK3CA* (2%), *NRAS*, *KRAS* o *HRAS* (2%) y pérdida de función y mutaciones sin sentido en *PTPN14* (23%), *RB1* (8%) y *FBXW7* (5%) en comparación con el grupo con bajo riesgo.

Todo ello sugiere que hay otras vías moleculares implicadas en el CBC que pueden contribuir en su patogenia y ser determinantes en su diversidad fenotípica (342). Sin embargo, trabajar con ADN ofrece desventajas respecto al ARN o la proteómica, ya que puede haber mutaciones germinales en éste que no sean relevantes en la patogenia del tumor.

Hemos realizado un análisis de la expresión génica empleando RNA-seq en una serie de 25 tumores. Se han seleccionado CBC que no habían recibido ningún tratamiento previo ni habían sido sometidos a biopsias incisionales para evitar alteraciones en el microambiente tumoral y así obviar la expresión de genes (ARNm) relacionados con la respuesta terapéutica o la cicatrización que puedan diluir y/o enmascarar ARNm involucrados en la patogenia del tumor.

### **7.3. MÁS DE 400 GENES DIFERENCIAN LOS DISTINTOS SUBTIPOS DE CARCINOMA BASOCELULAR**

En primer lugar, realizamos un análisis SAM multiclase con todos los genes y todas las muestras agrupadas, para identificar genes que se expresan de forma diferente entre los grupos. Identificamos 407 genes cuya expresión es diferencial; la mayoría de estos genes están asociados a glicoproteínas, producción de IFN- $\gamma$ , inmunoglobulinas y presentación de antígenos.

### **7.4. PERFILANDO DIFERENCIAS EN LA EXPRESIÓN DE ARNm EN LOS DISTINTOS SUBTIPOS DE CARCINOMA BASOCELULAR**

El análisis supervisado permite comparar la expresión de ARNm entre los distintos subgrupos de CBC. Evidenciamos que los CBC nodulares y morfeiformes mostraban un perfil de expresión global muy distinto al resto de subgrupos (superficial, SG e infiltrante). Es posible que las formas nodulares y morfeiformes compartan más vías patogénicas y alteraciones moleculares que los superficiales y los infiltrantes (claramente diferentes por la expresión de genes inmunológicos).

### **7.5. UN GRUPO DE GENES IMPLICADOS EN LA INMUNIDAD DIFERENCIA LOS CARCINOMAS BASOCELULARES INFILTRANTES**

Los diferentes subtipos histológicos tendieron a agruparse en el análisis no supervisado de los genes más variables y todas las muestras. De forma similar, los CBC de pacientes con SG se localizaron entre los subtipos histológicos a los



que pertenecían (3 superficiales, 1 nodular y 1 infiltrante). Este análisis reveló la presencia de un *cluster* de 120 genes relacionados con la inmunidad que mostraron una elevada expresión en los CBC infiltrantes. Al analizar este *cluster* de genes inmunes hallamos que los CBC infiltrantes mostraban mayor expresión de PD-1, CD8A, CD4 y, significativamente, de PD-L1 comparado con el resto, sobre todo comparado con el grupo de CBC morfeiformes. Esto sugiere que, a pesar de que el huésped no inmunodeprimido es capaz de desencadenar una respuesta inmunológica frente al CBC infiltrante, ésta puede resultar insuficiente y/o ineficaz para controlar el desarrollo tumoral cuando éste expresa moléculas que bloquean la respuesta antitumoral mediada por las células T, permitiéndole así eludir los mecanismos anti-tumorales del huésped. Sin el tratamiento adecuado este tipo de tumores entrañan mayor agresividad local y riesgo de recidiva. En los pacientes inmunodeprimidos esta respuesta inmunológica es menor o está ausente, hecho que justifica que desarrollen tumores más agresivos e invasivos. Este grupo de genes mostró una baja expresión en los CBC nodulares y morfeiformes y una expresión intermedia en los superficiales.

#### **7.6. EJE PD-1/PD-L1 EN EL CARCINOMA BASOCELULAR COMO BIOMARCADOR Y PRONÓSTICO**

Existen dos estudios sobre el papel del eje PD-1/PD-L1 en el CBC mediante técnicas IHQ; ninguno utilizando RNA-seq ni diferenciando los distintos subtipos histológicos de CBC.

El primer artículo que proporciona información sobre la IHQ frente a PD-L1 en el CBC es el publicado por Chang y colaboradores. Evaluaron su expresión en muestras de CBC en parafina (emplearon el anticuerpo monoclonal murino anti-PD-L1, clona 2B11D11 de Proteintech) e identificaron los LIT con anticuerpos anti-CD8 y anti-CD3. La expresión de PD-L1 en las células tumorales y la de PD-L1, CD8 y CD3 en los LIT fue evaluada a ciegas por un dermatólogo y un dermatopatólogo. Se midió la intensidad de la tinción con anti-PD-L1 utilizando una escala numérica de 0 a 3 (0=ausencia, 1=leve, 2=moderada, 3=fuerte), la proporción de células CD8+/CD3+ en los LIT de una sección del tumor representativa y el total de células CD3+ y CD4+ del mismo campo. Incluyeron 138 CBC de 62 pacientes, de los que un 43,5% (60 CBC de 40 pacientes) no habían sido tratados con anterioridad y 56,5% (78 CBC de 29 pacientes) habían

recibido algún tratamiento previo. Los tratamientos previos realizados incluían cirugía (n=25), RT (n=9), quimioterapia sistémica (n=58) y quimioterapia tópica (n=22). Entre los tratamientos sistémicos administrados se incluían inhibidores de Smo (n=47), quimioterapia con compuestos basados en platino (n=10) y gefitinib (n=5). Entre los tratamientos tópicos se encontraban el fluorouracilo (n=21) y el imiquimod (n=1). Un 19% de los CBC habían recibido más de un tratamiento. La localización más habitual de los tumores fue en la cabeza y el cuello (64,5% [89 de 138]), seguida del tronco (30,4% [42 de 138]) y extremidades (5,1% [7 de 138]). El subtipo histológico más frecuente fue el nodular (42% [58 de 138]), seguido del superficial (21% [29 de 138]). En el análisis bivariable los tumores tratados se asociaron a menor edad (58,6 años vs 65,5 años,  $p=0,001$ ) y a la localización anatómica, con una mayor proporción en el tronco (43,6% [34 de 78] frente a 13,3% [8 de 60],  $p<0,001$ ), en comparación con los tumores que no habían sido tratados.

Se observó expresión de PD-L1 en las células tumorales y en los LIT en un 89,9% (124 de 138) y 94,9% (131 de 138) de las muestras, respectivamente (con un umbral de más de un 5% de expresión). El porcentaje medio de tinción IHQ positiva para PD-L1 entre todos los CBC fue del 50% en las células del tumor y del 50% en los LIT. Se observó una tinción evidente para PD-L1 (moderada o fuerte, con grados de intensidad en la escala de 2 o 3 sobre 3) en las células tumorales y en los LIT en un 21% (29 de 138) y 34,8% (48 de 138) de las muestras, respectivamente. La proporción media de células CD8+/CD3+ fue del 30%. Un hallazgo interesante fue que la expresión de PD-L1 fue significativamente mayor en los CBC que habían sido tratados con anterioridad que en los no tratados, tanto en las células tumorales (32% frente 7%,  $p=0,003$ ) como en los LIT (47% frente 18%,  $p=0,008$ ). Con el fin de determinar si un tratamiento en particular se asociaba con un incremento en la expresión de PD-L1, se compararon los CBC tratados con inhibidores de Smo (n=47), los que habían recibido otros tratamientos (n=31) y los no tratados (n=60). PD-L1 estaba presente con más intensidad en las células del tumor y en los LIT de los CBC tratados (con inhibidores de Smo u otros tratamientos) que en los no tratados ( $p<0,05$ ). La proporción media de células CD8+/CD3+ en los LIT fue similar en ambos grupos. También evaluaron si el número de tratamientos previos

realizados se asociaba con la expresión de PD-L1 mediante análisis multivariable ajustado a la edad, sexo y localización del CBC. No encontraron asociación entre el número de tratamientos realizados y el porcentaje de células tumorales y LIT positivos para PD-L1, ni con la proporción de células CD8+/CD3+ en los LIT. Sin embargo, sí que se halló asociación entre la intensidad de expresión de PD-L1 en las células tumorales y el número de tratamientos previos realizados; a más tratamientos realizados mayor intensidad de expresión (336). Este hallazgo es similar a lo observado en otros tipos de tumores: por ejemplo, el CPNM expresa niveles más elevados de PD-L1 tras adquirir resistencia al tratamiento con gefitinib, respecto de los valores de tinción de las muestras tumorales de antes del tratamiento (343). Del mismo modo, la expresión de PD-L1 en las CD de pacientes con cáncer de próstata resistente a inhibidores del receptor de andrógenos es más elevada que en los que no han recibido el tratamiento (344). En modelos murinos con cáncer de mama y de ovario, la expresión IHQ de PD-L1 se incrementa si antes han sido tratados con RT o quimioterapia (268,345).

En comparación con otros tumores epiteliales, los CBC de esta publicación presentan valores muy elevados de tinción IHQ frente a PD-L1: casi un 90% de los CBC. Al comparar los datos obtenidos con los de otros tumores evidenciamos que solo un 40% de los adenocarcinomas de pulmón que no han sido tratados son positivos para PD-L1 (utilizando el mismo umbral de más del 5% de células del tumor positivas y el mismo anticuerpo monoclonal anti-PD-L1) y un 64% de carcinomas escamosos de boca (en una muestra con un 93% de tumores no tratados, empleando un umbral de positividad para la tinción de PD-L1 mayor del 5% y sin especificar el anticuerpo monoclonal utilizado) (346,347).

Como limitaciones de esta publicación, resaltar que el tamaño de la muestra de CBC que han recibido más de un tratamiento es pequeño. Por otro lado, las muestras de tumores provienen de un centro especializado en CCM, lo que puede suponer un sesgo al seleccionar mayor proporción de pacientes con tumores de alto riesgo; esto explicaría que la expresión de PD-L1 en este estudio fuese mayor que en una muestra de CBC de un centro no especializado. Tampoco disponen de muestras del tumor previas al tratamiento que permitan comparar los valores IHQ de PD-L1 antes y después del mismo, ni valoran la expresión IHQ de PD-L1 en función del subtipo histológico del CBC. La expresión

IHQ de PD-L1 está asociada al número de tratamientos realizados; quizás sea consecuencia directa de un mayor número de tratamientos o tal vez refleje un comportamiento intrínseco más agresivo del tumor, como parece que ocurre en el MM. Este hallazgo es importante ya que puede suponer la identificación de un nuevo biomarcador con valor pronóstico y de tratamiento en el CBC (336).

En el segundo estudio, Lipson y colaboradores investigaron la expresión de PD-L1 en las células tumorales del CBC y su asociación con la expresión de PD-1 en el infiltrado inflamatorio peritumoral. Emplearon bloques representativos de los tumores para realizar el marcaje con anti-PD-L1 (anticuerpo monoclonal murino anti-PD-L1 5H1 de Liepig Chen, Universidad de Yale) y anti-PD-1 (anticuerpo monoclonal murino, clona Nat105). La expresión de PD-L1 se evaluó en las células del tumor y del infiltrado inflamatorio, con un umbral de al menos un 5% de células positivas con un patrón de membrana.

Seleccionaron 40 CBC de 40 pacientes. Todos eran CBC localmente agresivos o recidivas, con tamaños entre 2 y 15 cm. No definieron los subtipos histológicos de los CBC incluidos. Todos los tumores tenían grados variables de LIT. Un 22% (9 de 40) expresaban PD-L1 en las células del tumor y un 82% (33 de 40) en los LIT y en los macrófagos acompañantes. Se observó expresión de PD-1 en los linfocitos del microambiente tumoral de todos los tumores, incluso en aquellos con escaso infiltrado linfocitario (40%, 16 de 40). En todos los CBC que expresaban PD-L1 en sus células tumorales o en los macrófagos (33 de 33) se observaron LIT marcados con PD-1 en su proximidad. Si no había LIT marcados cercanos, las células tumorales no expresaban PD-L1 en ningún caso.

En los CBC de este estudio se evidencia que la expresión de PD-1 y PD-L1 acontece simultáneamente en zonas próximas, lo que sugiere que una modulación adecuada de la inmunidad podría, potencialmente, contener el desarrollo del tumor. La expresión de PD-1/PD-L1 emerge como nuevo biomarcador útil para seleccionar qué pacientes con CBCa o resistentes a los inhibidores de la vía Hh pueden beneficiarse de la oncoimmunoterapia (337).

Sabemos que otro de los datos que entraña peor pronóstico y asocia mayor riesgo de recurrencia es la presencia de invasión perineural, que oscila entre el 0,18% y el 10% según las series (348–350). Es más frecuente en subtipos

histológicos morfeiformes, tal y como observamos en nuestra serie donde todos los CBC morfeiformes la presentaban (351,352). En nuestro análisis los 4 tumores con invasión perineural (3 de ellos morfeiformes y 1 infiltrante) se encontraron en el *cluster* asociado a baja expresión de genes inmunológicos. Esto concuerda con el hecho de que en una gran parte de CBC morfeiformes la respuesta inflamatoria acompañante suele ser escasa, hallazgo que hemos constatado al revisar las anatomías patológicas. Quizás la agresividad de este tipo de tumores esté condicionada por una escasa capacidad antigénica y por una mala delimitación clínica de la masa tumoral, y no por la capacidad de neutralizar la respuesta inmunológica antitumoral a través de la expresión de proteínas de control inmunitario como PD-1 y PD-L1.

Al comparar la expresión de PD-L1 y PD-1 de los CBC con diferenciación escamosa, con invasión perineural y "resto" hallamos que el grupo con mayor expresión fue el de los tumores con diferenciación escamosa. En este mismo análisis el grupo con menor expresión de PD-L1 fue el grupo de CBC con invasión perineural (grupo mayoritariamente representado por CBC morfeiformes). Como se ha comentado con anterioridad, es posible que la baja expresión de PD-1 y PD-L1 en el subgrupo con invasión perineural no sea atribuible a la presencia o no de ésta y esté condicionada por el subtipo histológico predominante incluido en este subgrupo. Valdría la pena determinar si la presencia de invasión perineural es un factor independiente en la expresión de PD-1 y PD-L1 en futuros estudios. De los CBC con diferenciación escamosa, uno mostró elevada expresión de PD-1, PD-L1, CD4 y CD8 y el otro no. El comportamiento más agresivo de este tipo de tumores podría estar condicionado por la capacidad del tumor de evadir la respuesta antitumoral a través de la expresión de moléculas como PD-L1. Sin embargo, es necesario analizar más muestras, ya que la escasa representación de tumores con diferenciación escamosa en nuestro estudio no nos permite extraer conclusiones.

## **7.7. COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ARNm DEL CARCINOMA BASOCELULAR CON OTROS CÁNCERES**

El proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, "El Atlas del Genoma del Cáncer", en español), al que es posible acceder de forma pública, ha permitido conocer los perfiles moleculares de diversos tipos de cáncer y así desarrollar "mapas" de las alteraciones genómicas de 33 tipos de tumores malignos. Identificar modificaciones en el ADN de un tumor (es decir, su genoma) y entender cómo estos cambios impactan en su desarrollo es esencial para mejorar la prevención, detección y tratamiento del cáncer. Al combinar nuestros datos de expresión génica mediante secuenciación de ARN con los datos de RNA-seq del TCGA hallamos que las 25 muestras de CBC se ubicaron juntas entre los tumores escamosos de pulmón y cabeza y cuello, los tumores de vejiga y los tumores de mama triple negativos. La inmunoterapia emerge como un tratamiento innovador y prometedor para pacientes con estos tipos de cáncer. Esto nos permite hipotetizar que es posible que el CBC comparta alteraciones genómicas con estos tumores y que, por lo tanto, los tratamientos empleados para los cánceres escamosos de pulmón y cabeza y cuello, los tumores de vejiga y los tumores de mama triple negativos, entre los que se encuentra la inmunoterapia, resulten de utilidad en su tratamiento.

## **7.8. INMUNOTERAPIA Y CARCINOMA BASOCELULAR**

En base a nuestros hallazgos y los escasos conocimientos publicados, postulamos que los fármacos inhibidores del eje PD-1/PD-L1 pueden ser una alternativa terapéutica para CBCIa o CBCm que no han respondido a otros tratamientos, incluyendo los inhibidores de la vía de señalización Hh. Revisando las publicaciones disponibles, solo hemos encontrado casos aislados de pacientes con CBC que han recibido estos tratamientos.

En enero de 2016, Mohan y colaboradores describieron el caso de un paciente con un MM metastásico tratado con ipilimumab en el que se observó la regresión incidental de un CBCIa (338). Más adelante, Ikeda y colaboradores publicaron otro caso similar: se trataba de varón de 58 años con un CBCm (con afectación ósea, pulmonar, cerebral y hepática) que había recibido varios tratamientos

(vismodegib, cisplatino, paclitaxel, sonidegib y buparlisib), suspendidos por progresión de la enfermedad o por toxicidad. Administraron nivolumab intravenoso cada dos semanas y a los 4 meses se evidenció una resolución casi completa de las metástasis hepáticas (339). En otro paciente con un CBCm en tratamiento con pembrolizumab, la enfermedad permaneció estable durante meses (297). En noviembre de 2016, Falchook y colaboradores describen un paciente con un CBCm en tratamiento con REG N2810, un anticuerpo monoclonal anti-PD-1 en un estudio fase I (NCT02383212), con respuesta parcial y mantenida (295). Poco después, Borradori y colaboradores presentaron un paciente con un carcinoma basoescamoso con metástasis pulmonares tratado con nivolumab que se mantuvo con enfermedad estable durante pocos meses (296). Por último, Lipson y colaboradores publicaron una paciente con un CBCla no candidata a cirugía, tratada previamente con RT y un inhibidor de la vía Hh, que inició pembrolizumab intravenoso 2 mg/kg cada 3 semanas durante 14 semanas, obteniendo una respuesta parcial mantenida. Vale la pena señalar que el estudio IHQ antes de iniciar el tratamiento solo demostró expresión de PD-L1 en las células inmunológicas, no en las tumorales, y que aproximadamente el 50% de los linfocitos expresaban PD-1. Las técnicas IHQ revelaron que el infiltrado inflamatorio estaba compuesto por LT CD4+ y CD8+ (2:1) (337). (**Tabla 7**)

**Tabla 7.** Resumen de los carcinomas basocelulares tratados con inhibidores de puntos de control inmunitario publicados.

	<b>Autor</b>	<b>Año</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Tipo de Ac</b>	<b>Duración</b>	<b>nº de pacientes</b>	<b>Tumor</b>	<b>Respuesta</b>
1	Ikeda y cols	2016	Nivolumab 240 mg/2 semanas	Anti-PD-1	4 meses	1	CBCm (cerebro, hígado, pulmón y hueso)	RP (metástasis hepáticas)
2	Mohan y cols	2016	Ipilimumab (3mg/kg/3 semanas)	Anti-CTLA-4	8 semanas	1	CBCla MM metastásico	RP
3	Falchook y cols	2016	REGN2810 (10 mg/kg/2 semanas)	Anti-PD-1	48 semanas	1	CBCm (pulmón)	RP
4	Borradori y cols	2016	Nivolumab (3 mg/kg/3 semanas)	Anti-PD-1	10 semanas	1	Carcinoma basoescamoso con metástasis pulmonares	EE (pulmonar)
5	Winkler y cols	2017	Pembrolizumab	Anti-PD-1	4 ciclos (12-16 semanas)	1	CBCm (pulmón)	EE (pulmonar) Reacción granulomatosa sarcoidea
6	Lipson y cols	2017	Pembrolizumab (2 mg/kg/3 semanas)	Anti-PD-1	14 semanas	1	CBCla	RP Hipotiroidismo subclínico

CBCla, carcinoma basocelular localmente avanzado; CBCm, carcinoma basocelular metastásico; MM: melanoma maligno; RP, respuesta parcial; EE, enfermedad estable.



## 7.9. VALORACIÓN DEL PRESENTE ESTUDIO

Como limitaciones de nuestro trabajo resaltar, en primer lugar, que se trata de un estudio retrospectivo con un tamaño muestral pequeño.

En segundo lugar, no hemos podido correlacionar los hallazgos de expresión de ARNm con la expresión IHQ preliminar (datos no mostrados). Hemos intentado confirmar los hallazgos de expresión génica de PD-L1 con técnicas IHQ utilizando un anticuerpo monoclonal (PD-L1 [clon 22C3] Mouse monoclonal de DAKO Agilent Technologies) que se emplea para determinar la expresión de PD-L1 en la membrana de las células tumorales en muestras de CPNM. Hemos repetido las tinciones hasta en dos ocasiones para cada muestra, y aún así un 28% han resultado no valorables. No hemos observado expresión de membrana, sin embargo, hemos hallado expresión citoplasmática granular en grados variables en el infiltrado inflamatorio peritumoral de algunos tumores. Tampoco hemos podido correlacionar la intensidad de expresión con los hallazgos en la expresión de ARNm de PD-L1 ni con el subtipo histológico. Hay que tener en consideración que la técnica IHQ no está estandarizada en el CBC y quizás el anticuerpo monoclonal empleado no es el idóneo.

La detección IHQ de PD-L1 es, hasta la fecha, el biomarcador más empleado para predecir la respuesta a tratamientos anti-PD-1/PD-L1. Aún así, en el caso de mejorar la técnica y/o identificar el anticuerpo adecuado se debe ser muy cauto en su interpretación: no hay consenso sobre el umbral de positividad y, tal y como hemos comentado con anterioridad, en determinados tumores la determinación de los niveles de PD-L1 no es un buen predictor de la respuesta al tratamiento con fármacos anti-PD-L1.

Además de los escollos inherentes a la técnica IHQ comentados previamente, señalar que hay múltiples mecanismos de regulación génica post-transcripcional que pueden modificar los niveles proteicos. Por ello, determinar una relación “directa” entre los niveles de ARNm y las proteínas es cuestionable. A pesar de que hay estudios que sugieren que hay correlación entre ambos cuando los niveles proteicos son abundantes, otros no han podido demostrar esta asociación (353–355).

En definitiva, hemos evidenciado que la expresión de ARNm de PD-L1 en los CBC infiltrantes es significativamente superior a la del resto de CBC. Esto sugiere que este subtipo clínico e histológico, a pesar de desencadenar una respuesta inflamatoria antitumoral, es capaz de eludir uno de los mecanismos antitumorales del huésped lo que posiblemente le confiere mayor agresividad “intrínseca”. El bloqueo del eje PD-1/PD-L1 reactivaría la respuesta inmunológica antitumoral y debe valorarse como alternativa terapéutica en pacientes con CBC infiltrantes refractarios a otros tratamientos. De hecho, en la actualidad hay un ensayo clínico en fase de reclutamiento para el tratamiento con un anticuerpo monoclonal anti-PD-L1 (REGN2810) de pacientes con CBCIa o CBCm, refractarios o con intolerancia a inhibidores de la vía de señalización Hh. En este momento no disponemos de biomarcadores (niveles de PD-1/PD-L1 con IHQ validada para CBC, expresión de genes inflamatorios, carga de mutaciones del tumor, etc...) que justifiquen el comportamiento biológico de los CBC de alto y bajo riesgo. Vale la pena invertir esfuerzos en identificarlos para así poder seleccionar aquellos pacientes susceptibles de responder a terapias con inhibidores de proteínas de control inmunitario y evitar toxicidades innecesarias en pacientes previsiblemente no respondedores.



## **8. CONCLUSIONES**



## 8. CONCLUSIONES

1. Es el primer estudio que aplica la tecnología de RNA-seq para caracterizar los diferentes subtipos de CBC, con especial énfasis en genes involucrados en la respuesta inmune antitumoral.
2. Se ha identificado un *cluster* de 120 genes relacionados con la inmunidad expresados de forma diferencial en el CBC infiltrante respecto a otros subtipos de CBC.
3. La expresión de ARNm de PD-L1 en los CBC infiltrantes es significativamente superior a la del resto de CBC. Es posible que la agresividad de este subtipo histológico esté condicionada por un fracaso en la respuesta antitumoral secundaria a la expresión de PD-L1.
4. Al comparar la expresión de ARNm de las muestras de CBC con las de otros tumores en TCGA se observó que se ubicaron juntas entre los tumores escamosos de pulmón y cabeza y cuello, los tumores de vejiga y los tumores de mama triple negativos, en los que la oncoinmunoterapia se postula como un tratamiento esperanzador. El bloqueo del eje PD-1/PD-L1 también podría considerarse como una alternativa terapéutica en pacientes con CBC infiltrantes refractarios a otros tratamientos.



## **9. LÍNEAS DE FUTURO**





## 9. LÍNEAS DE FUTURO

1. Incrementar el tamaño muestral que ha podido ser insuficiente para evidenciar otras alteraciones moleculares relevantes.
2. Analizar los otros 116 genes relacionados con el sistema inmune que presentan una elevada expresión en la mayoría de CBC infiltrantes y que pueden justificar diferencias en el comportamiento biológico de los distintos subtipos de CBC.
3. Evaluar los niveles de ARNm de PD-1 y PD-L1 en CBC seleccionados de pacientes inmunodeprimidos y compararlos con muestras de pacientes control.
4. Depurar la técnica IHQ para validar los resultados obtenidos con la expresión proteica.
5. Identificar biomarcadores específicos (niveles de PD-1/PD-L1 con IHQ validada para CBC, expresión de genes inflamatorios, carga de mutaciones del tumor, etc...) que permitan seleccionar aquellos pacientes que pueden beneficiarse de fármacos inhibidores del eje PD-1/PD-L1.



## **10. BIBLIOGRAFÍA**



## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Weedon D, Strutton G. Piel patología. 1.<sup>a</sup> ed. Madrid: Marbán; 2002. 648 p.
2. Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2005;353(21):2262-9.
3. Tejera-Vaquerizo A, Descalzo-Gallego MA, Otero-Rivas MM, Posada-García C, Rodríguez-Pazos L, Pastushenko I, et al. Incidencia y mortalidad del cáncer cutáneo en España: revisión sistemática y metaanálisis. *Actas Dermosifiliogr*. 2016;107(4):318-28.
4. Bielsa I, Soria X, Esteve M, Ferrándiz C, Skin Cancer Study Group of Barcelonès Nord. Population-based incidence of basal cell carcinoma in a Spanish Mediterranean area. *Br J Dermatol*. 2009;161(6):1341-6.
5. Lever WF. Pathogenesis of benign tumors of cutaneous appendages and of basal cell epithelioma. *Arch Derm Syphilol*. 1948;57(4):679-724.
6. Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y, et al. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol*. 2010;12(3):299-305.
7. Holíková Z, Massi D, Lotti T, Hercogová J. Insight into the pathogenesis of sporadic basal cell carcinoma. *Int J Dermatol*. 2004;43(12):865-9.
8. Grachtchouk M, Pero J, Yang SH, Ermilov AN, Michael LE, Wang A, et al. Basal cell carcinomas in mice arise from hair follicle stem cells and multiple epithelial progenitor populations. *J Clin Invest*. 2011;121(5):1768-81.
9. Peterson SC, Eberl M, Vagnozzi AN, Belkadi A, Veniaminova NA, Verhaegen ME, et al. Basal cell carcinoma preferentially arises from stem cells within hair follicle and mechanosensory niches. *Cell Stem Cell*. 2015;16(4):400-12.
10. Alessi E, Venegoni L, Fanoni D, Berti E. Cytokeratin profile in basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol*. 2008;30(3):249-55.
11. García-de-la-Fuente MR, Santacana M, Valls J, Vilardell F, Fernández Armenteros JM, Pujol R, et al. Cytokeratin Profile of Basal Cell Carcinomas According to the Degree of Sun Exposure and to the Anatomical Localization. *Am J Dermatopathol*. 2018;40(5):342-348.
12. Blanpain C. Tracing the cellular origin of cancer. Vol. 15, *Nature Cell Biology*. 2013. p. 126-34.
13. Ogden SK, Ascano M, Stegman MA, Robbins DJ. Regulation of Hedgehog signaling: A complex story. *Biochem Pharmacol*. 2004;67(5):805-14.
14. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980;287(5785):795-801.
15. Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The hedgehog signal transduction network. *Sci Signal*. 2012;5(246):re6.
16. Merchant AA, Matsui W. Targeting Hedgehog - A cancer stem cell pathway. *Clin Cancer Res*. 2010;16(12):3130-40.
17. Katoh Y, Katoh M. Hedgehog Target Genes: Mechanisms of Carcinogenesis Induced by Aberrant Hedgehog Signaling Activation. *Curr Mol Med*. 2009;9(7):873-86.
18. Gorlin RJ, Goltz RW. Multiple Nevoid Basal-Cell Epithelioma, Jaw Cysts and Bifid Rib. *N Engl J Med*. 1960;262(18):908-12.
19. Gailani MR, Leffell DJ, Ziegler A, Gross EG, Brash DE, Bale AE. Relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*.

- 1996;88(6):349-54.
20. Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, et al. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*. 1998;391(6662):90-2.
  21. Gracia-Cazaña T, Salazar N, Zamarrón A, Mascaraque M, Lucena SRR, Juarranz, et al. Resistencias al tratamiento no quirúrgico en cáncer cutáneo no melanoma. Parte II: terapia fotodinámica, vismodegib, cetuximab, metotrexato intralesional y radioterapia. *Actas Dermosifiliogr*. 2016;107(9):740-50.
  22. Göppner D, Leverkus M. Basal Cell Carcinoma: From the Molecular Understanding of the Pathogenesis to Targeted Therapy of Progressive Disease. *J Skin Cancer*. 2011;2011:1-8.
  23. Levitt RJ, Zhao Y, Blouin MJ, Pollak M. The hedgehog pathway inhibitor cyclopamine increases levels of p27, and decreases both expression of IGF-II and activation of Akt in PC-3 prostate cancer cells. *Cancer Lett*. 2007;255(2):300-6.
  24. Tilley C, Deep G, Agarwal C, Wempe MF, Biedermann D, Valentová K, et al. Silibinin and its 2,3-dehydro-derivative inhibit basal cell carcinoma growth via suppression of mitogenic signaling and transcription factors activation. *Mol Carcinog*. 2016;55(1):3-14.
  25. Brechbiel J, Miller-Moslin K, Adjei AA. Crosstalk between hedgehog and other signaling pathways as a basis for combination therapies in cancer. *Cancer Treat Rev*. 2014;40(6):750-9.
  26. Lauth M. RAS and Hedgehog--partners in crime. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011;16:2259-70.
  27. Zhao X, Ponomaryov T, Ornell KJ, Zhou P, Dabral SK, Pak E, et al. RAS/MAPK activation drives resistance to Smo inhibition, metastasis, and tumor evolution in Shh pathway-dependent tumors. *Cancer Res*. 2015;75(17):3623-35.
  28. Lin N, Moroi Y, Uchi H, Fukiwake N, Dainichi T, Takeuchi S, et al. Significance of the expression of phosphorylated-STAT3, -Akt, and -ERK1/2 in several tumors of the epidermis. *J Dermatol Sci*. 2007;48(1):71-3.
  29. Rittié L, Kansra S, Stoll SW, Li Y, Gudjonsson JE, Shao Y, et al. Differential ErbB1 signaling in squamous cell versus basal cell carcinoma of the skin. *Am J Pathol*. 2007;170(6):2089-99.
  30. Hafner C, Landthaler M, Vogt T. Activation of the PI3K/AKT signalling pathway in non-melanoma skin cancer is not mediated by oncogenic PIK3CA and AKT1 hotspot mutations. *Exp Dermatol*. 2010;19(8):e222-7.
  31. Buonamici S, Williams J, Morrissey M, Wang A, Guo R, Vattay A, et al. Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma. *Sci Transl Med*. 2010;2(51):51ra70.
  32. Holcman M, Sibilía M. Mechanisms underlying skin disorders induced by EGFR inhibitors. *Mol Cell Oncol*. 2015;2(4):e1004969.
  33. Sibilía M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M, Holcman M. The epidermal growth factor receptor: From development to tumorigenesis. *Differentiation*. 2007;75(9):770-87.
  34. Neill GW, Harrison WJ, Ikram MS, Williams TDL, Bianchi LS, Nadendla SK, et al. GLI1 repression of ERK activity correlates with colony formation and impaired migration in human epidermal keratinocytes. *Carcinogenesis*. 2008;29(4):738-46.
  35. Schnidar H, Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Kasper M, Hauser-Kronberger C, et al. Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with hedgehog/GLI in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK/JUN pathway. *Cancer Res*.

- 2009;69(4):1284-92.
36. Bigelow RLH, Jen EY, Delehedde M, Chari NS, McDonnell TJ. Sonic hedgehog induces epidermal growth factor dependent matrix infiltration in HaCat keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2005;124(2):457-65.
  37. Atwood SX, Li M, Lee A, Tang JY, Oro AE. GLI activation by atypical protein kinase C  $\iota/\lambda$  regulates the growth of basal cell carcinomas. *Nature.* 2013;494(7438):484-8.
  38. Lv X, Fu L, Zhao Y. APKC  $\iota/\lambda$ : A potential target for the therapy of Hh-dependent and Smo-inhibitor-resistant advanced BCC. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2013;45(7):610-1.
  39. Salto-Tellez M, Peh BK, Ito K, Tan SH, Chong PY, Han HC, et al. RUNX3 protein is overexpressed in human basal cell carcinomas. *Oncogene.* 2006;25(58):7646-9.
  40. Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science.* 1997;275(5307):1790-2.
  41. Guo W-H, Weng L-Q, Ito K, Chen L-F, Nakanishi H, Tatematsu M, et al. Inhibition of growth of mouse gastric cancer cells by Runx3, a novel tumor suppressor. *Oncogene.* 2002;21(54):8351-5.
  42. Lee JH, Pyon JK, Kim DW, Lee SH, Nam HS, Kang SG, et al. Expression of RUNX3 in skin cancers. *Clin Exp Dermatol.* 2011;36(7):769-74.
  43. Shi F-T, Yu M, Zloty D, Bell RH, Wang E, Akhoundsadegh N, et al. Notch signaling is significantly suppressed in basal cell carcinomas and activation induces basal cell carcinoma cell apoptosis. *Mol Med Rep.* 2017;15(4):1441-54.
  44. Nicolas M, Wolfer A, Raj K, Kummer JA, Mill P, van Noort M, et al. Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin. *Nat Genet.* 2003;33(3):416-21.
  45. Jayaraman SS, Rayhan DJ, Hazany S, Kolodney MS. Mutational landscape of basal cell carcinomas by whole-exome sequencing. *J Invest Dermatol.* 2014;134(1):213-20.
  46. Massagué J. TGF $\beta$  in Cancer. *Cell.* 2008;134(2):215-30.
  47. Han G, Lu S-L, Li AG, He W, Corless CL, Kulesz-Martin M, et al. Distinct mechanisms of TGF-beta1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis during skin carcinogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115(7):1714-23.
  48. Stamp GW, Nasim M, Cardillo M, Sudhindra SG, Lalani EN, Pignatelli M. Transforming growth factor-beta distribution in basal cell carcinomas: relationship to proliferation index. *Br J Dermatol.* 1993;129(1):57-64.
  49. Schmid P, Itin P, Ruffli T. In situ analysis of transforming growth factors-beta (TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3) and TGF-beta type II receptor expression in basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 1996;134(6):1044-51.
  50. Furue M, Kato M, Nakamura K, Nashiro K, Kikuchi K, Okochi H, et al. Dysregulated expression of transforming growth factor beta and its type-I and type-II receptors in basal-cell carcinoma. *Int J cancer.* 1997;71(4):505-9.
  51. Lange D, Persson U, Wollina U, ten Dijke P, Castelli E, Heldin CH, et al. Expression of TGF-beta related Smad proteins in human epithelial skin tumors. *Int J Oncol.* 1999;14(6):1049-56.
  52. Gambichler T, Skrygan M, Kaczmarczyk JM, Hyun J, Tomi NS, Sommer A, et al. Increased Expression of Tgf-B/Smad Proteins in Basal Cell Carcinoma. *Eur J Med Res.* 2007;12(10):509-14.
  53. Fan Q, He M, Sheng T, Zhang X, Sinha M, Luxon B, et al. Requirement of TGFbeta signaling for SMO-mediated carcinogenesis. *J Biol Chem.* 2010;285(47):36570-6.



54. Wu SCY, Grindley J, Winnier GE, Hargett L, Hogan BL m. Mouse Mesenchyme forkhead 2 (Mf2): Expression, DNA binding and induction by sonic hedgehog during somitogenesis. *Mech Dev.* 1998;70(1-2):3-13.
55. Teh MT, Wong ST, Neill GW, Ghali LR, Philpott MP, Quinn AG. FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Res.* 2002;62(16):4773-80.
56. Eichberger T, Regl G, Ikram MS, Neill GW, Philpott MP, Aberger F, et al. FOXE1, a new transcriptional target of GLI2, is expressed in human epidermis and basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2004;122(5):1180-7.
57. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992;358(6381):15-6.
58. Zhang H, Ping XL, Lee PK, Wu XL, Yao YJ, Zhang MJ, et al. Role of PTCH and p53 Genes in Early-Onset Basal Cell Carcinoma. *Am J Pathol.* 2001;158(2):381-5.
59. Couvé-Privat S, Bouadjar B, Avril MF, Sarasin A, Daya-Grosjean L. Significantly high levels of ultraviolet-specific mutations in the smoothed gene in basal cell carcinomas from DNA repair-deficient xeroderma pigmentosum patients. *Cancer Res.* 2002;62(24):7186-9.
60. Tian Y, Li L, Yang R. P53 Arg72Pro polymorphism and risk of basal cell carcinoma: A meta analysis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(2):2350-6.
61. Ansarin H, Daliri M, Soltani-Arabshahi R. Expression of p53 in aggressive and non-aggressive histologic variants of basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol.* 2006;16(5):543-7.
62. Tilli CMLJ, Van Steensel MAM, Krekels GAM, Neumann HAM, Ramaekers FCS. Molecular aetiology and pathogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2005;152(6):1108-24.
63. Dreier J, Dummer R, Felderer L, Nägeli M, Gobbi S, Kunstfeld R. Emerging drugs and combination strategies for basal cell carcinoma. *Expert Opin Emerg Drugs.* 2014;19(3):353-65.
64. Schuch AP, Moreno NC, Schuch NJ, Menck CFM, Garcia CCM. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic Biol Med.* 2017;107:110-24.
65. Stary A, Robert C, Sarasin A. Deleterious effects of ultraviolet A radiation in human cells. *Mutat Res.* 1997;383(1):1-8.
66. Parsons PG, Hayward IP. Inhibition of DNA repair synthesis by sunlight. *Photochem Photobiol.* 1985;42(3):287-93.
67. Fisher GJ, Choi HC, Bata-Csorgo Z, Shao Y, Datta S, Wang ZQ, et al. Ultraviolet irradiation increases matrix metalloproteinase-8 protein in human skin in vivo. *J Invest Dermatol.* 2001;117(2):219-26.
68. Black HS, deGruijl FR, Forbes PD, Cleaver JE, Ananthaswamy HN, deFabo EC, et al. Photocarcinogenesis: an overview. *J Photochem Photobiol B.* 1997;40(1):29-47.
69. Gervin CM, McCulla A, Williams M, Ouhtit A. Dysfunction of p53 in photocarcinogenesis. *Front Biosci.* 2003;8:s715-7.
70. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Fincham S, Coldman AJ, Mclean DI, et al. Sunlight Exposure, Pigmentary Factors, and Risk of Nonmelanocytic Skin Cancer: I. Basal Cell Carcinoma. *Arch Dermatol.* 1995;131(2):157-63.
71. Corona R, Dogliotti E, D'Errico M, Sera F, Iavarone I, Baliva G, et al. Risk factors for basal cell carcinoma in a Mediterranean population: role of recreational sun exposure early in life. *Arch Dermatol.* 2001;137(9):1162-8.
72. Kricker A, Armstrong BK, English DR, Heenan PJ. Does intermittent sun exposure cause

- basal cell carcinoma? a case-control study in Western Australia. *Int J Cancer*. 1995;60(4):489-94.
73. Bastiaens MT, Hoefnagel JJ, Bruijn JA, Westendorp RGJ, Vermeer BJ, Bavinck JNB. Differences in age, site distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinomas indicate different types of tumors. *J Invest Dermatol*. 1998;110(6):880-4.
  74. Rattis FM, Péguet-Navarro J, Courtellemont P, Redziniak G, Schmitt D. In vitro effects of ultraviolet B radiation on human Langerhans cell antigen-presenting function. *Cell Immunol*. 1995;164(1):65-72.
  75. Lear JT, Tan BB, Smith AG, Bowers W, Jones PW, Heagerty AH, et al. Risk factors for basal cell carcinoma in the UK: case-control study in 806 patients. *J R Soc Med*. 1997;90(7):371-4.
  76. Zanetti R, Rosso S, Martinez C, Navarro C, Schraub S, Sancho-Garnier H, et al. The multicentre south European study «Helios». I: Skin characteristics and sunburns in basal cell and squamous cell carcinomas of the skin. *Br J Cancer*. 1996;73(11):1440-6.
  77. Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, Stratigos AJ. Melanocortin 1 receptor variants: Functional role and pigmentary associations. *Photochem and Photobiol*. 2011;87(5):978-87.
  78. García-Borrón JC, Sánchez-Laorden BL, Jiménez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. *Pigment Cell Research*. 2005;18(6):393-410.
  79. Duffy DL, Box NF, Chen W, Palmer JS, Montgomery GW, James MR, et al. Interactive effects of MC1R and OCA2 on melanoma risk phenotypes. *Hum Mol Genet*. 2004. 13(4): 447-61.
  80. Box NF, Wyeth JR, O’Gorman LE, Martin NG, Sturm RA. Characterization of melanocyte stimulating hormone receptor variant alleles in twins with red hair. *Hum Mol Genet*. 1997;6(11):1891-7.
  81. Bastiaens MT, Huurne JAC ter, Kielich C, Gruis NA, Westendorp RGJ, Vermeer BJ, et al. Melanocortin-1 Receptor Gene Variants Determine the Risk of Nonmelanoma Skin Cancer Independently of Fair Skin and Red Hair. *Am J Hum Genet*. 2001;68(4):884-94.
  82. Han J, Kraft P, Colditz GA, Wong J, Hunter DJ. Melanocortin 1 receptor variants and skin cancer risk. *Int J Cancer*. 2006;119(8):1976-84.
  83. Stacey SN, Gudbjartsson DF, Sulem P, Bergthorsson JT, Kumar R, Thorleifsson G, et al. Common variants on 1p36 and 1q42 are associated with cutaneous basal cell carcinoma but not with melanoma or pigmentation traits. *Nat Genet*. 2008;40(11):1313-8.
  84. Rafnar T, Sulem P, Stacey SN, Geller F, Gudmundsson J, Sigurdsson A, et al. Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types. *Nat Genet*. 2009;41(2):221-7.
  85. Nan H, Xu M, Kraft P, Qureshi AA, Chen C, Guo Q, et al. Genome-wide association study identifies novel alleles associated with risk of cutaneous basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *Hum Mol Genet*. 2011;20(18):3718-24.
  86. Stacey SN, Sulem P, Jonasdottir A, Masson G, Gudmundsson J, Gudbjartsson DF, et al. A germline variant in the TP53 polyadenylation signal confers cancer susceptibility. *Nat Genet*. 2011;43(11):1098-103.
  87. Stacey SN, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasdottir A, Thorleifsson G, Gudjonsson SA, et al. Germline sequence variants in TGM3 and RGS22 confer risk of basal cell carcinoma. *Hum Mol Genet*. 2014;23(11):3045-53.
  88. Stacey SN, Helgason H, Gudjonsson SA, Thorleifsson G, Zink F, Sigurdsson A, et al. New

- basal cell carcinoma susceptibility loci. *Nat Commun.* 2015;6:6825
89. Ward JF. The yield of DNA double-Strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: A review. *Int J Radiat Biol.* 1990;57(6):1141-50.
  90. Mizuno T, Tokuoka S, Kishikawa M, Nakashima E, Mabuchi K, Iwamoto KS. Molecular basis of basal cell carcinogenesis in the atomic-bomb survivor population: p53 and PTCH gene alterations. *Carcinogenesis.* 2006;27(11):2286-94.
  91. Tessone A, Amariglio N, Weissman O, Jacob-Hirsch J, Liran A, Stavrou D, et al. Radiotherapy-induced basal cell carcinomas of the scalp: Are they genetically different? *Aesthetic Plast Surg.* 2012;36(6):1387-92.
  92. Sugiyama H, Misumi M, Kishikawa M, Iseki M, Yonehara S, Hayashi T, et al. Skin Cancer Incidence among Atomic Bomb Survivors from 1958 to 1996. *Radiat Res.* 2014;181(5):531-9.
  93. Lee T, Sigurdson AJ, Preston DL, Cahoon EK, Michal Freedman D, Simon SL, et al. Occupational ionising radiation and risk of basal cell carcinoma in US radiologic technologists (1983-2005). *Occup Environ Med.* 2015;72(12):862-9.
  94. Watt TC, Inskip PD, Stratton K, Smith SA, Kry SF, Sigurdson AJ, et al. Radiation-related risk of basal cell carcinoma: A report from the childhood cancer survivor study. *J Natl Cancer Inst.* 2012;104(16):1240-50.
  95. Shore RE, Albert RE, Pasternack BS. Follow-up study of patients treated by X-ray epilation for Tinea capitis; resurvey of post-treatment illness and mortality experience. *Arch Environ Health.* 1976;31(1):21-8.
  96. Ron E, Preston DL, Kishikawa M, Kobuke T, Iseki M, Tokuoka S, et al. Skin tumor risk among atomic-bomb survivors in Japan. *Cancer Causes Control.* 1998;9(4):393-401.
  97. Kishikawa M, Koyama K, Iseki M, Kobuke T, Yonehara S, Soda M, et al. Histologic characteristics of skin cancer in Hiroshima and Nagasaki: Background incidence and radiation effects. *Int J Cancer.* 2005;117(3):363-9.
  98. Hughes MF, Beck BD, Chen Y, Lewis AS, Thomas DJ. Arsenic exposure and toxicology: A historical perspective. *Toxicol Sci.* 2011;123(2):305-32.
  99. Hei TK, Filipic M. Role of oxidative damage in the genotoxicity of arsenic. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(5):574-81.
  100. National Research Council. 2001. Arsenic in Drinking Water: 2001 Update. Washington, DC.: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/10194>.
  101. Guha MD, Dasgupta UB. Chronic arsenic toxicity: Studies in West Bengal, India. *Kaohsiung J Med Sci.* 2011;27(9):360-70.
  102. Sengupta SR, Das NK, Datta PK. Pathogenesis, clinical features and pathology of chronic arsenicosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008;74(6):559-70.
  103. Noodleman FR, Pollack SV. Trauma as a possible etiologic factor in basal cell carcinoma. *J Dermatol Surg Oncol.* 1986;12(8):841-6.
  104. Özyazgan I, Kondaş O. Previous injuries or scars as risk factors for the development of basal cell carcinoma. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 2004;38(1):11-5.
  105. Kowal-Vern A, Criswell BK. Burn scar neoplasms: a literature review and statistical analysis. *Burns.* 2005;31(4):403-13.
  106. Kluger N, Monthieu JY, Guillot B. Basal cell carcinoma arising in a bacille Calmette-Guérin vaccination scar. *Cutis.* 2012;89(3):137-9.

107. Ozyazgan I, Kontacs O. Basal cell carcinoma arising from surgical scars: a case and review of the literature. *Dermatol Surg*. 1999;25(12):965-8.
108. Vaughan-Shaw PG, O'Sullivan F, Farrington SM, Theodoratou E, Campbell H, Dunlop MG, et al. The impact of Vitamin D pathway genetic variation and circulating 25-hydroxyvitamin D on cancer outcome: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2017;116(8):1095-110.
109. Tang JY, Parimi N, Wu A, Boscardin WJ, Shikany JM, Chren MM, et al. Inverse association between serum 25(OH) vitamin D levels and non-melanoma skin cancer in elderly men. *Cancer Causes Control*. 2010;21(3):387-91.
110. Asgari MM, Tang J, Warton ME, Chren MM, Quesenberry CP, Bikle D, et al. Association of prediagnostic serum vitamin D levels with the development of basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2010;130(5):1438-43.
111. Eide MJ, Johnson DA, Jacobsen GR, Krajenta RJ, Rao DS, Lim HW, et al. Vitamin D and nonmelanoma skin cancer in a health maintenance organization cohort. *Arch Dermatol*. 2011;147(12):1379-84.
112. Cortes M, Liu SY, Kwan W, Alexa K, Goessling W, North TE. Accumulation of the Vitamin D precursor cholecalciferol antagonizes hedgehog signaling to impair hemogenic endothelium formation. *Stem Cell Reports*. 2015;5(4):471-9.
113. Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, Van De Water S, Rezaee F, Peppelenbosch MP. Repression of smoothened by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion. *PLoS Biol*. 2006;4(8):1397-410.
114. Farndon PA, Del Mastro RG, Evans DG, Kilpatrick MW. Location of gene for Gorlin syndrome. *Lancet*. 1992;339(8793):581-2.
115. Smith MJ, Beetz C, Williams SG, Bhaskar SS, O'Sullivan J, Anderson B, et al. Germline mutations in SUFU cause Gorlin syndrome-associated childhood medulloblastoma and redefine the risk associated with PTCH1 mutations. *J Clin Oncol*. 2014;32(36):4155-61.
116. DiGiovanna JJ, Kraemer KH. Shining a light on xeroderma pigmentosum. *J Invest Dermatol*. 2012;132(3 Pt 2):785-96.
117. Girardi M, Federman GL, McNiff JM. Familial multiple basaloid follicular hamartomas: A report of two affected sisters. *Pediatr Dermatol*. 1999;16(4):281-4.
118. Lo CS, Wu YF, Hsiao YW, Chung WH, Yang CH. Unilateral segmentally arranged basaloid follicular hamartomas with osteoma cutis and hypodontia: a case of Happle-Tinschert syndrome. *Clin Exp Dermatol*. 2013;38(8):862-5.
119. Wheeler CE, Carroll MA, Groben PA, Briggaman RA, Prose NS, Davis DA. Autosomal dominantly inherited generalized basaloid follicular hamartoma syndrome: report of a new disease in a North Carolina family. *J Am Acad Dermatol*. 2000;43(2):189-206.
120. Shumaker PR, Lane K, Harford R. Linear unilateral basal cell nevus: a benign follicular hamartoma simulating multiple basal cell carcinomas. *Cutis*. 2006;78(2):122-4.
121. Bree AF, Shah MR, BCNS Colloquium Group. Consensus statement from the first international colloquium on basal cell nevus syndrome (BCNS). *Am J Med Genet A*. 2011;155A(9):2091-7.
122. Abuzahra F, Parren LJMT, Frank J. Multiple familial and pigmented basal cell carcinomas in early childhood - Bazex-Dupr e-Christol syndrome. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(1):117-21.
123. Jaju PD, Ransohoff KJ, Tang JY, Sarin KY. Familial skin cancer syndromes. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74(3):437-51.

124. Vabres P, Lacombe D, Rabinowitz LG, Aubert G, Anderson CE, Taieb A, et al. The gene for Bazex-Dupré-Christol syndrome maps to chromosome Xq. *J Invest Dermatol.* 1995;105(1):87-91.
125. Parren LJMT, Abuzahra F, Wagenvoort T, Koene F, Van Steensel MA, Steijlen PM, et al. Linkage refinement of Bazex-Dupré-Christol syndrome to an 11.4-Mb interval on chromosome Xq25-27.1. *Br J Dermatol.* 2011;165(1):201-3.
126. Andreani V, Richard M, Folchetti G, Varennes S, Philip N, Grob JJ. Congenital hypotrichosis and milia with spontaneous regression during adolescence or Oley syndrome: a variant of Bazex-Dupré-Christol syndrome. *Ann Dermatol Venereol.* 2000;127(3):285-8.
127. Micha lsson G, Olsson E, Westermark P. The Rombo syndrome: a familial disorder with vermiculate atrophoderma, milia, hypotrichosis, trichoepitheliomas, basal cell carcinomas and peripheral vasodilation with cyanosis. *Acta Derm Venereol.* 1981;61(6):497-503.
128. Bhutto AM, Kirk SH. Population distribution of xeroderma pigmentosum. *Adv Exp Med Biol.* 2008;637:138-43.
129. Gretzula JC, Hevia O, Weber PJ. Bloom's syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 1987;17(3):479-88.
130. Shah H, Sheth FJ, Pandit VS, Langanecha B. Bloom syndrome: report of two cases in siblings. *Int J Dermatol.* 2013;52(8):990-2.
131. Monk BE, Pieris S, Soni V. Schöpf-Schulz-Passarge syndrome. *Br J Dermatol.* 1992;127(1):33-5.
132. Vilas-Sueiro A, Monteagudo B, González-Vilas D, Varela-Veiga A, De las Heras C. Genetic study in a suspected case of Schöpf-Schulz-Passarge syndrome. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2015;81(4):408-10.
133. Pilarski R, Burt R, Kohlman W, Pho L, Shannon KM, Swisher E. Cowden syndrome and the PTEN Hamartoma tumor syndrome: systematic review and revised diagnostic criteria. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(21):1607-16.
134. Camisa C, Bikowski JB, McDonald SG. Cowden's disease. Association with squamous cell carcinoma of the tongue and perianal basal cell carcinoma. *Arch Dermatol.* 1984;120(5):677-8.
135. Cowen P, Connors T. Multiple hamartoma syndrome with trichoepitheliomas and basal cell carcinomas. *Australas J Dermatol.* 1985;26(3):118-20.
136. Ridanp   M, van Eenennaam H, Pelin K, Chadwick R, Johnson C, Yuan B, et al. Mutations in the RNA component of RNase MRP cause a pleiotropic human disease, cartilage-hair hypoplasia. *Cell.* 2001;104(2):195-203.
137. Eisner JM, Russell M. Cartilage hair hypoplasia and multiple basal cell carcinomas. *J Am Acad Dermatol.* 2006;54(2 Suppl):S8-10.
138. Taskinen M, Ranki A, Pukkala E, Jeskanen L, Kaitila I, M kitie O. Extended follow-up of the Finnish cartilage-hair hypoplasia cohort confirms high incidence of non-Hodgkin lymphoma and basal cell carcinoma. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(18):2370-5.
139. de Oliveira WR, Festa Neto C, Rady PL, Tyring SK. Clinical aspects of epidermodysplasia verruciformis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2003;17(4):394-8.
140. Boxman IL, Russell A, Mulder LH, Bavinck JN, Schegget JT, Green A. Case-control study in a subtropical Australian population to assess the relation between non-melanoma skin cancer and epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs. The Nambour Skin Cancer Prevention Study Group. *Int J Cancer.*

- 2000;86(1):118-21.
141. Arora H, Chacon AH, Choudhary S, McLeod MP, Meshkov L, Nouri K, et al. Bloom syndrome. *Int J Dermatol.* 2014;53(7):798-802.
  142. Montoliu L, Grønskov K, Wei AH, Martínez-García M, Fernández A, Arveiler B, et al. Increasing the complexity: new genes and new types of albinism. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014;27(1):11-8.
  143. Grønskov K, Ek J, Brøndum-Nielsen K. Oculocutaneous albinism. *Orphanet J Rare Dis.* 2007;2(1):43.
  144. Mabula JB, Chalya PL, Mchembe MD, Jaka H, Giiti G, Rambau P, et al. Skin cancers among Albinos at a University teaching hospital in Northwestern Tanzania: a retrospective review of 64 cases. *BMC Dermatol.* 2012;12(1):5.
  145. Toro J, Turner M, Gahl WA. Dermatologic manifestations of Hermansky-Pudlak syndrome in patients with and without a 16-base pair duplication in the HPS1 gene. *Arch Dermatol.* 1999;135(7):774-80.
  146. Wildenberg SC, Oetting WS, Almodóvar C, Krumwiede M, White JG, King RA. A gene causing Hermansky-Pudlak syndrome in a Puerto Rican population maps to chromosome 10q2. *Am J Hum Genet.* 1995;57(4):755-65.
  147. Sugarman JL. Epidermal Nevus Syndromes. *Semin Cutan Med Surg.* 2007;26(4):221-30.
  148. Serrano R, Rodríguez-Peralto JL, Azorín Da, López-Ríos F, Castaño E. Lesiones cutáneas asociadas a nevos sebáceos de Jadassohn. Estudio de 366 casos. *Actas Dermosifiliogr.* 2003;94(7):454-7.
  149. Happle R. The group of epidermal nevus syndromes. *J Am Acad Dermatol.* 2010;63(1):1-22.
  150. Martínez-Menchón T, Mahiques Santos L, Vilata Corell JJ, Febrer Bosch I, Fortea Baixauli JM. Phacomatosis pigmentokeratotic: a 20-year follow-up with malignant degeneration of both nevus components. *Pediatr Dermatol.* 2005;22(1):44-7.
  151. Bouthors J, Vantyghem M-C, Manouvrier-Hanu S, Soudan B, Proust E, Happle R, et al. Phacomatosis pigmentokeratotic associated with hypophosphataemic rickets, pheochromocytoma and multiple basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 2006;155(1):225-6.
  152. Larizza L, Roversi G, Volpi L. Rothmund-Thomson syndrome Review. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:2.
  153. Tévar E, Torrelo A, Contreras F, Colmenero I, Zambrano A. Multiple basal cell carcinomas on phacomatosis pigmentokeratotic. *Actas Dermosifiliogr.* 2006;97(8):518-21.
  154. Gerretsen AL, van der Putte SC, Deenstra W, van Vloten WA. Cutaneous cylindroma with malignant transformation. *Cancer.* 1993;72(5):1618-23.
  155. Ishikawa M, Nakanishi Y, Yamazaki N, Yamamoto A. Malignant eccrine spiradenoma: a case report and review of the literature. *Dermatol Surg.* 2001;27(1):67-70.
  156. Johnson SC, Bennett RG. Occurrence of basal cell carcinoma among multiple trichoepitheliomas. *J Am Acad Dermatol.* 1993;28(2 Pt 2):322-6.
  157. Carsuzaa F, Carloz E, Lebeuf M, Grob JJ, Arnoux D. Multiple trichoepithelioma, cylindroma, miliaria and carcinomatous transformation. *Ann Dermatol Venereol.* 1992;119(10):746-8.
  158. Androphy EJ, Dvoretzky I, Lowy DR. X-linked inheritance of epidermodysplasia verruciformis. Genetic and virologic studies of a kindred. *Arch Dermatol.* 1985;121(7):864-8.

159. Ramoz N, Favre M, Orth G, Taïeb A, Rueda LA, Montoya LS, et al. Evidence for a Nonallelic Heterogeneity of Epidermodysplasia Verruciformis with Two Susceptibility Loci Mapped to Chromosome Regions 2p21–p24 and 17q25. *J Invest Dermatol.* 2000;114(6):1148-53.
160. Depaoli M. Epidermodysplasia verruciformis with bowenoid degeneration and multiple basocellular and spinocellular epitheliomas. *G Ital Dermatol Minerva Dermatol.* 1971;46(9):407-17.
161. Sharquie KE, Al-Meshhadani SA, Al-Nuaimy AA. Invasive squamous cell carcinoma of the eyes in patients with epidermodysplasia verruciformis. *Saudi Med J.* 2007;28(5):787-90.
162. Korswagen LA, Huizing M, Simsek S, Janssen JJ, Zweegman S. A novel mutation in a Turkish patient with Hermansky-Pudlak syndrome type 5. *Eur J Haematol.* 2008;80(4):356-60.
163. Ponti G, Losi L, Di Gregorio C, Roncucci L, Pedroni M, Scarselli A, et al. Identification of Muir-Torre syndrome among patients with sebaceous tumors and keratoacanthomas: role of clinical features, microsatellite instability, and immunohistochemistry. *Cancer.* 2005;103(5):1018-25.
164. Bhajjee F, Brown AS. Muir-Torre syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(12):1685-9.
165. Morita K, Miwa M. Werner's syndrome associated with basal cell epithelioma. *J Dermatol.* 1995;22(9):693-5.
166. Hrabko RP, Milgrom H, Schwartz RA. Werner's syndrome with associated malignant neoplasms. *Arch Dermatol.* 1982;118(2):106-8.
167. Shiver M, Hughes M, Naylor M, McLarney B, Stolle C, Shalin S, et al. A novel CYLD gene mutation and multiple basal cell carcinomas in a patient with Brooke-Spiegler syndrome. *Clin Exp Dermatol.* 2016;41(1):98-100.
168. Castori M, Ruggieri S, Giannetti L, Annessi G, Zambruno G. Schöpf-Schulz-Passarge syndrome: further delineation of the phenotype and genetic considerations. *Acta Derm Venereol.* 2008;88(6):607-12.
169. Marcil I, Stern RS. Risk of developing a subsequent nonmelanoma skin cancer in patients with a history of nonmelanoma skin cancer: a critical review of the literature and meta-analysis. *Arch Dermatol.* 2000;136(12):1524-30.
170. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol.* 2006;19(S2):S127-47.
171. Sexton M, Jones DB, Maloney ME. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma. Study of a series of 1039 consecutive neoplasms. *J Am Acad Dermatol.* 1990;23(6 Pt 1):1118-26.
172. Hendrix JD, Parlette HL. Micronodular basal cell carcinoma. A deceptive histologic subtype with frequent clinically undetected tumor extension. *Arch Dermatol.* 1996;132(3):295-8.
173. Maloney ME, Jones DB, Sexton FM. Pigmented basal cell carcinoma: investigation of 70 cases. *J Am Acad Dermatol.* 1992;27(1):74-8.
174. Strutton GM. Pathological variants of basal cell carcinoma. *Australas J Dermatol.* 1997;38 Suppl 1:S31-5.
175. Siegle RJ, MacMillan J, Pollack SV. Infiltrative basal cell carcinoma: a nonsclerosing subtype. *J Dermatol Surg Oncol.* 1986;12(8):830-6.
176. de Faria J. Basal cell carcinoma of the skin with areas of squamous cell carcinoma: a basosquamous cell carcinoma? *J Clin Pathol.* 1985;38(11):1273-7.

177. LeBoit PE. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization, International Academy of Pathology, European Organization for Research on Treatment of Cancer, UniversitätsSpital Zürich. Departement Pathologie. Pathology and genetics of skin tumours. IARC Press; 2006. 13-9 p.
178. Grilli R, Soriano ML, Izquierdo MJ, Fariña MC, Renedo G, Martín L, et al. Basal cell carcinoma with matrical differentiation. *Actas Dermosifiliogr.* 1998;89(11):631-7.
179. Mohan SV., Chang ALS. Advanced Basal Cell Carcinoma: Epidemiology and Therapeutic Innovations. *Curr Dermatol Rep.* 2014;3(1):40-5.
180. Chren MM, Linos E, Torres JS, Stuart SE, Parvataneni R, Boscardin WJ. Tumor recurrence 5 years after treatment of cutaneous basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 2013;133(5):1188-96.
181. Fecher LA, Sharfman WH. Advanced basal cell carcinoma, the hedgehog pathway, and treatment options - role of smoothed inhibitors. *Biologics.* 2015;9:129-40.
182. Ganti AK, Kessinger A. Systemic therapy for disseminated basal cell carcinoma: An uncommon manifestation of a common cancer. *Cancer Treat Rev.* 2011;37(6):440-3.
183. Edge SB, Compton CC. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(6):1471-4.
184. Lear JT, Corner C, Dziewulski P, Fife K, Ross GL, Varma S, et al. Challenges and new horizons in the management of advanced basal cell carcinoma: A UK perspective. *Br J Cancer.* 2014;111(8):1476-81.
185. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, et al. Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2012;366(23):2171-9.
186. Basset-Seguín N, Hauschild A, Grob J-J, Kunstfeld R, Dréno B, Mortier L, et al. Vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma (STEVIE): a pre-planned interim analysis of an international, open-label trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(6):729-36.
187. Migden MR, Guminski A, Gutzmer R, Dirix L, Lewis KD, Combemale P, et al. Treatment with two different doses of sonidegib in patients with locally advanced or metastatic basal cell carcinoma (BOLT): a multicentre, randomised, double-blind phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2015;16(6):716-28.
188. Dreier J, Cheng PF, Bogdan Alleman I, Gugger A, Hafner J, Tschopp A, et al. Basal cell carcinomas in a tertiary referral centre: a systematic analysis. *Br J Dermatol.* 2014;171(5):1066-72.
189. Bath-Hextall FJ, Perkins W, Bong J, Williams HC. Interventions for basal cell carcinoma of the skin. *Cochrane database Syst Rev.* 2007;(1):CD003412.
190. S Sekulic A, Migden MR, Basset-Seguín N, Garbe C, Gesierich A, Lao CD, et al. Long-term safety and efficacy of vismodegib in patients with advanced basal cell carcinoma: Final update of the pivotal ERIVANCE BCC study. *BMC Cancer.* 2017;17(1):332.
191. Dummer R, Guminski A, Gutzmer R, Dirix L, Lewis KD, Combemale P, et al. The 12-month analysis from Basal Cell Carcinoma Outcomes with LDE225 Treatment (BOLT): A phase II, randomized, double-blind study of sonidegib in patients with advanced basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2016;75(1):113-125.e5
192. Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med.* 2009;361(12):1173-8.



193. Sharpe HJ, Pau G, Dijkgraaf GJ, Basset-Seguín N, Modrusan Z, Januario T, et al. Genomic analysis of smoothed inhibitor resistance in basal cell carcinoma. *Cancer Cell*. 2015;27(3):327-41.
194. Makinodan E, Marneros AG. Protein kinase A activation inhibits oncogenic Sonic hedgehog signalling and suppresses basal cell carcinoma of the skin. *Exp Dermatol*. 2012;21(11):847-52.
195. Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Undén AB, Sandstedt B, et al. Mammalian Suppressor-of-Fused modulates nuclear–cytoplasmic shuttling of GLI-1. *Nat Cell Biol*. 1999;1(5):312-9.
196. Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Loipetzberger A, Damhofer H, Zoidl K, et al. Hedgehog-EGFR cooperation response genes determine the oncogenic phenotype of basal cell carcinoma and tumour-initiating pancreatic cancer cells. *EMBO Mol Med*. 2012;4(3):218-33.
197. Fan Q, Gu D, He M, Liu H, Sheng T, Xie G, et al. Tumor shrinkage by cyclopamine tartrate through inhibiting hedgehog signaling. *Chin J Cancer*. 2011;30(7):472-81.
198. Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons K V., et al. Itraconazole, a Commonly Used Antifungal that Inhibits Hedgehog Pathway Activity and Cancer Growth. *Cancer Cell*. 2010;17(4):388-99.
199. Chen B, Trang V, Lee A, Williams NS, Wilson AN, Epstein EH, et al. Posaconazole, a Second-Generation Triazole Antifungal Drug, Inhibits the Hedgehog Signaling Pathway and Progression of Basal Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(5):866-76.
200. Kim J, Tang JY, Gong R, Kim J, Lee JJ, Clemons KV, et al. Itraconazole, a commonly used antifungal that inhibits Hedgehog pathway activity and cancer growth. *Cancer Cell*. 2010;17(4):388-99.
201. Ally MS, Ransohoff K, Sarin K, Atwood SX, Rezaee M, Bailey-Healy I, et al. Effects of combined treatment with arsenic trioxide and itraconazole in patients with refractory metastatic basal cell carcinoma. *JAMA Dermatol*. 2016;152(4):452-6.
202. Sonidegib and Buparlisib in Treating Patients With Advanced or Metastatic Basal Cell Carcinoma - Full Text View - ClinicalTrials.gov [Internet]. [citado 11 de junio de 2018]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02303041>
203. Illmensee K. Reversion of malignancy and normalized differentiation of teratocarcinoma cells in chimeric mice. *Basic Life Sci*. 1978;12:3-25.
204. Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today*. 2000;6(8):324-9.
205. Tlsty TD, Hein PW. Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev*. 2001;11(1):54-9.
206. Chrenek MA, Wong P, Weaver VM. Tumour-stromal interactions. Integrins and cell adhesions as modulators of mammary cell survival and transformation. *Breast Cancer Res*. 2001;3(4):224-9.
207. van den Hooff A. Stromal Involvement In Malignant Growth. *Adv Cancer Res*. 1988;50:159-96.
208. Skobe M, Fusenig NE. Tumorigenic conversion of immortal human keratinocytes through stromal cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(3):1050-5.
209. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*. 1999;59(19):5002-11.

210. Dolle ME, Giese H, Hopkins CL, Martus HJ, Hausdorff JM, Vijg J. Rapid accumulation of genome rearrangements in liver but not in brain of old mice. *Nat Genet.* 1997;17(4):431-4.
211. Dollé ME, Snyder WK, Gossen JA, Lohman PH, Vijg J. Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(15):8403-8.
212. Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez P-Y, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(21):12072-7.
213. Schatton T, Schütte U, Frank NY, Zhan Q, Hoerning A, Robles SC, et al. Modulation of T-cell activation by malignant melanoma initiating cells. *Cancer Res.* 2010;70(2):697-708.
214. Khong HT, Wang QJ, Rosenberg SA. Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *J Immunother.* 2004;27(3):184-90.
215. Solana R, Casado JG, Delgado E, DelaRosa O, Marín J, Durán E, et al. Lymphocyte activation in response to melanoma: Interaction of NK-associated receptors and their ligands. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56(1):101-9.
216. Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, Romero P, Schreier M, French LE, et al. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science.* 1996;274(5291):1363-6.
217. Gorelik L, Flavell R a. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med.* 2001;7(10):1118-22.
218. Nicolaou A, Estdale SE, Tzatsali M, Herrero DP, Thody AJ. Prostaglandin production by melanocytic cells and the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone. *FEBS Lett.* 2004;570(1-3):223-6.
219. Becker JC, Brabletz T, Czerny C, Termeer C, Bröcker EB. Tumor escape mechanisms from immunosurveillance: induction of unresponsiveness in a specific MHC-restricted CD4+ human T cell clone by the autologous MHC class II+ melanoma. *Int Immunol.* 1993;5(12):1501-8.
220. Jacobs JFM, Nierkens S, Figdor CG, de Vries IJM, Adema GJ. Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol.* 2012;13(1):e32-42.
221. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science.* 2008;322(5899):271-5.
222. Fife BT, Bluestone JA. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev.* 2008;224(1):166-82.
223. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J Exp Med.* 2009;206(13):3015-29.
224. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12(6):492-9.
225. Fridman WH, Galon J, Pagès F, Tartour E, Sautès-Fridman C, Kroemer G. Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer Res.* 2011;71(17):5601-5.
226. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):436-44.
227. Wong DA, Bishop GA, Lowes MA, Cooke B, Barnetson RS, Halliday GM. Cytokine profiles

- in spontaneously regressing basal cell carcinomas. *Br J Dermatol.* 2000;143(1):91-8.
228. Mapara MY, Sykes M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol.* 2004;22(6):1136-51.
  229. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):252-64.
  230. Birch KE, Vukmanovic-Stejic M, Reed JR, Akbar AN, Rustin MHA. The immunomodulatory effects of regulatory T cells: implications for immune regulation in the skin. *Br J Dermatol.* 2005;152(3):409-17.
  231. Baecher-Allan CM, Wolf E, Hafler D. Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4CD25 T cells. *Clin Immunol.* 2005;115(1):10-8.
  232. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* 2005;65(6):2457-64.
  233. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 2000;192(9):1213-22.
  234. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res.* 2003;9(12):4404-8.
  235. Kono K, Kawaida H, Takahashi A, Sugai H, Mimura K, Miyagawa N, et al. CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother.* 2006;55(9):1064-71.
  236. Szczepanik AM, Siedlar M, Sierzega M, Goroszeniuk D, Bukowska-Strakova K, Czupryna A, et al. T-regulatory lymphocytes in peripheral blood of gastric and colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol.* 2011;17(3):343-8.
  237. Clark WH, Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst.* 1989;81(24):1893-904.
  238. Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer.* 1996;77(7):1303-10.
  239. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2012;30(21):2678-83.
  240. Mihm MC, Clemente CG, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest.* 1996;74(1):43-7.
  241. Taylor RC, Patel A, Panageas KS, Busam KJ, Brady MS. Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2007;25(7):869-75.
  242. Tas F, Erturk K. Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) May be Only an Independent Predictor of Nodal Involvement but not for Recurrence and Survival in Cutaneous Melanoma Patients. *Cancer Invest.* 2017;35(8):501-5.
  243. Viguier M, Lemaître F, Verola O, Cho M-S, Gorochov G, Dubertret L, et al. Foxp3 expressing CD4+CD25high regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol.*

- 2004;173(2):1444-53.
244. Baumgartner JM, Gonzalez R, Lewis KD, Robinson W a, Richter D a, Palmer BE, et al. Increased survival from stage IV melanoma associated with fewer regulatory T Cells. *J Surg Res*. 2009;154(1):13-20.
  245. Miracco C, Mourmouras V, Biagioli M, Rubegni P, Mannucci S, Monciatti I, et al. Utility of tumour-infiltrating CD25+FOXP3+ regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma. *Oncol Rep*. 2007;18(5):1115-22.
  246. Schatton T, Scolyer RA, Thompson JF, Mihm MC Jr. Tumor-infiltrating lymphocytes and their significance in melanoma prognosis. *Methods Mol Biol*. 2014;1102:287-324.
  247. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010;236:219-42.
  248. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001;2(3):261-8.
  249. Derks S, Nason KS, Liao X, Stachler MD, Liu KX, Liu JB, et al. Epithelial PD-L2 Expression Marks Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(10):1123-9.
  250. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(2):207-12.
  251. Wang X, Teng F, Kong L, Yu J. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther*. 2016;9:5023-39.
  252. Khalili JS, Liu S, Rodríguez-Cruz TG, Whittington M, Wardell S, Liu C, et al. Oncogenic BRAF(V600E) promotes stromal cell-mediated immunosuppression via induction of interleukin-1 in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2012;18(19):5329-40.
  253. Rodić N, Anders RA, Eshleman JR, Lin M-T, Xu H, Kim JH, et al. PD-L1 expression in melanocytic lesions does not correlate with the BRAF V600E mutation. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(2):110-5.
  254. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*. 2012;4(127):127ra37.
  255. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther*. 2015;14(4):847-56.
  256. Meng X, Huang Z, Teng F, Xing L, Yu J. Predictive biomarkers in PD-1/PD-L1 checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(10):868-76.
  257. Nduom EK, Wei J, Yaghi NK, Huang N, Kong L-Y, Gabrusiewicz K, et al. PD-L1 expression and prognostic impact in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2016;18(2):195-205.
  258. Nguyen LT, Ohashi PS. Clinical blockade of PD1 and LAG3 — potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(1):45-56.
  259. Wang A, Wang HY, Liu Y, Zhao MC, Zhang HJ, Lu ZY, et al. The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: A meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*. 2015;41(4):450-6.
  260. Massi D, Brusa D, Merelli B, Ciano M, Audrito V, Serra S, et al. PD-L1 marks a subset of melanomas with a shorter overall survival and distinct genetic and morphological characteristics. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2014;25(12):2433-42.
  261. Swaika A, Hammond WA, Joseph RW. Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in

- cancer therapy. *Mol Immunol*. 2015;67(2):4-17.
262. Kee D, McArthur G. Immunotherapy of melanoma. *Eur J Surg Oncol*. 2017;43(3):594-603.
  263. Shimizu K, Okita R, Saisho S, Maeda A, Nojima Y, Nakata M. Prognostic value of Cox-2 and PD-L1 expression and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes in resected lung adenocarcinoma. *Cancer Manag Res*. 2017;9:741-50.
  264. Brody R, Zhang Y, Ballas M, Siddiqui MK, Gupta P, Barker C, et al. PD-L1 expression in advanced NSCLC: Insights into risk stratification and treatment selection from a systematic literature review. *Lung Cancer*. 2017;112:200-15.
  265. Mukherji D, Jabbour MN, Saroufim M, Temraz S, Nasr R, Charafeddine M, et al. Programmed Death-Ligand 1 Expression in Muscle-Invasive Bladder Cancer Cystectomy Specimens and Lymph Node Metastasis: A Reliable Treatment Selection Biomarker? *Clin Genitourin Cancer*. 2016;14(2):183-7.
  266. Hansen AR, Siu LL. PD-L1 Testing in Cancer. *JAMA Oncol*. 2016;2(1):15-6.
  267. Wimberly H, Brown JR, Schalper K, Haack H, Silver MR, Nixon C, et al. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(4):326-32.
  268. Deng L, Liang H, Burnette B, Beckett M, Darga T, Weichselbaum RR, et al. Irradiation and anti-PD-L1 treatment synergistically promote antitumor immunity in mice. *J Clin Invest*. 2014;124(2):687-95.
  269. Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(5):275-87.
  270. Mahoney KM, Rennert PD, Freeman GJ. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14(8):561-84.
  271. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015;16(4):375-84.
  272. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373(1):23-34.
  273. Robert C, Schachter J, Long G V., Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2521-32.
  274. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;372(21):2006-17.
  275. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793-800.
  276. Buchbinder EI, Desai A. CTLA-4 and PD-1 pathways similarities, differences, and implications of their inhibition. *Am J Clin Oncol*. 2016;39(1):98-106.
  277. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-39.
  278. Paulson KG, Iyer JG, Blom A, Warton EM, Sokil M, Yelistratova L, et al. Systemic immune suppression predicts diminished Merkel cell carcinoma-specific survival independent of

- stage. *J Invest Dermatol.* 2013;133(3):642-6.
279. Afanasiev OK, Yelistratova L, Miller N, Nagase K, Paulson K, Iyer JG, et al. Merkel polyomavirus-specific t cells fluctuate with merkel cell carcinoma burden and express therapeutically targetable PD-1 and Tim-3 exhaustion markers. *Clin Cancer Res.* 2013;19(19):5351-60.
  280. Paulson KG, Carter JJ, Johnson LG, Cahill KW, Iyer JG, Schrama D, et al. Antibodies to merkel cell polyomavirus T antigen oncoproteins reflect tumor burden in merkel cell carcinoma patients. *Cancer Res.* 2010;70(21):8388-97.
  281. Wong SQ, Waldeck K, Vergara IA, Schröder J, Madore J, Wilmott JS, et al. UV-Associated Mutations Underlie the Etiology of MCV-Negative Merkel Cell Carcinomas. *Cancer Res.* 2015;75(24):5228-34.
  282. Harms PW, Vats P, Verhaegen ME, Robinson DR, Wu Y-M, Dhanasekaran SM, et al. The Distinctive Mutational Spectra of Polyomavirus-Negative Merkel Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 2015;75(18):3720-7.
  283. Goh G, Walradt T, Markarov V, Blom A, Riaz N, Doumani R, et al. Mutational landscape of MCPyV-positive and MCPyV-negative Merkel cell carcinomas with implications for immunotherapy. *Oncotarget.* 2016;7(3):3403-15.
  284. Lipson EJ, Vincent JG, Loyo M, Kagohara LT, Luber BS, Wang H, et al. PD-L1 expression in the Merkel cell carcinoma microenvironment: association with inflammation, Merkel cell polyomavirus and overall survival. *Cancer Immunol Res.* 2013;1(1):54-63.
  285. Dowlatshahi M, Huang V, Gehad AE, Jiang Y, Calarese A, Teague JE, et al. Tumor-specific T cells in human Merkel cell carcinomas: a possible role for Tregs and T-cell exhaustion in reducing T-cell responses. *J Invest Dermatol.* 2013;133(7):1879-89.
  286. Topalian SL, Bhatia S, Hollebecque A, Awada A, Boer JP De, Kudchadkar RR, et al. Abstract CT074: Non-comparative, open-label, multiple cohort, phase 1/2 study to evaluate nivolumab (NIVO) in patients with virus-associated tumors (CheckMate 358): Efficacy and safety in Merkel cell carcinoma (MCC). *Cancer Res.* 2017;77(13 Supplement):CT074-CT074.
  287. Kaufman HL, Russell J, Hamid O, Bhatia S, Terheyden P, D'Angelo SP, et al. Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016;17(10):1374-85.
  288. Nghiem PT, Bhatia S, Lipson EJ, Kudchadkar RR, Miller NJ, Annamalai L, et al. PD-1 Blockade with Pembrolizumab in Advanced Merkel-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2016;374(26):2542-52.
  289. Research Center for Drug Evaluation and Approved Drugs - Avelumab (BAVENCIO). [Internet]. [Citado 21 de mayo de 2018]. Disponible en: <https://www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm547965.htm>
  290. García-Pedrero JM, Martínez-Cambor P, Diaz-Coto S, Munguia-Calzada P, Vallina-Alvarez A, Vazquez-Lopez F, et al. Tumor programmed cell death ligand 1 expression correlates with nodal metastasis in patients with cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Am Acad Dermatol.* 2017;77(3):527-33.
  291. Jiao Q, Liu C, Li W, Li W, Fang F, Qian Q, et al. Programmed death-1 ligands 1 and 2 expression in cutaneous squamous cell carcinoma and their relationship with tumour-infiltrating dendritic cells. *Clin Exp Immunol.* 2017;188(3):420-9.
  292. Lipson EJ, Bagnasco SM, Moore J, Jang S, Patel MJ, Zachary AA, et al. Tumor Regression and Allograft Rejection after Administration of Anti-PD-1. *N Engl J Med.* 2016;374(9):896-8.

293. Chang ALS, Kim J, Luciano R, Sullivan-Chang L, Colevas AD. A case report of unresectable cutaneous squamous cell carcinoma responsive to pembrolizumab, a programmed cell death protein 1 inhibitor. *JAMA Dermatol.* 2016;152(1):106-8.
294. Stevenson ML, Wang CQF, Abikhair M, Roudiani N, Felsen D, Krueger JG, et al. Expression of Programmed Cell Death Ligand in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma and Treatment of Locally Advanced Disease With Pembrolizumab. *JAMA Dermatol.* 2017;153(4):299-303.
295. Falchook GS, Leidner R, Stankevich E, Piening B, Bifulco C, Lowy I, et al. Responses of metastatic basal cell and cutaneous squamous cell carcinomas to anti-PD1 monoclonal antibody REGN2810. *J Immunother Cancer.* 2016;4(1):70.
296. Borradori L, Sutton B, Shayesteh P, Daniels GA. Rescue therapy with anti-programmed cell death protein 1 inhibitors of advanced cutaneous squamous cell carcinoma and basosquamous carcinoma: preliminary experience in five cases. *Br J Dermatol.* 2016;175(6):1382-6.
297. Winkler JK, Schneiderbauer R, Bender C, Sedlacek O, Fröhling S, Penzel R, et al. Anti-programmed cell death-1 therapy in nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 2017;176(2):498-502.
298. Day F, Kumar M, Fenton L, Gedye C. Durable Response of Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Skin to Ipilimumab Immunotherapy. *J Immunother.* 2017;40(1):36-8.
299. Primary analysis of phase 2 results for cemiplimab, a human monoclonal anti-PD-1, in patients with metastatic cutaneous squamous cell carcinoma (mCSCC). | 2018 ASCO Annual Meeting Abstracts [Internet]. [citado 6 de junio de 2018]. Disponible en: [http://abstracts.asco.org/214/AbstView\\_214\\_216339.html](http://abstracts.asco.org/214/AbstView_214_216339.html)
300. Migden MR, Rischin D, Schmults CD, Guminski A, Hauschild A, Lewis KD, et al. PD-1 Blockade with Cemiplimab in Advanced Cutaneous Squamous-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2018. doi: 10.1056/NEJMoa1805131 [Epub ahead of print]
301. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol.* 2015;33(17):1794-82.
302. Schwarz A, Schwarz T. UVR-induced regulatory T cells switch antigen-presenting cells from a stimulatory to a regulatory phenotype. *J Invest Dermatol.* 2010;130(7):1914-21.
303. Kripke ML. Ultraviolet Radiation and Immunology: Something New under the Sun- Presidential Address. *Cancer Res.* 1994;54(23):6102-5.
304. Taguchi K, Fukunaga A, Ogura K, Nishigori C. The role of epidermal Langerhans cells in NB-UVB-induced immunosuppression. *Kobe J Med Sci.* 2013;59(1):E1-9.
305. Young JW, Baggers J, Soergel SA. High-dose UV-B radiation alters human dendritic cell costimulatory activity but does not allow dendritic cells to tolerize T lymphocytes to alloantigen in vitro. *Blood.* 1993;81(11):2987-97.
306. Norris P, Poston RN, Thomas DS, Thornhill M, Hawk J, Haskard DO. The expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in experimental cutaneous inflammation: a comparison of ultraviolet B erythema and delayed hypersensitivity. *J Invest Dermatol.* 1991;96(5):763-70.
307. Hollis DE, Scheibner A. Ultrastructural changes in epidermal Langerhans cells and melanocytes in response to ultraviolet irradiation, in Australians of Aboriginal and Celtic descent. *Br J Dermatol.* 1988;119(1):21-31.
308. Duthie MS, Kimber I, Norval M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *Br J Dermatol.* 1999;140(6):995-1009.

309. Loser K, Apelt J, Voskort M, Mohaupt M, Balkow S, Schwarz T, et al. IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice. *J Immunol*. 2007;179(1):365-71.
310. Beissert S, Hosoi J, Kühn R, Rajewsky K, Müller W, Granstein RD. Impaired immunosuppressive response to ultraviolet radiation in interleukin-10-deficient mice. *J Invest Dermatol*. 1996;107(4):553-7.
311. Omland S, Nielsen P, Gjerdrum L, Gniadecki R. Immunosuppressive Environment in Basal Cell Carcinoma: The Role of Regulatory T Cells. *Acta Derm Venereol*. 2016;96(7):917-21.
312. Kaporis HG, Guttman-Yassky E, Lowes MA, Haider AS, Fuentes-Duculan J, Darabi K, et al. Human basal cell carcinoma is associated with Foxp3+ T cells in a Th2 dominant microenvironment. *J Invest Dermatol*. 2007;127(10):2391-8.
313. Ho WL, Murphy GM. Update on the pathogenesis of post-transplant skin cancer in renal transplant recipients. *Br J Dermatol*. 2008;158(2):217-24.
314. Winkelhorst J, Brokelman W, Tiggeler R, Wobbles T. Incidence and clinical course of de-novo malignancies in renal allograft recipients. *Eur J Surg Oncol*. 2001;27(4):409-13.
315. Hartevelt MM, Bavinck JN, Kootte AM, Vermeer BJ, Vandenbroucke JP. Incidence of skin cancer after renal transplantation in The Netherlands. *Transplantation*. 1990;49(3):506-9.
316. Lindelöf B, Sigurgeirsson B, Gäbel H, Stern RS. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol*. 2000;143(3):513-9.
317. Garrido PMC, Borges-Costa J. Skin disorders in renal transplant recipients: a retrospective study. *An Bras Dermatol*. 2017;92(5):638-41.
318. Moloney FJ, Comber H, O'Lorcain P, O'Kelly P, Conlon PJ, Murphy GM. A population-based study of skin cancer incidence and prevalence in renal transplant recipients. *Br J Dermatol*. 2006;154(3):498-504.
319. Euvrard S, Kanitakis J, Pouteil-Noble C, Dureau G, Touraine JL, Faure M, et al. Comparative epidemiologic study of premalignant and malignant epithelial cutaneous lesions developing after kidney and heart transplantation. *J Am Acad Dermatol*. 1995;33(2 Pt 1):222-9.
320. Gogia R, Binstock M, Hirose R, Boscardin WJ, Chren M-M, Arron ST. Fitzpatrick skin phototype is an independent predictor of squamous cell carcinoma risk after solid organ transplantation. *J Am Acad Dermatol*. 2013;68(4):585-91.
321. García J, Suárez-Varela M, Vilata J, Marquina A, Pallardó L, Crespo J. Risk factors for non-melanoma skin cancer in kidney transplant patients in a Spanish population in the Mediterranean region. *Acta Derm Venereol*. 2013;93(4):422-7.
322. Jensen P, Hansen S, Møller B, Leivestad T, Pfeffer P, Geiran O, et al. Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *J Am Acad Dermatol*. 1999;40(2 Pt 1):177-86.
323. Guba M, Graeb C, Jauch KW, Geissler EK. Pro- and anti-cancer effects of immunosuppressive agents used in organ transplantation. *Transplantation*. 2004;77(12):1777-82.
324. Wimmer CD, Rentsch M, Crispin A, Illner W-D, Arbogast H, Graeb C, et al. The janus face of immunosuppression – de novo malignancy after renal transplantation: the experience of the Transplantation Center Munich. *Kidney Int*. 2007;71(12):1271-8.
325. Wimmer CD, Angele MK, Schwarz B, Pratschke S, Rentsch M, Khandoga A, et al. Impact of cyclosporine versus tacrolimus on the incidence of de novo malignancy following liver transplantation: a single center experience with 609 patients. *Transpl Int*. 2013;26(10):999-1006.



326. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. *BMJ*. 2005;331(7520):810.
327. Robbins HA, Clarke CA, Arron ST, Tatalovich Z, Kahn AR, Hernandez BY, et al. Melanoma Risk and Survival among Organ Transplant Recipients. *J Invest Dermatol*. 2015;135(11):2657-65.
328. Jiyad Z, Olsen CM, Burke MT, Isbel NM, Green AC. Azathioprine and Risk of Skin Cancer in Organ Transplant Recipients: Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Transplant*. 2016;16(12):3490-503.
329. O'Donovan P, Perrett CM, Zhang X, Montaner B, Xu Y-Z, Harwood CA, et al. Azathioprine and UVA light generate mutagenic oxidative DNA damage. *Science*. 2005;309(5742):1871-4.
330. Aguiar D, Martínez-Urbistondo D, D'Avola D, Iñarrairaegui M, Pardo F, Rotellar F, et al. Conversion from Calcineurin Inhibitor-Based Immunosuppression to Mycophenolate Mofetil in Monotherapy Reduces Risk of De Novo Malignancies After Liver Transplantation. *Ann Transplant*. 2017;22:141-7.
331. Karagas MR, Cushing GL, Greenberg ER, Mott LA, Spencer SK, Nierenberg DW. Non-melanoma skin cancers and glucocorticoid therapy. *Br J Cancer*. 2001;85(5):683-6.
332. Sørensen HT, Møllekjær L, Nielsen GL, Baron JA, Olsen JH, Karagas MR. Skin cancers and non-hodgkin lymphoma among users of systemic glucocorticoids: a population-based cohort study. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(9):709-11.
333. Knoll GA, Kokolo MB, Mallick R, Beck A, Buenaventura CD, Ducharme R, et al. Effect of sirolimus on malignancy and survival after kidney transplantation: systematic review and meta-analysis of individual patient data. *BMJ*. 2014;349:g6679-g6679.
334. Curson C, Weedon D. Spontaneous regression in basal cell carcinomas. *J Cutan Pathol*. 1979;6(5):432-7.
335. Hunt MJ, Halliday GM, Weedon D, Cooke BE, Barnetson RS. Regression in basal cell carcinoma: an immunohistochemical analysis. *Br J Dermatol*. 1994;130(1):1-8.
336. Chang J, Zhu GA, Cheung C, Li S, Kim J, Chang ALS. Association between programmed death ligand 1 expression in patients with basal cell carcinomas and the number of treatment modalities. *JAMA Dermatol*. 2017;153(4):285-90.
337. Lipson EJ, Lilo MT, Ogurtsova A, Esandrio J, Xu H, Brothers P, et al. Basal cell carcinoma: PD-L1/PD-1 checkpoint expression and tumor regression after PD-1 blockade. *J Immunother cancer*. 2017;5(1):23.
338. Mohan S V., Kuo KY, Chang ALS. Incidental regression of an advanced basal cell carcinoma after ipilimumab exposure for metastatic melanoma. *JAAD Case Reports*. 2016;2(1):13-5.
339. Ikeda S, Goodman AM, Cohen PR, Jensen TJ, Ellison CK, Frampton G, et al. Metastatic basal cell carcinoma with amplification of PD-L1: exceptional response to anti-PD1 therapy. *NPJ Genomic Med*. 2016;1(1):16037.
340. Mudigonda T, Pearce DJ, Yentzer BA, Williford P, Feldman SR. The economic impact of non-melanoma skin cancer: a review. *J Natl Compr Canc Netw*. 2010;8(8):888-96.
341. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell*. 2016;165(3):535-50.
342. Bonilla X, Parmentier L, King B, Bezrukov F, Kaya G, Zoete V, et al. Genomic analysis identifies new drivers and progression pathways in skin basal cell carcinoma. *Nat Genet*.

- 2016;48(4):398-406.
343. Han JJ, Kim D-W, Koh J, Keam B, Kim TM, Jeon YK, et al. Change in PD-L1 Expression After Acquiring Resistance to Gefitinib in EGFR-Mutant Non-Small-Cell Lung Cancer. *Clin Lung Cancer*. 2016;17(4):263-270.
  344. Bishop JL, Sio A, Angeles A, Roberts ME, Azad AA, Chi KN, et al. PD-L1 is highly expressed in Enzalutamide resistant prostate cancer. *Oncotarget*. 2015;6(1):234-42.
  345. Grabosch S, Zeng F, Zhang L, Strange M, Brozick J, Edwards RP, et al. PD-L1 biology in response to chemotherapy in vitro and in vivo in ovarian cancer. *J Immunother Cancer*. 2015;3(Suppl 2):P302.
  346. Mino-Kenudson M. Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) expression by immunohistochemistry: could it be predictive and/or prognostic in non-small cell lung cancer? *Cancer Biol Med*. 2016;13(2):157-70.
  347. Chen TC, Wu CT, Wang CP, Hsu WL, Yang TL, Lou PJ, et al. Associations among pretreatment tumor necrosis and the expression of HIF-1 $\alpha$  and PD-L1 in advanced oral squamous cell carcinoma and the prognostic impact thereof. *Oral Oncol*. 2015;51(11):1004-10.
  348. Buchanan L, De'Ambrosio B, De'Ambrosio K, Warren T, Huilgol S, Soyer HP, et al. Defining incidental perineural invasion: the need for a national registry. *Australas J Dermatol*. 2014;55(2):107-10.
  349. Niazi ZB, Lamberty BG. Perineural infiltration in basal cell carcinomas. *Br J Plast Surg*. 1993;46(2):156-7.
  350. Ratner D, Lowe L, Johnson TM, Fader DJ. Perineural spread of basal cell carcinomas treated with Mohs micrographic surgery. *Cancer*. 2000;88(7):1605-13.
  351. Santos AB de O, Andrade NMM de, Brandão LG, Cernea CR, Santos AB de O, Andrade NMM de, et al. Which features of advanced head and neck basal cell carcinoma are associated with perineural invasion? *Braz J Otorhinolaryngol*. 2017;83(1):94-7.
  352. Cernea CR, Ferraz AR, de Castro I V., Sotto MN, Logullo SpaceF, Bacchi CE, et al. Perineural Invasion in Aggressive Skin Carcinomas of the Head and Neck. *ORL*. 2009;71(1):21-6.
  353. Gygi SP, Rochon Y, Franz A, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*. 1999;19(3):1720-30.
  354. Chen G, Gharib TG, Huang C-C, Taylor JMG, Misek DE, Kardina SLR, et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1(4):304-13.
  355. Pascal LE, True LD, Campbell DS, Deutsch EW, Risk M, Coleman IM, et al. Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics*. 2008;9(1):246.



## **11. ANEXO**



## 11. ANEXO

Listado de genes diferencialmente expresados entre los distintos tipos histológicos de CBC (FDR<5%).

Gene ID	Score (d)	MORFEIFOR MES	NODULARES	INFILTRAN TES	SG	SUPERFICI ALES	FDR (%)
LST1	0,719	-1,309	-2,891	1,764	1,555	0,287	0,000
GPR141	0,617	2,284	-2,359	0,508	0,842	-0,116	0,000
VAV1	0,610	-2,675	-1,498	1,440	0,584	1,003	0,000
ADAM8	0,607	-2,097	-1,965	1,473	0,540	1,268	0,000
UPK1B	0,590	3,332	-0,338	-1,194	0,599	-0,651	0,000
GRM1	0,580	-1,761	1,765	-1,031	0,683	-0,375	0,000
IL17RE	0,571	-0,944	1,987	-1,727	0,538	0,078	0,000
C10orf27	0,569	-1,674	1,817	-1,152	-0,044	0,600	0,000
UST	0,568	-1,185	2,208	-1,368	0,005	-0,035	0,000
ABI3	0,564	-1,629	-1,662	1,751	-0,310	1,038	0,000
HGD	0,557	1,830	-1,458	0,355	1,358	-1,505	0,000
RELB	0,552	-1,093	-2,047	1,769	0,023	0,765	0,000
C16orf74	0,550	-1,622	2,076	-1,146	-0,126	0,266	0,000
PRPH	0,546	-0,418	-1,903	0,209	1,020	1,528	0,000
FHOD3	0,539	-0,785	2,241	-0,813	-0,500	-0,724	0,000
SBNO2	0,539	-1,358	-1,935	1,687	-0,193	1,211	0,000
SLCO2B1	0,533	-0,915	-2,038	1,409	0,201	1,027	0,000
MYO1F	0,533	-1,706	-1,721	1,435	0,272	1,008	0,000
NOS1	0,532	1,363	-1,840	0,288	1,228	-0,301	0,000
LOC284798	0,531	-1,646	1,850	-0,710	-0,082	-0,195	0,000
PRTG	0,526	3,208	-0,978	-0,225	-0,108	-0,409	2,000
VAT1L	0,526	-0,127	1,862	-1,262	0,033	-0,532	2,000
LOC283392	0,522	2,122	-1,600	0,454	0,524	-0,640	2,000
LOC339535	0,522	0,771	0,596	0,682	-0,048	-2,606	2,000
GKAP1	0,520	-0,734	2,278	-0,938	-0,143	-1,047	2,000
IL4I1	0,518	-2,049	-1,100	1,594	0,079	0,297	2,000
MMP9	0,516	-2,415	-0,344	1,449	-0,221	0,069	2,000
JAK3	0,516	-1,758	-1,257	1,532	-0,072	0,613	2,000
C10orf54	0,515	-0,794	-2,029	0,848	0,729	1,243	2,000
DDO	0,512	0,911	-0,597	0,630	1,047	-2,198	2,000
MAP7D2	0,511	-0,254	2,011	-0,458	-0,936	-0,854	2,000
ENPP5	0,507	-1,024	1,969	-1,102	0,131	-0,420	2,000
RBP2	0,505	-0,976	1,868	-1,059	-0,251	0,097	2,000
TNFAIP2	0,502	-0,410	-1,788	1,795	-0,076	-0,058	2,000
RAPH1	0,501	3,471	-1,999	-0,542	0,005	1,337	2,000
NTRK2	0,499	1,865	-1,742	0,503	0,628	-0,451	2,000
TNFRSF1B	0,499	-1,117	-1,660	1,282	0,001	1,082	2,000

<b>C10orf50</b>	0,498	-0,847	-1,674	0,399	0,831	1,409	2,000
<b>DNAH6</b>	0,498	0,859	1,687	-1,162	-0,109	-1,005	2,000
<b>TXNDC3</b>	0,495	2,170	-0,757	0,494	0,222	-1,635	2,000
<b>DCDC2</b>	0,494	2,389	0,283	0,137	-0,924	-1,301	2,000
<b>MYO1G</b>	0,494	-1,281	-1,574	1,327	0,101	0,873	2,000
<b>GXYLT2</b>	0,492	2,191	-1,398	0,586	0,043	-0,624	2,695
<b>TNFRSF6B</b>	0,491	-1,782	-1,391	1,210	-0,025	1,338	2,695
<b>CYTH4</b>	0,491	-0,874	-1,772	1,362	0,048	0,870	2,695
<b>EPCAM</b>	0,488	-1,138	1,742	-1,021	-0,291	0,392	2,695
<b>FAT4</b>	0,487	1,678	-1,936	0,713	0,247	0,090	2,695
<b>MAP3K14</b>	0,487	-1,315	-1,894	1,328	0,106	1,370	2,695
<b>SDC2</b>	0,486	-0,739	1,909	-1,254	-0,217	0,156	2,695
<b>CD300A</b>	0,483	-2,244	-0,878	1,326	-0,118	0,827	2,695
<b>LCA5</b>	0,483	0,016	1,894	-0,956	0,206	-1,438	2,695
<b>ITGBL1</b>	0,483	2,642	-0,671	0,272	-0,234	-1,159	2,695
<b>ARHGAP9</b>	0,483	-1,602	-1,418	1,371	0,189	0,692	2,695
<b>LTA</b>	0,482	-2,764	-0,181	0,884	0,594	0,055	2,695
<b>PLCE1</b>	0,482	-0,538	1,810	-1,057	-0,737	0,459	2,695
<b>GIMAP1</b>	0,481	-1,870	-1,219	0,849	0,401	1,243	2,695
<b>TMEM27</b>	0,481	-0,288	1,923	-0,907	-0,333	-0,665	2,695
<b>DMRTC1B</b>	0,480	-0,504	1,819	-0,057	-0,932	-1,086	2,695
<b>PLAC8</b>	0,480	-2,522	-0,374	1,116	0,307	0,115	2,695
<b>LMCD1</b>	0,479	0,661	-1,602	1,416	-1,009	0,691	2,695
<b>THBS4</b>	0,479	1,789	-0,350	0,697	-0,205	-1,779	2,695
<b>FGF14</b>	0,477	2,800	-0,642	-0,074	-0,160	-0,807	2,695
<b>CABLES1</b>	0,477	-1,618	1,758	-0,819	-0,313	0,401	2,695
<b>TRHDE</b>	0,477	1,644	-1,746	0,432	0,532	-0,034	2,695
<b>KRT4</b>	0,476	1,506	-1,536	0,408	0,797	-0,535	2,695
<b>LRRC25</b>	0,475	-0,565	-1,731	1,279	0,155	0,587	2,695
<b>PIK3R5</b>	0,475	-1,266	-1,434	1,304	-0,157	1,016	2,695
<b>DENND2A</b>	0,475	-1,492	1,915	-0,732	-0,197	-0,226	2,695
<b>GMFG</b>	0,475	-2,011	-1,024	1,196	-0,019	0,976	2,695
<b>NFAM1</b>	0,473	-2,801	0,735	0,150	-0,379	1,209	2,695
<b>TNFRSF8</b>	0,472	-1,322	-1,265	1,249	-0,303	1,081	2,695
<b>HCK</b>	0,471	-1,355	-1,287	1,428	-0,129	0,609	2,695
<b>TSHR</b>	0,471	-0,143	1,540	-1,409	-0,048	0,324	2,695
<b>LILRB1</b>	0,471	-0,866	-0,984	1,634	-0,501	-0,108	2,695
<b>LOC340074</b>	0,471	-0,514	1,723	-1,288	0,030	0,017	2,695
<b>HSPA6</b>	0,470	-0,417	-1,819	1,023	0,697	0,380	2,695
<b>KIAA0040</b>	0,470	-2,253	1,618	0,093	-0,636	-0,105	2,695
<b>FMNL1</b>	0,470	-1,963	-1,216	1,328	0,200	0,722	2,695
<b>GGTA1</b>	0,469	-0,309	-2,010	0,776	1,055	0,570	2,695
<b>SDK1</b>	0,468	-1,913	-0,965	1,301	0,302	0,229	2,695
<b>HLA.DPB1</b>	0,468	-1,330	-1,517	1,090	0,345	0,933	2,695

ACSS1	0,467	-0,933	2,007	-0,488	-0,375	-0,989	2,695
PLEKHO2	0,466	-0,312	-1,875	1,540	-0,380	0,827	2,695
IL15RA	0,464	-0,562	-1,752	1,106	0,503	0,487	2,695
BIN1	0,463	-2,101	1,607	-0,258	-0,078	-0,286	2,695
FAM198B	0,463	2,062	-1,329	0,837	-0,347	-0,583	2,695
LILRA1	0,462	-0,366	-1,437	1,343	-0,228	0,364	2,695
PDE6A	0,462	2,176	-0,409	-0,294	0,781	-1,480	3,126
WAS	0,462	-1,585	-1,118	1,334	-0,126	0,687	3,126
GZMA	0,462	-2,460	-0,085	0,802	-0,213	0,836	3,126
GFPT2	0,461	0,824	-1,724	1,074	-0,069	0,173	3,126
GPR143	0,461	-0,730	1,511	-1,173	-0,477	0,930	3,126
KLK4	0,460	1,863	-1,213	0,643	-0,064	-0,623	3,126
OR5P3	0,460	0,459	-1,453	-0,283	0,730	1,419	3,126
DOK2	0,460	-1,703	-1,245	1,219	0,306	0,629	3,126
PHOSPHO1	0,460	-0,333	-1,444	1,385	-0,659	0,816	3,126
DPYSL3	0,459	1,507	-1,825	0,398	0,639	0,112	3,126
ALOX5	0,459	-0,143	-1,664	1,358	-0,126	0,385	3,126
VENTX	0,458	0,186	-1,828	0,873	0,225	0,794	3,126
CSF2RB	0,458	-0,741	-1,562	1,304	-0,049	0,678	3,126
MN1	0,456	1,829	-1,357	0,561	0,442	-0,872	3,126
CD209	0,456	-1,560	-1,055	1,180	-0,312	1,077	3,126
KLKP1	0,455	1,738	-1,260	0,663	0,016	-0,595	3,126
HMGN3	0,455	-0,990	2,124	-0,555	-0,093	-1,356	3,126
CCIN	0,454	1,707	-1,535	0,621	-0,071	0,025	3,126
CADPS	0,454	2,002	-1,189	0,647	-0,338	-0,426	3,126
KIAA1755	0,454	1,956	-1,252	0,677	0,033	-0,814	3,126
SLCO5A1	0,454	-0,540	-1,079	1,554	0,072	-0,786	3,126
STAC2	0,454	-1,662	1,497	-0,739	0,211	0,031	3,126
L3MBTL4	0,453	-0,891	1,671	-1,160	0,403	-0,312	3,126
LIMCH1	0,453	2,845	-0,567	0,109	-0,569	-0,762	3,126
POU2F2	0,453	-1,024	-1,287	1,436	-0,120	0,334	3,126
LILRB2	0,452	-0,795	-1,093	1,509	-0,552	0,286	3,126
PIK3AP1	0,451	-0,737	-1,543	1,412	0,095	0,277	3,126
TMEM90B	0,451	1,309	-1,014	1,071	-0,242	-1,032	3,126
NFKB2	0,451	-1,442	-1,262	1,683	0,048	-0,032	3,126
ZNF883	0,450	-0,433	1,485	-0,787	0,541	-1,201	3,126
AGBL2	0,449	1,063	1,507	-0,596	-0,508	-1,380	3,126
ITGB2	0,449	-1,824	-1,000	1,281	0,141	0,450	3,126
TSPAN4	0,448	-2,001	1,433	-0,664	0,288	0,153	3,126
PGF	0,447	-1,626	1,675	-0,385	-0,218	-0,347	3,126
SPI1	0,447	-1,175	-1,363	1,290	0,030	0,630	3,126
RGS19	0,446	0,100	-1,737	1,315	-0,205	0,484	3,126
GPR64	0,446	2,245	-1,150	0,225	0,437	-0,899	3,126
PREPL	0,445	1,397	1,631	-1,274	0,392	-1,755	3,126



<b>MFNG</b>	0,445	-0,901	-1,528	0,765	0,399	1,131	3,126
<b>ODF3B</b>	0,445	-0,920	-1,595	0,915	0,565	0,775	3,126
<b>DYDC2</b>	0,444	-0,922	1,531	-1,113	0,069	0,257	3,126
<b>C14orf73</b>	0,444	-1,395	-0,982	1,070	0,916	-0,498	3,126
<b>CSF1R</b>	0,443	-0,740	-1,570	1,243	0,208	0,475	3,126
<b>LRRC15</b>	0,443	1,604	-1,127	0,895	-0,314	-0,687	3,126
<b>CDS1</b>	0,443	1,936	0,612	-1,957	0,664	0,224	3,126
<b>IRAK3</b>	0,443	1,507	-1,740	0,747	0,074	0,079	3,126
<b>SLC3A2</b>	0,443	-2,123	1,785	-0,476	-0,349	0,185	3,126
<b>PPIL6</b>	0,442	0,303	1,637	-1,307	-0,101	-0,270	3,126
<b>NFKBIZ</b>	0,442	0,403	-1,860	0,884	0,077	0,845	3,126
<b>CST7</b>	0,442	-2,203	-0,548	0,894	0,065	0,828	3,126
<b>CSF3R</b>	0,442	-1,191	-0,994	1,126	-0,485	1,020	3,126
<b>TDRD12</b>	0,442	0,160	1,514	-0,330	-0,434	-1,270	3,126
<b>RLTPR</b>	0,442	-1,771	-0,987	0,981	0,301	0,717	3,126
<b>SAMD5</b>	0,441	0,304	1,499	-1,217	-0,458	0,226	3,126
<b>HPCAL4</b>	0,441	-1,553	1,275	-0,207	0,584	-1,116	3,126
<b>CD7</b>	0,441	-1,864	-0,528	1,149	-0,428	0,715	3,126
<b>GLRB</b>	0,441	2,402	-0,992	-0,191	0,212	-0,245	3,126
<b>SELPLG</b>	0,441	-1,866	-1,052	0,960	0,378	0,826	3,126
<b>CCL19</b>	0,441	-1,464	-1,089	1,145	0,304	0,347	3,126
<b>OR5P2</b>	0,440	0,259	-1,381	-0,318	0,989	1,198	3,126
<b>COTL1</b>	0,440	-1,301	-1,315	1,283	0,026	0,672	3,126
<b>ACAP1</b>	0,438	-1,934	-0,958	0,982	0,380	0,693	3,126
<b>P2RY6</b>	0,438	-1,406	-1,174	1,180	-0,118	0,898	3,126
<b>IL21R</b>	0,437	-1,314	-1,078	1,363	0,066	0,136	3,126
<b>TNF</b>	0,437	-0,924	-1,194	1,476	-0,077	-0,003	3,126
<b>MYO7B</b>	0,436	0,641	-1,813	0,511	0,502	0,718	3,310
<b>DOK6</b>	0,436	2,671	-0,934	-0,145	-0,127	-0,188	3,310
<b>EPR1</b>	0,436	-0,038	0,625	0,671	-1,815	0,187	3,310
<b>SLC1A4</b>	0,435	-0,608	1,759	-0,028	-1,262	-0,556	3,310
<b>C2orf15</b>	0,435	-0,646	1,737	-1,161	0,391	-0,578	3,310
<b>DYNC2LI1</b>	0,434	0,442	1,688	-1,472	-0,134	-0,121	3,310
<b>C3orf51</b>	0,434	-1,553	1,252	-0,485	-0,450	0,699	3,310
<b>TPD52L1</b>	0,433	1,652	-1,599	0,222	0,727	-0,137	3,310
<b>RND1</b>	0,433	-2,261	0,160	0,629	-0,504	0,984	3,310
<b>RHOF</b>	0,433	-2,163	-0,679	0,933	0,168	0,798	3,310
<b>PLK3</b>	0,433	1,038	-1,812	0,614	-0,330	1,276	3,310
<b>LAIR1</b>	0,433	-1,124	-1,157	1,433	-0,182	0,299	3,310
<b>NMNAT2</b>	0,432	-1,513	1,570	-0,292	-0,353	-0,268	3,310
<b>OR51B5</b>	0,432	1,159	1,130	-1,384	0,079	-0,240	3,310
<b>SLC22A8</b>	0,432	-1,339	1,364	0,362	-0,954	-0,484	3,310
<b>MMP25</b>	0,432	-1,912	-0,718	0,922	-0,202	1,150	3,310
<b>VASH1</b>	0,432	-0,141	-1,300	1,665	-0,087	-0,750	3,310

<b>INPP5D</b>	0,431	-1,285	-1,445	0,960	0,690	0,588	3,310
<b>LOC10013087</b>	0,431	-1,048	1,509	-0,990	0,178	0,034	3,310
<b>2</b>							
<b>LOC10012678</b>	0,431	-1,538	1,585	-0,606	-0,063	-0,084	3,310
<b>4</b>							
<b>C1orf88</b>	0,431	-0,819	1,735	-0,484	-0,664	-0,312	3,310
<b>CORO1A</b>	0,430	-1,439	-1,251	1,013	0,498	0,561	3,310
<b>SOX17</b>	0,430	0,040	-1,626	0,066	0,958	1,096	3,310
<b>TNFAIP3</b>	0,430	-0,894	-1,486	1,376	0,533	-0,175	3,310
<b>CARD16</b>	0,430	-2,380	1,335	-0,127	-0,176	0,225	3,310
<b>NCKAP1L</b>	0,429	-1,370	-1,276	1,135	0,225	0,674	3,310
<b>CYP4F3</b>	0,429	1,402	-1,521	0,224	0,703	-0,041	3,310
<b>ACBD6</b>	0,429	-2,741	2,081	0,072	-0,401	-0,690	3,310
<b>FERMT3</b>	0,428	-1,269	-1,348	1,184	0,229	0,616	3,310
<b>DUSP10</b>	0,428	-1,798	1,460	-0,565	-0,007	0,155	3,310
<b>NEDD4L</b>	0,428	-0,694	1,512	-1,256	-0,055	0,518	3,310
<b>FCGR2A</b>	0,428	-0,510	-1,249	1,412	-0,301	0,160	3,310
<b>CEACAM21</b>	0,427	-1,494	-1,158	0,601	0,825	0,775	3,310
<b>SDF2L1</b>	0,427	-1,645	-0,637	1,449	0,077	-0,442	3,310
<b>HGF</b>	0,427	0,597	-1,581	0,943	-0,226	0,556	3,310
<b>NFIB</b>	0,427	-0,872	1,731	-0,860	-0,436	0,109	3,310
<b>PYHIN1</b>	0,427	-1,899	-0,822	1,009	0,298	0,520	3,310
<b>TAP1</b>	0,427	-2,152	-0,738	0,917	1,057	-0,205	3,310
<b>HCST</b>	0,427	-2,266	-0,452	0,535	0,425	0,911	3,310
<b>COL4A5</b>	0,426	-0,632	1,874	-0,832	-0,315	-0,488	3,310
<b>AOAH</b>	0,426	-1,690	-0,954	1,355	0,006	0,320	3,310
<b>BAI3</b>	0,426	1,396	-1,575	0,416	0,466	0,006	3,310
<b>C10orf79</b>	0,425	-0,136	1,340	-0,880	0,588	-1,104	3,310
<b>HCLS1</b>	0,425	-1,275	-1,195	1,154	-0,009	0,741	3,310
<b>ALCAM</b>	0,425	-0,458	1,697	-1,114	-0,285	0,105	3,310
<b>IFI30</b>	0,425	-1,704	-0,764	1,232	-0,192	0,506	3,310
<b>AMPH</b>	0,424	1,930	-1,240	0,312	0,364	-0,588	3,310
<b>ME3</b>	0,424	1,414	-1,371	0,888	-0,040	-0,508	3,310
<b>PTGFR</b>	0,424	0,770	-1,624	0,954	0,074	0,095	3,310
<b>GDNF</b>	0,424	0,468	-1,614	0,884	0,091	0,409	3,310
<b>CPN2</b>	0,424	1,748	-1,067	0,650	-0,192	-0,609	3,310
<b>MYBPC2</b>	0,423	0,388	-1,207	1,264	-0,295	-0,323	3,310
<b>CD53</b>	0,423	-1,315	-1,283	1,000	0,472	0,570	3,310
<b>GIMAP6</b>	0,423	-1,513	-1,224	1,013	0,209	0,937	3,310
<b>PTPN1</b>	0,423	-0,715	-1,472	2,027	-0,403	-0,299	3,310
<b>C5orf27</b>	0,422	1,561	-1,297	0,269	0,686	-0,554	3,310
<b>HRH2</b>	0,421	-0,778	-1,351	1,225	0,202	0,213	3,310
<b>FXR1</b>	0,421	-1,015	2,430	-0,379	-0,767	-1,263	3,310
<b>TMEM232</b>	0,421	0,652	1,463	-0,493	-0,342	-1,394	3,310

<b>AGAP2</b>	0,421	-0,918	-1,425	1,193	0,117	0,592	3,310
<b>KIAA1826</b>	0,421	-0,746	1,773	-0,829	0,054	-0,716	3,310
<b>TBXAS1</b>	0,421	-0,165	-1,430	1,135	-0,527	0,941	3,310
<b>PRRX1</b>	0,420	1,793	-0,922	0,674	0,037	-1,188	3,310
<b>C17orf60</b>	0,420	-0,578	-1,333	1,163	-0,255	0,716	3,310
<b>NLRP3</b>	0,420	-0,490	-1,596	0,954	0,229	0,807	3,310
<b>TMTC1</b>	0,420	-0,166	1,280	-1,343	0,293	0,189	3,310
<b>SASH3</b>	0,420	-1,521	-1,097	1,120	0,226	0,544	3,310
<b>ANKRD58</b>	0,420	0,398	-1,532	0,925	0,441	-0,171	3,310
<b>ICAM1</b>	0,419	-0,901	-1,019	1,474	-0,480	0,225	3,310
<b>ARHGAP4</b>	0,418	-1,718	-0,977	1,142	0,088	0,645	3,310
<b>GPR65</b>	0,418	-1,306	-1,234	0,948	0,108	1,037	3,310
<b>COL29A1</b>	0,418	-1,988	0,317	-0,335	0,266	1,269	3,310
<b>SLC7A5</b>	0,418	-1,635	1,419	-0,402	-0,528	0,461	3,310
<b>MS4A4A</b>	0,418	-0,891	-1,344	1,153	-0,025	0,698	3,310
<b>FMOD</b>	0,417	1,064	-1,650	0,792	-0,234	0,584	3,310
<b>STARD8</b>	0,417	-0,246	-1,476	1,331	-0,043	0,123	3,310
<b>C7orf31</b>	0,417	-1,298	1,564	0,358	-0,974	-0,782	3,310
<b>NEURL2</b>	0,417	-1,594	-0,685	1,138	-0,465	0,812	3,310
<b>LGALS9</b>	0,417	-1,714	-0,563	1,354	-0,110	-0,103	3,310
<b>TMEFF2</b>	0,416	1,738	-1,171	-0,214	0,739	-0,096	3,310
<b>WFIKKN2</b>	0,416	-0,820	1,222	-1,098	0,106	0,572	3,310
<b>UGT3A2</b>	0,416	-0,509	1,172	-1,162	0,009	0,647	3,310
<b>ARHGEF1</b>	0,416	-1,506	-1,312	1,129	0,135	0,954	3,310
<b>MSRB2</b>	0,416	0,126	1,899	-0,909	-0,826	-0,319	3,310
<b>RASSF4</b>	0,416	0,042	-1,536	1,216	0,016	0,125	3,310
<b>ITGAX</b>	0,416	-0,962	-1,337	1,175	0,087	0,561	3,310
<b>PLEK</b>	0,415	-1,370	-1,094	1,195	0,091	0,465	3,310
<b>HLA.DMA</b>	0,415	-1,123	-1,401	1,103	0,456	0,442	3,607
<b>HMHA1</b>	0,414	-1,109	-1,366	0,859	0,464	0,797	3,607
<b>TUBBP5</b>	0,414	-1,638	1,366	-0,466	-0,032	0,035	3,607
<b>MAPK10</b>	0,413	0,819	1,052	-0,412	0,187	-1,705	3,607
<b>TRPM2</b>	0,413	-1,040	-1,201	1,316	0,228	-0,006	3,607
<b>CD74</b>	0,413	-1,542	-0,978	1,201	0,089	0,411	3,607
<b>RSPH3</b>	0,413	-1,172	1,624	-0,361	0,229	-1,212	3,607
<b>PFN4</b>	0,413	0,353	1,184	-0,220	0,078	-1,753	3,607
<b>HAUS7</b>	0,413	-0,698	1,670	-0,584	-0,265	-0,627	3,607
<b>IL2RA</b>	0,412	-1,394	-0,737	1,316	-0,212	0,113	3,607
<b>C20orf26</b>	0,412	-1,798	0,706	-0,211	-0,499	1,281	3,607
<b>RPS3</b>	0,412	-1,716	1,627	-0,684	-0,290	0,405	3,607
<b>ZFP37</b>	0,412	0,088	1,410	-0,715	0,587	-1,664	3,607
<b>RNASE6</b>	0,411	-1,219	-1,282	0,833	0,261	1,054	3,607
<b>TDO2</b>	0,411	-0,554	-0,672	1,037	-0,992	0,849	3,607
<b>ARRB2</b>	0,411	-1,500	-0,519	1,359	-0,993	0,766	3,607

<b>FAT3</b>	0,411	-0,513	1,520	-0,902	-0,079	-0,219	3,607
<b>RAX</b>	0,411	-0,448	-1,040	-0,058	0,171	1,783	3,607
<b>APP</b>	0,411	-1,573	1,717	-0,668	-0,242	0,077	3,607
<b>ACSM1</b>	0,411	1,516	-1,337	-0,275	0,688	0,488	3,607
<b>ENPP2</b>	0,410	-1,525	-1,002	0,574	0,099	1,518	3,607
<b>RTL1</b>	0,410	1,678	-1,446	0,361	-0,053	0,345	3,607
<b>PLIN5</b>	0,410	1,311	-1,255	0,457	0,571	-0,613	3,607
<b>TLR7</b>	0,410	0,269	-1,576	1,138	0,142	-0,008	3,607
<b>ADAMTS18</b>	0,409	-0,930	1,235	-1,054	0,174	0,473	3,607
<b>CBWD6</b>	0,409	-1,279	1,018	-0,133	-1,302	1,293	3,607
<b>ADAMDEC1</b>	0,408	-1,481	0,056	0,606	-0,979	1,191	3,607
<b>IFITM1</b>	0,408	-1,844	-0,693	1,212	-0,037	0,348	3,607
<b>THBS2</b>	0,408	1,095	-1,565	0,765	0,028	0,153	3,607
<b>SLC39A8</b>	0,408	0,286	-1,480	1,134	-0,124	0,177	3,607
<b>CEBPD</b>	0,407	0,413	-1,709	0,674	0,281	0,723	3,607
<b>CD4</b>	0,407	-1,275	-1,228	1,203	0,266	0,362	3,607
<b>SAMD12</b>	0,407	-0,133	1,391	-0,018	-0,282	-1,603	3,607
<b>KCTD12</b>	0,407	1,500	-1,695	0,388	0,176	0,519	3,607
<b>GIMAP5</b>	0,407	-1,456	-1,082	1,086	0,055	0,745	3,607
<b>LUZP2</b>	0,407	1,767	-0,977	0,441	0,220	-0,906	3,607
<b>LTA4H</b>	0,406	-2,447	1,581	-0,635	0,347	0,143	3,607
<b>DSCAM</b>	0,406	1,977	-0,594	0,411	-0,090	-1,197	3,607
<b>S1PR4</b>	0,406	-1,860	-0,734	0,750	0,292	0,818	3,607
<b>CDK20</b>	0,406	-1,403	1,480	-0,184	0,025	-0,877	3,607
<b>CXCR3</b>	0,406	-2,017	-0,629	0,761	0,446	0,568	3,607
<b>TERT</b>	0,406	-1,146	0,418	0,775	0,328	-1,533	3,607
<b>GIPR</b>	0,406	-1,098	-1,303	0,756	0,269	1,118	3,607
<b>PARVG</b>	0,405	-0,637	-1,519	0,774	0,629	0,615	3,607
<b>CYBA</b>	0,405	-1,023	-1,369	1,246	-0,002	0,643	3,607
<b>ST6GAL2</b>	0,404	1,746	-1,022	0,328	0,334	-0,767	3,607
<b>ZNF483</b>	0,404	-0,059	1,567	-0,878	-0,179	-0,547	3,607
<b>HAPLN3</b>	0,403	-0,904	-1,274	1,233	0,298	0,059	3,607
<b>ALPK2</b>	0,403	1,137	-0,640	1,041	-0,712	-0,825	3,607
<b>LOC151162</b>	0,403	-0,807	1,717	-0,896	-0,207	-0,143	3,607
<b>IQCD</b>	0,402	-0,584	1,503	0,270	-0,613	-1,523	3,607
<b>NCRNA00188</b>	0,402	-0,953	1,709	-0,956	-0,334	0,241	3,607
<b>C1orf38</b>	0,402	-1,107	-1,168	1,290	0,077	0,228	3,607
<b>PSMB8</b>	0,401	-2,365	-0,486	1,039	0,657	-0,136	3,607
<b>MS4A6A</b>	0,401	-0,615	-1,185	1,405	-0,339	0,204	3,607
<b>FCGR2C</b>	0,401	-0,339	-1,533	0,734	0,786	0,288	3,607
<b>CEACAM4</b>	0,401	-0,297	-0,971	1,321	-0,452	-0,066	3,607
<b>TNFSF13B</b>	0,401	-1,823	-0,493	0,891	0,891	-0,567	3,607
<b>CIITA</b>	0,401	-0,588	-1,516	0,910	0,637	0,325	4,387
<b>SYPL2</b>	0,400	1,623	-1,289	0,145	0,474	-0,130	4,387

<b>SOCS1</b>	0,400	-1,803	1,333	0,108	-0,238	-0,540	4,387
<b>BMP5</b>	0,400	1,658	-1,004	0,410	0,225	-0,737	4,387
<b>KLK2</b>	0,400	1,875	-1,065	0,284	-0,016	-0,284	4,387
<b>SECTM1</b>	0,399	-2,406	-0,197	0,613	0,089	0,915	4,387
<b>FGR</b>	0,399	-0,726	-1,228	1,198	-0,137	0,461	4,387
<b>NAV2</b>	0,399	-1,232	1,585	-0,472	-0,233	-0,335	4,387
<b>FGD2</b>	0,399	-0,785	-1,481	0,820	0,718	0,478	4,387
<b>PLD6</b>	0,399	0,384	1,389	-1,205	-0,276	0,082	4,387
<b>SERPINE2</b>	0,399	1,391	-0,755	0,897	-0,355	-1,037	4,387
<b>LCE1D</b>	0,398	-0,494	-1,232	0,014	0,975	0,976	4,387
<b>KRT17</b>	0,398	-1,908	1,142	-0,552	0,215	0,415	4,387
<b>FCGR2B</b>	0,398	-0,621	-1,442	0,648	0,676	0,649	4,387
<b>DENND3</b>	0,398	0,097	-1,563	0,987	0,114	0,402	4,387
<b>LOC440173</b>	0,398	-0,745	1,449	-0,786	0,275	-0,584	4,387
<b>IL32</b>	0,397	-1,563	-0,857	0,972	0,015	0,740	4,387
<b>CCR7</b>	0,397	-1,419	-0,662	1,251	-0,203	0,123	4,387
<b>ASS1</b>	0,397	-0,852	1,241	-1,142	0,351	0,336	4,387
<b>NOD2</b>	0,397	0,560	-1,650	0,350	0,680	0,592	4,387
<b>C16orf7</b>	0,397	0,490	-1,608	1,124	-0,871	1,167	4,387
<b>SIGLEC5</b>	0,397	-0,617	-1,371	0,917	0,081	0,812	4,387
<b>GDF7</b>	0,396	-0,365	-1,398	0,232	0,869	0,877	4,387
<b>TMEM61</b>	0,396	0,256	-1,334	0,489	1,149	-0,482	4,387
<b>MUC1</b>	0,396	1,527	-1,192	0,609	0,040	-0,472	4,387
<b>CHST2</b>	0,396	-0,800	1,553	-0,426	-0,562	-0,281	4,387
<b>TLR8</b>	0,396	-1,781	-0,738	0,977	0,211	0,471	4,387
<b>JUNB</b>	0,395	-0,223	-1,584	0,872	0,338	0,596	4,387
<b>BCL3</b>	0,395	-0,306	-1,250	1,127	-0,305	0,513	4,387
<b>POU3F3</b>	0,395	1,119	-1,146	0,859	-0,015	-0,606	4,387
<b>FAM126A</b>	0,395	2,324	-1,199	0,083	0,232	-0,379	4,387
<b>RASAL3</b>	0,395	-1,315	-1,107	0,845	0,305	0,786	4,387
<b>DNAH17</b>	0,395	1,340	-1,244	0,746	0,349	-0,879	4,387
<b>XYLT1</b>	0,394	1,025	-1,673	0,576	0,435	0,189	4,387
<b>C10orf96</b>	0,394	1,757	-0,936	0,060	0,520	-0,669	4,387
<b>PNPLA3</b>	0,394	1,774	-0,997	0,210	0,505	-0,835	4,387
<b>GGT5</b>	0,394	0,586	-1,380	1,046	-0,302	0,176	4,387
<b>GLRX</b>	0,394	1,225	-1,683	0,413	0,485	0,277	4,387
<b>KRT7</b>	0,393	0,379	-0,858	1,212	-0,495	-0,499	4,387
<b>VSIG1</b>	0,393	-1,510	1,309	0,341	-0,582	-0,701	4,387
<b>DLX4</b>	0,393	-0,263	1,337	0,098	-1,238	-0,433	4,387
<b>NDFIP1</b>	0,392	0,715	2,133	-1,423	-0,036	-1,201	4,387
<b>C3</b>	0,392	-1,289	-0,997	0,955	0,232	0,501	4,387
<b>ZBTB33</b>	0,392	-0,393	2,032	-0,921	-0,156	-0,946	4,387
<b>C21orf34</b>	0,392	0,232	1,060	-1,274	0,123	0,312	4,387
<b>CXorf1</b>	0,392	-0,700	1,384	-0,872	0,095	-0,143	4,387

<b>IL2RB</b>	0,391	-2,228	-0,022	0,833	-0,063	0,325	4,387
<b>OR13J1</b>	0,391	-0,624	1,266	-0,741	0,598	-0,881	4,387
<b>NNMT</b>	0,391	-0,068	-1,091	1,255	-0,441	0,043	4,387
<b>ICAM3</b>	0,391	-1,822	-0,758	0,913	0,469	0,319	4,387
<b>ADAMTS3</b>	0,391	-1,226	1,268	-0,750	0,281	-0,021	4,387
<b>AOX1</b>	0,391	-0,694	-1,267	0,942	-0,011	0,786	4,387
<b>C15orf60</b>	0,391	1,288	-1,269	-0,259	0,520	0,742	4,387
<b>LYN</b>	0,391	-0,553	-1,300	1,264	-0,105	0,284	4,387
<b>SRGN</b>	0,390	-1,436	-1,007	0,823	0,200	0,899	4,387
<b>LCP2</b>	0,390	-1,181	-1,019	1,181	-0,083	0,450	4,387
<b>OLFML2B</b>	0,390	0,599	-0,814	1,210	-0,541	-0,669	4,387
<b>DNM3</b>	0,390	2,790	-0,585	-0,099	-0,018	-1,019	4,387
<b>PTPRE</b>	0,390	0,485	-1,763	0,716	0,286	0,672	4,387
<b>SIGLEC14</b>	0,390	-0,677	-1,200	0,877	-0,110	0,909	4,387
<b>GIMAP7</b>	0,390	-1,556	-0,733	1,084	-0,082	0,471	4,387
<b>OR5E1P</b>	0,390	0,234	-1,207	-0,247	0,676	1,223	4,387
<b>NLRP6</b>	0,390	-0,535	-1,214	0,554	-0,028	1,286	4,387
<b>CILP</b>	0,390	1,260	-1,086	0,747	0,054	-0,691	4,387
<b>SPAG16</b>	0,389	-0,465	1,628	-0,965	0,018	-0,428	4,387
<b>TNFRSF10C</b>	0,389	0,009	-0,971	1,054	-0,805	0,613	4,387
<b>FLI1</b>	0,389	-0,103	-1,613	0,848	0,319	0,615	4,387
<b>LEFTY2</b>	0,389	2,059	-0,655	-0,520	0,147	0,164	4,387
<b>LHFPL1</b>	0,389	0,362	1,415	-0,814	-0,273	-0,628	4,387
<b>GK5</b>	0,389	2,058	-1,010	-0,181	0,714	-0,606	4,387
<b>GJA5</b>	0,389	0,031	-0,550	1,309	-0,899	-0,366	4,387
<b>SPATS2L</b>	0,389	1,843	-1,367	0,284	-0,014	0,188	4,387
<b>ZNF648</b>	0,389	-1,913	0,352	-0,420	0,815	0,623	4,387
<b>NECAB2</b>	0,388	1,269	0,286	-1,209	-0,192	0,976	4,387
<b>THY1</b>	0,388	0,411	-1,016	1,221	-0,676	-0,077	4,387
<b>GPSM3</b>	0,388	-1,681	-0,786	1,267	0,075	0,129	4,387
<b>TNFRSF18</b>	0,388	-1,484	-0,833	0,291	0,929	0,693	4,387
<b>HS3ST3B1</b>	0,388	-0,880	-1,299	0,831	0,241	0,853	4,387
<b>SPIB</b>	0,388	-1,421	-0,909	0,783	0,702	0,182	4,387
<b>FBN1</b>	0,388	1,206	-1,162	0,921	-0,330	-0,361	4,387
<b>RMND1</b>	0,387	-0,863	1,426	-1,164	0,875	-0,549	4,387
<b>ADAP1</b>	0,387	-1,518	1,356	-0,337	-0,061	-0,229	4,387
<b>KCND3</b>	0,387	-0,310	-1,449	0,799	0,542	0,330	4,387
<b>PRKX</b>	0,387	-1,514	1,337	-0,548	0,337	-0,332	4,387
<b>PPIF</b>	0,387	0,896	-1,593	0,917	0,002	0,110	4,387
<b>SNAI1</b>	0,387	-0,076	-1,362	0,977	-0,270	0,728	4,387
<b>UGT3A1</b>	0,386	-0,327	1,253	-0,819	-0,504	0,430	4,387
<b>ARHGEF37</b>	0,386	-0,774	1,086	-1,219	0,647	0,277	4,387
<b>AMACR</b>	0,386	1,176	-0,139	0,013	1,065	-2,028	4,387
<b>SHC1</b>	0,386	0,282	-1,441	1,344	-0,662	0,426	4,387

VASP	0,386	-2,312	-0,431	0,774	-0,033	1,067	4,387
BST2	0,385	-2,300	0,476	0,375	0,243	0,049	4,387
PLA2R1	0,385	1,832	-1,119	0,160	0,456	-0,545	4,387
C17orf91	0,385	1,608	-1,239	0,621	-0,394	0,058	4,387
MKX	0,385	1,333	0,331	0,373	-0,410	-1,636	4,387
FAM161A	0,385	-0,704	1,554	-0,818	-0,100	-0,247	4,387
PODNL1	0,384	1,526	-1,468	0,367	0,194	0,173	4,387
NUDT11	0,384	-0,802	1,573	-0,461	-0,117	-0,804	4,387
RNF166	0,384	-1,047	-1,224	1,265	-0,411	0,920	4,387
ERC2	0,384	-1,276	1,211	-0,565	-0,198	0,376	4,387
CHD7	0,384	1,000	-1,557	0,469	0,483	0,161	4,387
NRN1	0,384	-0,477	0,770	-1,198	0,213	1,034	4,387
MMP16	0,384	2,195	-0,478	-0,116	0,035	-0,771	4,387
CA6	0,384	0,887	-1,029	0,461	0,815	-0,948	4,387
HLA.DPA1	0,384	-1,185	-1,156	0,964	0,267	0,602	4,387
CNPY3	0,384	-2,425	0,510	0,876	-0,141	-0,303	4,387
IGSF21	0,384	-0,409	-1,114	1,170	-0,271	0,269	4,387
BTNL2	0,384	-1,270	-0,578	-0,309	1,289	0,750	4,387
MFSD7	0,384	0,133	-1,475	0,194	0,663	0,944	4,387
CCL22	0,384	-0,697	-1,138	1,038	-0,178	0,636	4,387
PTPRO	0,383	-0,159	-1,465	0,803	0,896	-0,210	4,387
LAPTM5	0,383	-1,012	-1,176	1,105	0,049	0,529	4,387
SLITRK2	0,383	-0,790	1,389	-0,793	-0,026	-0,072	4,387
HAVCR2	0,383	-1,016	-1,247	1,064	0,192	0,530	4,387
LONRF3	0,383	1,575	-1,104	0,384	0,397	-0,693	4,387
HTR2A	0,383	1,820	-0,837	0,533	-0,206	-0,785	4,387
EPB41L3	0,382	-0,016	-1,287	1,097	-0,544	0,701	4,387
SLC35E4	0,382	0,676	-1,599	0,324	0,503	0,695	4,387
ROBO3	0,382	1,066	-1,399	0,619	0,376	-0,254	4,387
BIN2	0,382	-1,303	-1,011	1,080	0,116	0,458	4,387
MLF1	0,382	-0,554	1,594	-0,566	-0,100	-0,862	4,387