



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

ESTUDIO DEL VALOR PREDICTIVO PRONÓSTICO  
DEL INFILTRADO LINFOCITARIO INTRATUMORAL  
EN EL MELANOMA CUTÁNEO

---

**TESIS DOCTORAL**

DOCTORANDO: LDO. MIGUEL MARTÍNEZ RODRÍGUEZ  
DIRECTOR: PROF. DR. CARLOS MONTEAGUDO CASTRO

VALENCIA 2013



El trabajo titulado

**“ESTUDIO DEL VALOR PREDICTIVO PRONÓSTICO DEL INFILTRADO LINFOCITARIO INTRATUMORAL EN EL MELANOMA CUTÁNEO”**

que se presenta en esta memoria, ha sido realizado por el licenciado en Medicina y Cirugía Don Miguel Martínez Rodríguez bajo mi supervisión.

Dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL.

Y para que conste a efectos oportunos, realizo esta declaración en Valencia a 3 de junio de 2013.

Carlos Monteagudo Castro



## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas que me han ayudado en la realización de este proyecto, especialmente a mi director de tesis, el Prof. Carlos Monteagudo Castro, a mi familia, por ayudarme en los momentos más necesarios con su infinito apoyo y comprensión y a todas aquellas personas que han facilitado que este trabajo salga adelante.



# ÍNDICE



1- INTRODUCCIÓN GENERAL	13
1.1- Introducción	15
1.1.1- Incidencia y mortalidad	15
1.1.2- Diferencias geográficas	17
1.1.3- Etiología	17
1.1.4- Clasificación clínico-patológica	18
1.1.5- Clasificación clínico-patológico-genética	19
1.1.6- Otros hallazgos clínicos	21
1.1.7- Melanoma y respuesta inmune	23
1.2- Linfocitos intratumorales (TIL)	26
1.3- FoxP3 y Treg	34
1.4- CCL27	39
2- METODOLOGÍA	43
2.1- Objetivos	45
2.1.1- Objetivo general	45
2.1.2- Objetivos específicos	45
2.2- Material	46
2.2.1- Criterios de exclusión	46
2.3- Métodos	46
2.3.1- Estudio clínico	46
2.3.2- Estudio histológico	47
2.3.3- Estudio inmunohistoquímico	48
2.3.4- Evaluación de la respuesta inmune	51
2.3.5- Análisis estadístico	51
3- RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL	55
3.1- Resultados	57
3.1.1- Parámetros clínicos	57
3.1.1.1- Sexo	57
3.1.1.2- Edad	57
3.1.1.3- Localización de la lesión	58
3.1.1.4- Existencia progresión de la enfermedad	59
3.1.1.5- Tiempo hasta progresión enfermedad	59
3.1.1.6- Existencia recidiva local	59

3.1.1.7- Tiempo hasta recidiva local	60
3.1.1.8- Existencia metástasis en tránsito	60
3.1.1.9- Tiempo hasta metástasis tránsito	60
3.1.1.10- Existencia metástasis ganglionar	60
3.1.1.11- Tiempo hasta metástasis ganglionar	61
3.1.1.12- Existencia metástasis a distancia	61
3.1.1.13- Tiempo hasta metástasis a distancia	61
3.1.1.14- Supervivencia a melanoma cutáneo	62
3.1.1.15- Tiempo supervivencia desde diagnóstico	62
3.1.2- Parámetros histológicos	63
3.1.2.1- Tipo histológico	63
3.1.2.2- Fase crecimiento radial	63
3.1.2.3- Fase crecimiento vertical	64
3.1.2.4- Espesor en mm (Breslow)	64
3.1.2.5- Nivel de Clark	64
3.1.2.6- Presencia de ulceración	65
3.1.2.7- Diámetro úlcera (mm)	65
3.1.2.8- Número de mitosis	66
3.1.2.9- Existencia de regresión	67
3.1.2.10- Presencia infiltrado linfocitario peritumoral	67
3.1.2.11- Presencia infiltrado linfocitario intratumoral	68
3.1.2.12- Presencia de satelitosis	68
3.1.2.13- Presencia lesión melanocítica asociada	69
3.1.2.14- Tipo celular predominante en lesión primaria	69
3.1.2.15- Presencia elastosis actínica	69
3.1.3- Parámetros inmunohistoquímicos	70
3.1.3.1- CD20	70
3.1.3.2- CD3	71
3.1.3.3- CD4	72
3.1.3.4- CD8	73
3.1.3.5- CD25	74
3.1.3.6- CD134	75
3.1.3.7- FoxP3	76
3.1.3.8- CD56	77
3.1.3.9- CCL27 en linfocitos	78

3.1.3.10- CCL27 en células tumorales	79
3.1.3.11- CCL27 en epitelio supratumoral	80
3.1.3.12- CCL27 en epitelio peritumoral	81
3.1.3.13- CCL27 en epitelio periférico	82
3.1.3.14- Porcentaje linfocitos CD20+	83
3.1.4- Estudio estadístico de todos los casos	84
3.1.5- Estudio estadístico de melanomas gruesos	92
3.1.6- Estudio estadístico de melanomas delgados	96
3.1.7- Funciones de supervivencia	100
3.2- Desarrollo argumental	103
3.2.1- Tipificación del infiltrado linfocitario	104
3.2.2- Activación linfocitaria	105
3.2.3- Linfocitos reguladores	106
3.2.4- Citocinas	108
4- CONCLUSIONES FINALES	111
5- BIBLIOGRAFÍA	115



# **1- INTRODUCCIÓN GENERAL**



## 1.1- INTRODUCCIÓN:

El melanoma es un cáncer de estirpe melanocítica agresivo y, a menudo, fatal.<sup>1</sup> La descripción original del melanoma como entidad se atribuye a René Laennec, (“The Melanoses”, 1812) quien diferenciaba dos variedades, una consistente y otra blanda.<sup>2</sup> Los melanocitos son células derivadas de la cresta neural, productoras de pigmento, que migran, entre otras localizaciones, al estrato basal de la epidermis durante el desarrollo embrionario<sup>3</sup> y que pueden adoptar diferentes morfologías<sup>4</sup>. Además de localizarse en la piel, los melanocitos también se encuentran presentes en leptomeninges, membranas mucosas y en el tracto uveal, pudiendo ocasionalmente originar melanomas en estas localizaciones.<sup>5</sup>

Durante el desarrollo embrionario los precursores de los melanocitos son los melanoblastos no pigmentados, derivados de la cresta neural. Una vez localizados en el folículo piloso, los melanoblastos pueden diferenciarse en melanocitos maduros o, por el contrario, pueden permanecer como células madre melanocíticas, responsables del mantenimiento del sistema melanocítico. En este sentido, se ha especulado que una subpoblación de células madre cancerosas sería la responsable de la quimiorresistencia del melanoma y de la alta recurrencia, agresividad y progresión de esta enfermedad.<sup>6,7</sup>

A diferencia de los melanomas situados en zonas de exposición solar, mucho más frecuentes en caucásicos, los melanomas originados en otras localizaciones, como palmas de las manos, plantas de los pies y región ungueal (melanoma lentiginoso acro), y los melanomas originados de las membranas mucosas de orofaringe, nasofaringe, recto o anogenital (melanoma de las mucosas) presentan una incidencia similar en asiáticos, africanos y caucásicos.<sup>5,8</sup>

### 1.1.1-Incidencia y mortalidad:

El melanoma se ha convertido en un importante problema de salud pública en muchos países desarrollados.<sup>9</sup>

Incidencia mundial por melanoma 2002 <sup>10</sup> 80% en Norteamérica, Australia, Nueva Zelanda y Europa	Mortalidad mundial por melanoma 2002 <sup>10</sup>
Aprox. 79.000 hombres Aprox. 81.000 mujeres	Aprox. 22.000 hombres Aprox. 19.000 mujeres

A nivel mundial el melanoma fue, en el año 2002, el 16° y 15° cáncer más frecuentemente diagnosticado en hombres y mujeres, respectivamente, y con una mayor incidencia en Australia, Nueva Zelanda, Norteamérica y Europa.<sup>10</sup> En los Estados Unidos de América, entre los años 2003 y 2007, el melanoma fue el 5° cáncer más frecuente en hombres y el 7° en mujeres.<sup>11</sup>

La incidencia del melanoma ha aumentado exponencialmente en los Estados Unidos desde 1930. De 1935 a 1939, la tasa de incidencia de melanoma era de 1,0 por 100.000 habitantes.<sup>12</sup> En 1973, la tasa de incidencia de melanoma en los Estados Unidos era de 6,8 por 100.000 habitantes y entre 2003 y 2007 esta tasa se elevó hasta 20,1 por 100000 habitantes.<sup>13</sup>

La importancia del melanoma radica en su potencial letal y la frecuencia con la que es diagnosticado en pacientes jóvenes. Se ha calculado que, en Estados Unidos, una persona que fallece por melanoma, lo hace de media unos 17 años antes de cumplir los 65, en Dinamarca 14-15 años antes, y en Bélgica 6-8 años.<sup>14,15,16</sup>

En Estados Unidos, en el periodo comprendido entre 2003 y 2007, la mortalidad por melanoma, clasificada por grupos de edades, mostró los siguientes resultados:<sup>17</sup>

Grupos de edades	Porcentaje
Menores de 20 años	0,1
Entre 20-34 años	2,7
Entre 35-44 años	6,3
Entre 45-54 años	14,3
Entre 55-64 años	19,6
Entre 65-74 años	20,9
Entre 75-84 años	24,1
Mayores 84 años	11,9

En España, en el año 2000, se detectaron 3.068 nuevos casos de melanoma y 698 muertes por melanoma.<sup>18</sup> La incidencia en España en el año 2002 fue de 1.458 hombres y 1.747 mujeres.<sup>18</sup> La supervivencia del melanoma en España a los 5 años, según datos del año 2003, para el periodo del estudio de 1990-1994, fue de 74% en hombres y 90% en mujeres.<sup>18</sup>

En la Comunitat Valenciana, la incidencia estimada para grupos tumorales y sexo en 2003 fue para melanoma de un 3,4% para hombres y un 2,5% para mujeres.<sup>19</sup>

Desde mediados de los años 60, la incidencia de melanoma ha aumentado entre el 3% y el 8% anualmente en muchos países europeos, con un importante incremento en ancianos.<sup>20</sup> Aunque este aumento puede ser atribuido en parte al mayor conocimiento de la enfermedad y al screening, existe evidencia de que el melanoma se está convirtiendo realmente en una enfermedad más frecuente. Los estudios epidemiológicos han mostrado asociación con una historia previa de quemaduras solares, principalmente en la infancia, y con exposición a luz ultravioleta de todos los tipos, incluidas las camas de bronceado. El riesgo de desarrollar melanoma cutáneo aumenta en sujetos con nevos melanocíticos y en aquellos con pecas y pelirrojos, rasgos asociados con polimorfismo en

el receptor I de la melanocortina.<sup>5,21</sup>

El melanoma cutáneo tenía peor pronóstico en los años 50 y 60, pero desde mediados de los años 70, aunque las tasas de incidencia continúan creciendo, las tasas de mortalidad en diferentes grupos de poblaciones de alto riesgo se han vuelto estables. Así, a pesar de este aumento, la supervivencia ha mejorado sustancialmente, principalmente en países con elevadas tasas de incidencia. Alrededor del 60% de los casos diagnosticados en los años 60 fallecían a causa de esta enfermedad. Actualmente, los datos más recientes de mortalidad están alrededor del 11%. Esto es debido principalmente a la detección precoz de los melanomas y al aumento en el conocimiento de la enfermedad. Y, probablemente, gran parte del éxito se deba a las campañas de prevención primaria y secundaria.<sup>14,15,16</sup>

### 1.1.2- Diferencias geográficas:

Tanto los niveles de incidencia como de mortalidad varían considerablemente alrededor del mundo. Las tasas son altas donde predominan poblaciones caucásicas y poseen una baja incidencia en países donde los habitantes son principalmente de origen africano o asiático.<sup>14,15,16</sup>

El factor de riesgo medioambiental más importante en caucásicos es la exposición a la radiación ultravioleta, haciendo que la incidencia en poblaciones blancas normalmente aumente en países próximos al Ecuador.

Desde los años 70 se han elaborado diversos informes que alertan sobre el problema del melanoma, inicialmente en términos de mortalidad y posteriormente de incidencia. Dichos informes han mostrado que las tasas de incidencia se duplican cada 1 ó 2 décadas (siendo el incremento anual entre 3% y 7%). Aumentan marcadamente en zonas del cuerpo con exposición solar intermitente (tronco, piernas, etc), siendo moderados los aumentos en cuello y cara. En pacientes varones, el mayor aumento se observó en tronco, siendo en mujeres las piernas y brazos los lugares más frecuentes.<sup>16,22,23</sup>

### 1.1.3- Etiología:

La exposición intermitente a radiación UV es el mayor factor de riesgo medioambiental para desarrollar melanoma, especialmente en combinación con factores endógenos (fototipos I y II, estatus inmunodeficiente y predisposición genética). La exposición intensa e intermitente a radiaciones ultravioleta en pacientes de raza blanca, especialmente durante la infancia, se ha postulado como el factor principal de riesgo para desarrollar melanoma, aunque también interviene en el desarrollo de la enfermedad la exposición en adultos. Múltiples episodios de quemaduras solares y una elevada exposición a lo largo de toda la vida también son factores predisponentes.<sup>25,26</sup>

La radiación ultravioleta B parece más asociada al desarrollo de melanoma que la radiación ultravioleta A,<sup>27</sup> pero no hay que olvidar que múltiples estudios han demostrado que las cabinas de bronceado constituyen un factor de riesgo para el desarrollo de melanomas.<sup>28,29</sup>

En cuanto a las evidencias de causalidad con la exposición a la luz solar, es un hecho aceptado que los episodios de quemaduras solares intensas en edades tempranas de la vida se correlacionan con un mayor riesgo de melanoma. Incluso en aquellos individuos predispuestos a tener melanoma por tener mutaciones en el gen CDKN2A, la incidencia es marcadamente mayor en individuos que viven en latitudes más bajas. Este hecho indica la existencia de interacciones estrechas entre susceptibilidad genética y factores medioambientales (radiación ultravioleta) en la génesis del melanoma.<sup>30</sup>

El melanoma se desarrolla como consecuencia de una acumulación de anomalías genéticas. Estas anomalías promueven la proliferación celular y previenen la vía normal de la apoptosis como respuesta al daño del DNA. Los melanocitos alterados acumulan daños en el DNA, resultando una selección de genes mutados que permiten el crecimiento de vasos sanguíneos, evasión de la respuesta inmune, invasión tumoral y metástasis. La activación constitutiva de mutaciones en NRAS se produce en el 21% de pacientes con melanoma. Mutaciones de BRAF se producen en el 60-80% de los melanomas.<sup>31,32,33</sup>

Factores de riesgo de melanoma maligno cutáneo:<sup>34</sup>

Factor	Riesgo relativo
Exposición solar	2-3
Nevos múltiples/displásicos	2-12
Efélides	2-3
Fototipo 1	1,4
Ojos azules	1,6
Pelo rojo	2,4-4
Antecedentes personales melanoma en el paciente	8,5
Antecedentes familiares primer grado	2-3
Fuerte historia familiar de melanoma	35-70

#### 1.1.4- Clasificación clínico-patológica:

Las características clínico-patológicas del melanoma varían en buena medida según la localización anatómica en la que se originan. Ello ha sido motivo de la diferenciación en los distintos subtipos clínico-patológicos de melanoma.<sup>21</sup> Las localizaciones afectadas con mayor frecuencia en ambos sexos (con mayor unidad de área de superficie) son la cara y el cuello.<sup>35,36</sup>

Los datos de los análisis genéticos han confirmado la existencia de diferentes subtipos con alteraciones genéticas características dependiendo del lugar anatómico y el grado de exposición solar.<sup>5</sup>

- Principales subtipos:

Melanoma invasor sobre léntigo maligno (léntigo maligno melanoma): Es más común en cabeza y cuello en pacientes ancianos. Poseen en general un pronóstico relativamente bueno.

Melanoma de extensión superficial: Este tipo de melanoma crece radialmente (horizontalmente) antes de comenzar la fase de crecimiento vertical. Es el tipo más frecuente de melanoma en caucásicos y se asocia a un relativo buen pronóstico, siendo observado con frecuencia en pacientes jóvenes y en zonas del cuerpo expuestas intermitentemente al sol.

Melanoma nodular: Suele presentarse como un nódulo de rápido crecimiento (fase vertical pura), con sangrado y ulceración frecuentes. Este es el tipo más agresivo de melanoma. Frecuentemente (pero no exclusivamente) aparece en áreas con exposición intermitentemente al sol.

Melanoma lentiginoso acro: Estas lesiones son generalmente pigmentadas, creciendo en la palma de la mano, la planta de los pies o bajo las uñas. Son de presentación tardía y representan el tipo más frecuente de melanoma en individuos con pigmentación cutánea prominente.

Otros tipos: melanoma de las mucosas, melanoma desmoplásico, melanoma lentiginoso (no acro ni asociado a léntigo solar), melanoma verrucoso (puede presentar un aspecto similar al observado en verrugas vulgares o queratosis seborreicas).

Características clínicas de los diferentes tipos de melanomas:<sup>37</sup>

Melanoma	Edad media	Sexo predominante	Tiempo de progresión	Localización más común	Características más frecuentes
Extensión superficial	40-50	Mujeres: piernas Hombres: tronco, cabeza y cuello	1-5 años	Cualquier localización	Plano o ligeramente elevado. Bordes irregulares. Áreas hipopigmentadas
Nodular	40-50	Hombres	1 mes-2 años	Cabeza y cuello	Azul-negrusco, con evolución a úlcera o costra
Léntigo maligno melanoma	70	Mujer	5-15 años	Áreas expuestas al sol	Marrón-negro. Plano. Frecuentes áreas de hipopigmentación
Lentiginoso acro	60	Principalmente en mujeres	2 meses-10 años	Palmas y plantas	Mácula marrón-negra. Borde geográfico

#### 1.1.5- Clasificación clínico-patológico-genética:

En los últimos años, se ha propuesto otro nuevo tipo de clasificación basada en la correlación

morfológico-genética.<sup>8,39,40,41,42</sup> Dado que la expresión proteica alterada en los melanomas modifica presumiblemente su patrón histológico, se han encontrado correlaciones entre las alteraciones genéticas y los parámetros clínico-patológicos, que permiten predecir en un 90% de los casos la presencia de mutaciones de BRAF. Así, es más probable esta mutación cuando el melanoma tiene más cantidad de melanocitos atípicos en los estratos altos epidérmicos, siendo estas células más grandes, redondeadas y pigmentadas, y condicionando un mayor engrosamiento de la epidermis y una mejor delimitación respecto a la epidermis adyacente.<sup>39,43</sup>

Se consideran 4 grandes grupos de melanomas:

*Melanomas asociados a daño solar crónico:* Aparecen después de la 5ª década de vida y se incrementan con la edad. Suelen afectar a cabeza, cuello y porciones más distales y dorsales de las extremidades. Presentan importante elastosis solar. No suelen asociarse a pacientes con muchos nevos melanocíticos ni a nevos displásicos, pero sí a queratosis actínica, léntigo solar y otros cánceres cutáneos no melanoma, relacionados todos ellos con la exposición solar crónica. Histológicamente muestran una fase radial lentiginosa con mala delimitación periférica. Poseen una prevalencia más baja de mutaciones BRAF que los melanomas no asociados a daño solar crónico, y presentan mutaciones de KIT o NRAS en el 30-40% de los casos.<sup>43,44</sup>

*Melanomas no acros sin daño solar crónico:* Representan el subtipo más frecuente de melanoma. La incidencia mayor es hacia los 50 años y después disminuye con la edad. Afecta típicamente a tronco y a porción proximal de extremidades, preferentemente en individuos con múltiples nevos melanocíticos. Suelen ser bastante pigmentadas y en el estudio microscópico están constituidas por células más grandes y pigmentadas, y que en su componente radial ascienden a estratos altos de la epidermis. El 70% presenta mutaciones de BRAF. Este grupo incluye la mayoría de melanomas de extensión superficial, pero también una parte de melanomas nodulares, localizados en áreas de exposición solar intermitente.<sup>8,47</sup>

*Melanomas acros:* Son aquellos situados en palmas, plantas o lecho ungueal. Un 20% de ellos presenta mutación de KIT siendo poco prevalentes las mutaciones de BRAF. En el 40% de los casos se detecta amplificación de ciclina D1. Comparten muchas características con los melanomas de las mucosas.<sup>48</sup>

*Melanomas de las mucosas:* Pueden aparecer en orofaringe, senos paranasales, conjuntiva tarsal y área anogenital. Presentan con menos frecuencia que los melanomas acros amplificación de ciclina D1 y, por el contrario, muestran con frecuencia amplificación de CDK4.<sup>46,49,50</sup>

Esta correlación de parámetros clínico-patológicos posee claras implicaciones de tipo preventivo, diagnóstico, pronóstico y terapéutico.

### 1.1.6- Otros hallazgos clínicos:

#### - Distribución de edad:

El melanoma cutáneo afecta predominantemente a pacientes adultos y ancianos, con un pico de incidencia alrededor de la sexta década de la vida. No obstante, también se detecta en adultos jóvenes, adolescentes e incluso niños.

El melanoma puede aparecer de novo, sin una lesión precursora, o puede desarrollarse a partir de un nevus melanocítico. Se ha estimado que alrededor del 20-30% de los melanomas se originan de un nevus melanocítico preexistente.

#### - Factores pronóstico:

Edad del paciente: Empeora el pronóstico en los pacientes con edades superiores a 65 años. Los pacientes ancianos muestran con mayor frecuencia melanomas más gruesos y ulcerados.

Sexo: Muchos estudios han mostrado que los melanomas en mujeres poseen mejor pronóstico, incluso con metástasis ganglionares. Las mujeres suelen tener lesiones más delgadas y con menos frecuencia ulceradas que los hombres.

Localización tumoral: Las lesiones de las extremidades tienen mejor pronóstico que las lesiones de cabeza, cuello y tronco.

Invasión de ganglios linfáticos: La presencia de afectación de ganglios linfáticos se asocia con peor pronóstico en pacientes con melanoma cutáneo.

Grosor tumoral (Breslow): El grosor tumoral y la ulceración suponen los factores pronósticos independientes más importantes. Un aumento en el grosor se asocia a una menor supervivencia.

Ulceración: La presencia de ulceración se asocia a peor pronóstico.

Nivel de Clark: Para tumores con un espesor menor de 1 mm, el nivel de Clark es menos predictivo que la ulceración, edad del paciente o localización anatómica.

Vascularización del tumor: El aumento de la vascularización tumoral se correlaciona con un peor pronóstico, estando asociado con el desarrollo de crecimiento vertical en melanomas delgados. Se han establecido 4 patrones de vascularización: ausente, escaso, moderado y prominente. El aumento de la vascularización es más frecuente en melanomas gruesos y en lesiones ulceradas.

Invasión linfovascular: Su presencia se asocia a peor pronóstico.

Lesiones satélites (incluyendo microsátélites): Su presencia se asocia a peor pronóstico.

Índice mitótico: La presencia de mitosis en células tumorales dérmicas se asocia a un peor pronóstico.

Regresión: No existe un acuerdo unánime respecto al valor pronóstico de la regresión, pero existen estudios que muestran que se trata de un factor o fenómeno adverso para el pronóstico en melanomas delgados. Este sigue siendo un tema controvertido en la actualidad.

Linfocitos intratumorales (TIL): se asocian a un mejor pronóstico si están presentes en gran cantidad. En principio, los TIL representan la respuesta del sistema inmune frente a las células del melanoma. Esta respuesta se mide normalmente por la intensidad del infiltrado linfocitario presente en la base del tumor en la fase de crecimiento vertical, y que se clasifica como abundante, no abundante o ausente.

Alteraciones genéticas: En el 20-57% de los pacientes con melanoma familiar han sido detectadas mutaciones en la línea germinal de los genes CDKN2A, CDK4 o ARF, siendo el primero de ellos el más frecuente.<sup>46,51</sup> Aunque no es lo más habitual, los nevos melanocíticos comunes y displásicos pueden ser precursores de melanomas en algunos pacientes. Sin embargo, lo cierto es que el modelo tradicional propuesto por Clark de progresión del melanoma en fases sucesivas desde melanocitos normales, pasando por los nevos melanocíticos y los displásicos, hasta llegar al melanoma invasor y al metastásico, ha demostrado no ser una constante y actualmente se considera que no es la evolución más habitual. Las alternativas a este modelo son, en estos momentos, el origen a partir de células madre del melanoma, también llamadas células iniciadoras de tumor, o bien a partir de melanocitos desdiferenciados, en un proceso complejo en el que están implicados tanto factores de disposición genética como ambientales.<sup>46,52</sup>

Mutaciones de BRAF: Son las mutaciones halladas con más frecuencia en el melanoma maligno humano (60-80%).<sup>53</sup> Esta mutación causa un aumento en la activación de las kinasas y en la señal a través de la ruta de las MAP kinasas (MAPK), provocando la activación del factor de transcripción Brp-3. Las mutaciones de BRAF se asocian a una progresión más lenta de la enfermedad, aunque no estadísticamente significativa. Las mutaciones de BRAF se detectan preferentemente en melanomas de extensión superficial, localizados en zonas de exposición solar intermitente, más pigmentados y en pacientes más jóvenes que aquellos sin mutación de BRAF. Estas mutaciones se encuentran también en los nevos melanocíticos adquiridos.<sup>43,54,55,56</sup>

Mutaciones de KIT: Se detectan mutaciones en el gen KIT en melanomas localizados en zonas desprovistas de pelo, en relación con las uñas, en mucosas y en zonas de daño solar crónico. En los melanomas con KIT mutado no suele haber mutación de BRAF. Todos ellos suelen tener un patrón lentiginoso. Su incidencia aumenta con la edad, no suelen asociarse a los nevos melanocíticos y tienen un periodo más prolongado de crecimiento intraepidérmico.<sup>43,57,58</sup> Se asocia con una mala delimitación de los márgenes laterales, al contrario que los melanomas con mutación de BRAF, que suelen estar bien delimitados.<sup>54</sup>

Mutaciones de NRAS: Se detectan mutaciones de NRAS en el 15% de melanomas.<sup>43,59,60</sup> Este fue el primer oncogén que se identificó en el melanoma.<sup>61</sup>

Es posible que las diferencias de susceptibilidad del melanoma puedan estar indirectamente asociadas a las diferentes células regionales normales acompañantes, tales como queratinocitos o

fibroblastos, que mantienen a los melanocitos en un estado quiescente.<sup>62</sup>

Metástasis a distancia: su presencia empeora notablemente el pronóstico. Existen 3 grupos de metástasis a distancia, basados en los órganos involucrados: subcutáneas o ganglios regionales, afectación pulmonar, y afectación de otros órganos. El pronóstico empeora en el mismo orden.

Lactato deshidrogenasa: Poseen mejor pronóstico si los niveles son normales. Los niveles séricos de LDH son uno de los factores pronósticos que se correlacionan directamente con la disminución de supervivencia.<sup>63</sup>

En un esfuerzo por predecir una mejor supervivencia en los pacientes con melanoma en estadios I y II, se han establecido numerosos factores clínico-patológicos independientes. La AJCC solamente incorpora como factores pronósticos: espesor tumoral, ulceración, mitosis, nódulos satélites y metástasis en tránsito, y el estado de los ganglios linfáticos.<sup>64</sup>

Diversos análisis multivariantes han demostrado que la medida del grosor tumoral (Breslow), medido desde lo más alto de la capa granulosa hasta la célula de melanoma más profunda, es el factor predictivo más importante, así como la presencia o ausencia macroscópica y/o microscópica de ulceración.<sup>65,66,67,68,69</sup> El grosor del melanoma ha sido considerado durante mucho tiempo el factor pronóstico más importante, considerándose espesores menores de 0,75 y 1 mm de buen pronóstico. No obstante, muchas lesiones mayores de 1 mm no metastatizan y el 25% de las lesiones mayores de 3 mm no recurren. Y, por otro lado, se observa un comportamiento inesperado en 3-5% de los melanomas menores de 1 mm, que se comportan de forma agresiva, desarrollando metástasis.

Se ha introducido el concepto de crecimiento en fases, empleándose los términos fase vertical y fase radial (horizontal). La fase de crecimiento vertical no está asociada obligatoriamente con el desarrollo de metástasis pero permite y facilita normalmente esta evolución. La fase de crecimiento vertical se produce principalmente en tumores gruesos, aunque se ha llegado a observar en tumores con un grosor de 0,27 mm.<sup>70,71</sup> La existencia de casos de melanoma con metástasis y sin evidencia de crecimiento en fase vertical, cuestiona el concepto de las fases de crecimiento. La presencia de regresión puede ser responsable de estas discrepancias.

#### 1.1.7- Melanoma y respuesta inmune:

La presencia de inflamación y regresión en melanomas primarios es un factor pronóstico relevante y ha sido considerado como un indicador importante de la respuesta inmune antitumoral en pacientes con melanoma.<sup>64</sup> Aunque la evaluación de los TIL parece estar enormemente influida por la variabilidad inter-observador, algunos autores han sugerido la densidad y el patrón de distribución

de TIL presentes en la fase de crecimiento vertical del melanoma cutáneo como parámetros histológicos pronósticos.<sup>64</sup>

El melanoma es un cáncer en el cual el sistema inmune juega un papel importante en el control del crecimiento de las células malignas.<sup>72</sup> De hecho, actualmente se están empleando con eficacia fármacos potenciadores de la respuesta inmune. Los melanomas poseen antígenos que pueden ser reconocidos por los linfocitos T autólogos. Algunos de ellos son específicos del tumor y, sin embargo, otros se encuentran presentes en los tejidos normales.

El melanoma humano ha sido considerado un paradigma de inmunogenicidad entre los tumores humanos, así como por sus poderosos mecanismos de escape. De hecho, en una parte de los pacientes se observa un elevado número de células T dirigidas contra diferentes antígenos asociados a tumor, tanto en el sitio del tumor como en sangre periférica, apoyando la noción de inmunogenicidad tumoral. Por otro lado, la mayoría de mecanismos clásicos o nuevos de escape a la supervisión inmune han demostrado actuar sobre el mismo punto durante la progresión del melanoma. La evidencia de desarrollo de inmunidad a antígenos tumorales puede observarse incluso en pacientes con una evolución clínica muy agresiva.<sup>73</sup>

El melanoma es bien conocido por su pobre respuesta al uso de tratamientos como radiación o quimioterapia. Ello hace especialmente importante el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. La inmunoterapia parece ser especialmente prometedora, debido a la bien conocida inmunogenicidad del melanoma. Se han intentado tratamientos con inmunoterapia específica (vacunas). Dichas vacunas fueron diseñadas para aumentar el reconocimiento de antígenos por parte del linfocito o para aumentar la respuesta inmune a través de la activación de éstos. Los estudios preclínicos de vacunación en melanoma fueron esperanzadores<sup>74</sup> pero los resultados clínicos no mejoraron las posibilidades de supervivencia. Se emplearon vacunas con células completas, antígenos peptídicos (Melan-A/MART-1, tirosinasa, gp100 y MAGE-1) y células dendríticas.<sup>75,76</sup> Dichas vacunas no consiguieron mejorar los resultados obtenidos con quimioterapia, observándose incluso, en algunas vacunas de células completas, un empeoramiento de las posibilidades de supervivencia.<sup>77</sup>

Asimismo, se han llevado a cabo diferentes estrategias con inmunoterapia inespecífica. Esta consiste en la potenciación del sistema inmune aumentando el número o función de sus componentes sin que se produzca una respuesta a un determinado antígeno.<sup>78</sup> Es la modalidad terapéutica que ha tenido un mayor desarrollo en el tratamiento del melanoma, siendo, en muchos casos, considerada el estándar de tratamiento en estos pacientes. En la actualidad hay dos grupos de

fármacos inmunoterápicos inespecíficos, las citocinas, que actúan aumentando el número y función de los linfocitos, y las proteínas de control inmune, que actúan a nivel de los mecanismos de control de la respuesta inmune liberándola y aumentándola.<sup>78</sup>

Las citocinas fueron los primeros fármacos en ensayarse a gran escala en la inmunoterapia de los pacientes con melanoma, siendo el interferón la primera que demostró alguna actividad en estos pacientes.<sup>79</sup> La segunda citocina en demostrar actividad antitumoral fue la interleucina 2 (IL2), siendo eficaz en la enfermedad diseminada. Dicha citocina demostró un incremento de la supervivencia y fue autorizada para su uso por la FDA, aunque no ha tenido mucha aceptación en Europa por la importante toxicidad asociada a la administración intravenosa requerida.<sup>80,81,82</sup>

Actualmente se están obteniendo resultados prometedores con las proteínas de control inmune, donde destacan los anticuerpos anti CTLA-4 y, en concreto, Ipilimumab.<sup>78</sup> Ipilimumab es un anticuerpo monoclonal humano IgG1, producido en células de ovario de hámster chino mediante tecnología de ADN recombinante, que actúa bloqueando al antígeno 4 asociado al linfocito citotóxico (CTLA-4).<sup>83,84,85</sup> Ipilimumab actúa indirectamente sobre el tumor al estimular al sistema inmunológico del paciente para reconocer y destruir a las células cancerosas. Bloquea al CTLA-4, que desempeña un papel importante en la supresión de la respuesta inmunológica normal frente al cáncer.<sup>86,87,88,89,90</sup> Ipilimumab impide esa supresión y, por lo tanto, permite al sistema inmunológico responder a organismos extraños como son las células tumorales, modulando el comportamiento de las células relacionadas con la inmunidad del organismo y bloqueando los mecanismos de tolerancia al cáncer. Su combinación con dacarbacina se asocia a mejor supervivencia en pacientes con melanoma metastásico previamente no tratado que dacarbacina más placebo.<sup>91,92</sup> No obstante, la insuficiente efectividad antitumoral puede ser debida a diferentes mecanismos relacionados con los cambios estructurales y funcionales producidos tanto en el tumor como en las células estromales acompañantes. Estos mecanismos incluyen la ausencia de moléculas coestimuladoras, reguladoras a la baja, en antígenos de melanoma o moléculas del CMH, así como la regulación al alza de proteínas proapoptóticas en células de melanoma.<sup>93</sup>

También se están empleando fármacos relacionados con las alteraciones moleculares del melanoma. Aproximadamente 40-60% de los melanomas cutáneos presentan mutaciones en BRAF, lo que conduce a una activación de las MAPK.<sup>8,53</sup> Vemurafenib es un potente inhibidor de BRAF mutado y se asocia con una reducción relativa del 63% de riesgo de muerte y un 74% en el riesgo de progresión en pacientes no previamente tratados, en estadio irreseccable IIIc o en estadio IV de melanomas con la mutación V600E de BRAF, cuando se compara con dacarbacina.<sup>96</sup>

## **1.2- LINFOCITOS INTRATUMORALES (TIL):**

Hace más de un siglo que se observó por primera vez que las neoplasias malignas poseían un número variable de linfocitos, los cuales fueron posteriormente denominados TIL. Inicialmente se creyó que estos TIL reflejaban el origen del cáncer en la inflamación crónica y, posteriormente, se debatió si los TIL proporcionaban un medio favorable para el crecimiento del cáncer o representaban la evidencia de que el huésped trataba de eliminar el cáncer al haber sido las células tumorales reconocidas por el sistema inmune. En 1949 se identificó por primera vez una relación entre infiltrado de células inmunes y pronóstico en casos de carcinoma mamario.<sup>97,98,99</sup>

Las células tumorales pueden provocar reconocimiento por los sistemas de respuesta inmune innata y adaptativa. La respuesta innata, que engloba granulocitos, macrófagos, células NK y células dendríticas, es la que provoca el inicio de la reacción inmune y las líneas germinales que codifican los patrones de reconocimiento de moléculas inducidas por el estrés en células tumorales.<sup>100</sup> La respuesta adaptativa, que engloba linfocitos T CD4 y CD8 y células B productoras de anticuerpo, es más lenta, pero manifiesta memoria a largo plazo, reflejando la selección y expresión de linfocitos específicos asociados a antígenos tumorales.<sup>100</sup>

Existen evidencias sustanciales que indican la participación del sistema inmune en la patogénesis del cáncer y su contribución a la progresión o inhibición del crecimiento tumoral. Estos patrones duales reflejan la relación compleja de los elementos innatos y adaptativos inmunes con el tumor y los elementos estromales no transformados en el microambiente tumoral.<sup>100</sup>

Existen numerosas publicaciones acerca de la presencia de infiltrados de células del sistema inmune en neoplasias, incluyendo el cáncer colorrectal, observándose la presencia de células T específicas para las células cancerosas colorrectales en los TIL y en sangre periférica, lo que implica que potencialmente algunas de estas células T puedan ser capaces de eliminar a las células del cáncer colorrectal.<sup>101</sup>

El papel de los TIL en la evolución o destrucción de los tumores en mamíferos ha sido demostrado experimentalmente, pero su importancia en tumores humanos ha sido considerada solamente en ciertos tipos de tumores y rechazado en otros.<sup>102,103,104,105,106,107,108,109,110,111</sup> Se ha observado asociación entre infiltrados de linfocitos y supervivencia prolongada en carcinomas de ovario, colon, riñón y pulmonares tipo no microcítico, así como también en linfomas foliculares.<sup>108,111,113,114,117,118</sup> Sin embargo, no se ha encontrado relación en otros tipos de cáncer, como el carcinoma esofágico.<sup>119</sup>

Existe evidencia de que el melanoma puede evocar respuesta inmune en algunos pacientes. Martin Mihm y Wallace Clark fueron los primeros en mostrar que el melanoma primario en fase de crecimiento radial típicamente provoca una reacción de linfocitos dérmicos significativa que puede

efectuar una destrucción parcial de tumor.<sup>120</sup> Estos autores establecieron que densos infiltrados intratumorales, que no peritumorales, en melanomas primarios en fase vertical están estrechamente relacionados con un aumento en la supervivencia y reducción de enfermedad metastásica.<sup>121,122</sup>

Si, en 1969, Clark et al. destacaron por primera vez el infiltrado linfocitario en melanoma primario cutáneo, Day et al. y Tuthill et al. encontraron posteriormente un significado pronóstico a este hallazgo. Así, pacientes con un infiltrado linfocitario moderado-abundante mostraban un mejor pronóstico y una supervivencia 3-5 veces mayor que pacientes con un infiltrado linfocitario escaso-ausente.<sup>120,124,125</sup> Elder et al. diferenciaron el infiltrado linfocitario en tres grupos: abundante, no abundante y ausente. Estos estudios demostraron que los TIL solamente tenían significado pronóstico en los melanomas en fase de crecimiento vertical. En contraste, los infiltrados linfocitarios no tenían valor pronóstico en fase de crecimiento radial.<sup>126</sup>

Otros estudios analizaron la concordancia inter-observador no sólo utilizando tres grupos (abundante, no abundante y ausente), sino como abundante y no abundante/ausente. La categoría abundante parece tener una mayor significación pronóstica.<sup>121</sup> Muchos autores no han precisado en sus publicaciones si el infiltrado linfocitario era intra- o peritumoral. Los autores que han efectuado el análisis siguiendo el método de Clark han observado como un hallazgo persistente que el pronóstico de los pacientes cuyo infiltrado inflamatorio es abundante es mejor que el de aquellos en que es escaso o está ausente.<sup>121</sup>

En el estudio de Clark et al. la tasa de supervivencia a los 8 años para pacientes con melanoma fue del 88% cuando el infiltrado linfocitario era abundante, de 75% cuando era no abundante y del 59% cuando se encontraba ausente. En el estudio de Clemente et al, la supervivencia a los 5 años era del 77% cuando era abundante, del 53% cuando era no abundante y del 37% cuando estaba ausente.<sup>121,122</sup>

Los resultados demuestran claramente que existe una buena relación entre diferentes observadores al evaluar y cuantificar los TIL.<sup>130</sup> Asimismo, se ha observado que la relación pronóstico-TIL puede estar limitada sólo a melanomas en fase de crecimiento vertical, pudiendo la inclusión en los estudios de tumores en fase de crecimiento radial diluir el valor predictivo de los TIL.<sup>130</sup>

Los datos encontrados en la bibliografía son contradictorios, en gran medida debido a las discrepancias entre las definiciones y las formas de clasificar el infiltrado, aunque algún papel parece desempeñar en el pronóstico, según indican resultados de algunos estudios, habiéndose mantenido como variable independiente para la supervivencia global en muchos de ellos.<sup>122,131,132,134,135,136</sup>

Las células tumorales que normalmente acumulan mutaciones en su genoma expresan moléculas diferentes, cuantitativa y cualitativamente, de las células normales. Un sistema de inmunovigilancia para estas moléculas, conocido como TAA (Antígeno Asociado a Tumor) juega un importante papel

en la eliminación de las células cancerosas durante su estadio inicial.<sup>137,138,139</sup> No obstante, debido a que las células tumorales son inherentemente (de manera innata) células autólogas y su inmunogenicidad es muy débil comparada con los patógenos que invaden desde fuera, las células malignas pueden evadir la inmunovigilancia y entonces producen una proliferación incontrolable y metástasis.<sup>140,141</sup> Además, es sabido que varios factores solubles secretados desde las células tumorales, inducen fallos en la respuesta inmune del huésped.<sup>142</sup>

En los melanomas, las células tumorales, el estroma circundante y la epidermis que los recubre están infiltrados por varios tipos de TIL (la mayor parte de ellos linfocitos T citotóxicos). Los TIL son los responsables de la muerte de las células tumorales y de la regresión del tumor. Dichos hallazgos han sido respaldados por el hecho de que el número de TIL y la secreción de citocinas son críticos para la regresión del melanoma inducido por células T citotóxicas.<sup>143,144,145</sup> Se ha observado que las zonas de piel normal adyacentes a melanoma cutáneo primitivo de crecimiento vertical se asocian a alteraciones en los TIL.<sup>146</sup>

La presencia de TIL es una constante en todos los espectros de las diferentes lesiones melanocíticas. La transición entre las diferentes fases se asocia a un aumento gradual de todos los tipos de TIL. Los linfocitos T CD3+ han demostrado ser más numerosos que los linfocitos B CD20+ en la mayoría de estudios realizados. Además, se observa mayor número de TIL en el estroma que en el parénquima tumoral. Las diferencias de valores de linfocitos entre piel normal y lesionada ha mostrado significación estadística en algunos estudios.<sup>147,148,149</sup>

Los TIL se encuentran ubicados dentro del espesor tumoral y en su periferia. Irónicamente, la presencia de los TIL en el contexto del crecimiento tumoral, normalmente muestra a la vez una marcada detección de la enfermedad y una deficiencia en la función inmune.<sup>150,151</sup> Todavía es desconocido el motivo por el que la respuesta de los TIL no es efectiva, pero en muchos pacientes con melanoma metastásico la enfermedad progresa a pesar de poseer una marcada respuesta de células T frente a ese tumor. La pérdida de efectividad de las células T antitumorales no parece deberse a que no alcancen los sitios tumorales. Las células T están presentes en número que no se diferencia mucho del observado en metástasis que están regresando después de inmunoterapia y que se consideran abundantes en sangre.<sup>152</sup> Se ha propuesto diferentes mecanismos de los defectos de los TIL en los diferentes tipos de cáncer:

TIL y áreas inactivas para inmunidad contra el tumor: uno de los muchos mecanismos adoptados por los tumores para destruir la vigilancia del sistema inmune es contraatacar a los TIL. Las células tumorales expresan ligandos especiales que inducen a la apoptosis en los TIL en el microambiente tumoral. En primer lugar se produce apoptosis y muerte de los TIL en el microambiente tumoral. A continuación se produce tolerancia sistémica, como sucede por ejemplo en los melanomas. Finalmente existen una serie de áreas denominadas de privilegio inmune, en las

cuales las células tumorales no se reconocen como peligrosas y pueden continuar proliferando.<sup>153,154,155,156</sup> La pérdida de antígenos también puede producirse por una mutación o delección en la codificación genética del antígeno peptídico.<sup>157</sup>

Señales defectuosas en los TIL: Se ha demostrado que los TIL poseen defectos de transducción de señal, que los hacen ineficientes o inducen su apoptosis. Por ejemplo, en el cáncer humano de cérvix se ha demostrado la regulación a la baja de los linfocitos T CD25+.<sup>158,159</sup>

Influencia del estroma tumoral: Tanto las células tumorales como el estroma influenciado por el tumor anergizan el potencial de las células T.<sup>160</sup>

Citotoxicidad celular comprometida mediada por los TIL: Pese al gran número de TIL, la citotoxicidad tumor-específica no funciona correctamente. Se ha propuesto que los linfocitos T CD4+ juegan un papel crucial en el establecimiento y mantenimiento de los linfocitos T CD8+ específicos en los infiltrados tumorales.<sup>161,162</sup> Los tumores ocultan sus antígenos a los linfocitos T CD8+. La pérdida de eficacia de los linfocitos T CD8+ se debe a 2 factores principalmente: disfunción de la maquinaria citolítica y aumento de las moléculas inhibitoras. Un ejemplo de mecanismos similares se produce en la inmunosupresión del embarazo, debido al aumento de HLA-G. Según Lefebvre et al (2002) es posible que en el cáncer de mama humano, la regulación al alza de HLA-G sea importante para que las células tumorales escapen a la inmunidad innata y adaptativa.<sup>163,164</sup>

Los marcadores inmunohistoquímicos más empleados para la tipificación de linfocitos han sido los siguientes: CD20, para identificación de células B; CD3, para identificación de células T; CD4, para identificación de T helper; CD8, para identificación de T citotóxicos; FoxP3, para identificación de Tregs; CD25 con una inmunotinción intensa, para definir a los Tregs; CD25 con una inmunotinción moderada, para identificación de activación celular; y CD56, para identificación de células NK.<sup>324</sup>

Estudios con TIL cultivados con IL2 han demostrado que la composición de los TIL es muy variable, observándose casos con un 90% de CD4 y casos con un 90% de CD8. La mayoría de estudios se han centrado en los CD8, que poseen capacidad citotóxica para destruir células tumorales transformadas.<sup>165,166,167,168</sup>

Dentro de los TIL se incluyen las células NK. Las células NK humanas poseen rasgos inmunofenotípicos que las diferencian de los linfocitos B y T. Su actividad se encuentra regulada por productos de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas.<sup>169</sup> Las células NK pueden expandirse en cultivos con la presencia de IL2, pudiendo su utilización convertirse en un posible tratamiento para melanomas.<sup>170,171,172</sup> Dichas células no han sido muy estudiadas hasta la actualidad. Las células NK son capaces de reconocer células que muestran una regulación aberrante al alza o a la baja de sus marcadores de superficie como resultado de su transformación celular.<sup>168,173</sup>

Un estudio ha demostrado que la presencia de TIL NK sólo se observa en pacientes con melanomas con buena evolución, sin evidencia de progresión de la enfermedad.<sup>174</sup> Las células NK poseen un efecto letal sobre las células del melanoma mucho mayor que el de los TIL CD3+.<sup>175</sup>

Los tumores sólidos como los melanomas expresan antígenos tumorales específicos que sirven de diana para las células T efectoras. Las células T citotóxicas “naïve” son activadas exclusivamente en órganos secundarios linfoides, como bazo y ganglios linfáticos. En fases iniciales del desarrollo de los tumores sólidos, normalmente no alcanzan los órganos linfoides, por lo que las células “naïve” T primitivas no pueden ser activadas. Como consecuencia, la vigilancia inmune del tumor es ineficaz.<sup>176</sup> Los tumores con suficiente inmunogenicidad producen una respuesta inmune con reclutamiento concomitante de TIL B, T y células NK. La inmunogenicidad del melanoma se debe a la presencia de los antígenos del melanoma (Mart-1, gp100, gp75 y tirosinasa). Los niveles de estos antígenos afectan críticamente al estado de activación de los TIL y la eficiencia de las reacciones inmunes mediadas por estas células.<sup>325</sup>

El papel de los CD4 en los TIL todavía no es bien conocido. Se ha demostrado que poseen por sí mismos la habilidad de lisar las células del melanoma.<sup>177, 178</sup>

Los linfocitos T que expresan CD4 y CD25 han sido denominados Tregs. Estos linfocitos también expresan FoxP3 y suponen entre el 5-10% de las células del infiltrado linfocitario. Deficiencias en los linfocitos Tregs han sido asociadas con enfermedades autoinmunes, considerándose dicha población linfocitaria de relevancia para la autotolerancia. Dentro de este grupo, ha sido descrito un subgrupo de linfocitos Tregs que regula la inmunotolerancia para antígenos no propios. En pacientes con neoplasias epiteliales malignas los Tregs se encuentran significativamente elevados.<sup>178,179,180,181</sup> La acumulación de los Tregs se asocia con la progresión de la enfermedad y con aumento del riesgo de recurrencia. Este aumento podría explicar la anergia de los linfocitos CD8 en este tipo de lesiones.<sup>160,182</sup>

Los TIL B han sido poco estudiados. Altos niveles de TIL B se asocian a pronóstico favorable en ciertos tipos de cáncer. En melanoma todavía no existen muchos datos.<sup>177,184,185,186</sup>

La ausencia de linfocitos T CD4+ en el tejido tumoral puede evitar la diferenciación de linfocitos T CD8+.<sup>187</sup>

En cuanto al papel de los TIL en el melanoma cutáneo los resultados publicados son contradictorios. Aunque algunos estudios muestran que un infiltrado linfocitario prominente es parámetro independiente de buen pronóstico,<sup>121,122,188</sup> especialmente cuando los linfocitos se encuentran en la fase de crecimiento vertical, en otros con similar metodología no se encontró que el infiltrado linfocitario fuese un factor independiente de supervivencia.<sup>131,191,193</sup>

La detección de TIL por sí misma puede no ser un marcador sensible de respuesta inmune. El estado de su activación ha demostrado ser igualmente importante. Existen pocos estudios donde la

actividad funcional o la expresión de marcadores de activación de las células TIL hayan sido tenidos en consideración. En el carcinoma de células renales la actividad proliferativa de las células T CD8+ intratumorales ha demostrado ser un factor pronóstico independiente. En carcinomas escamosos orales en pacientes con estadios III y IV se ha demostrado muy baja supervivencia.<sup>116</sup>

Entre los diferentes factores de activación, CD25 (IL 2 R $\alpha$ ) expresado en una porción relativamente pequeña de TIL de muchos tipos tumorales, se considera un antígeno de estimulación y al mismo tiempo posee significado funcional, jugando un papel crucial en la regulación de la proliferación de células T. Ha sido empleado para predecir o monitorizar los efectos en los protocolos de efectos de inmunoterapia de activación de células T en pacientes con melanoma, carcinoma de cabeza y cuello y carcinoma colorrectal.<sup>195,196,197</sup>

Otro marcador de activación de células T empleado con menos frecuencia pero extremadamente específico es OX40 (CD134). Se trata de una glicoproteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de los factores de necrosis tumoral y que se observa en los T CD4+ recientemente activados.<sup>198</sup>

Se ha demostrado que la intensidad del infiltrado linfocitario que expresan estas moléculas tiene un impacto significativo en la supervivencia de los pacientes. Pacientes con elevada densidad peritumoral de linfocitos CD25+ o CD134+ poseen superior supervivencia al compararlos con los que poseen menor número de este tipo de células. La importancia para CD25 es significativa solamente en pacientes con un grosor de melanoma mayor de 1mm.<sup>199</sup> Se observó mayor número de CD25+ y CD134+ en pacientes que no desarrollaron metástasis viscerales.<sup>199</sup>

Los pacientes que expresan alta densidad peritumoral de CD25+ y CD134+ poseen mejor pronóstico, mientras que en aquellos donde se expresan a nivel intratumoral no se altera el pronóstico. Esto puede deberse a que los linfocitos intratumorales sufren anergia tumoral. Los linfocitos CD25+ CD134+ podrían ser considerados linfocitos CD4 efectoras, que no necesitan contacto directo con las células tumorales.<sup>199</sup>

En humanos, CD25 y CD134 están sólo presentes en células T CD4+ auxiliares. No se ha observado expresión de estos marcadores en T CD8+ o en el resto de los CD4+ naïve o de memoria, o en ninguna otra célula de origen no hematopoyético.<sup>199</sup>

Se ha observado que el número de TIL en el tumor primario posee relación inversa con la probabilidad de metástasis ganglionares. Pacientes con elevado número de TIL en sus tumores primarios muestran un 3,9% de probabilidad de tener un ganglio centinela positivo, comparado con el 26,2% de los pacientes que no muestran TIL en su melanoma primario.<sup>128</sup> Los pacientes con metástasis ganglionares con marcada respuesta linfocitaria muestran mayor supervivencia a 30 meses (81,3%) que los que poseen escaso (46,8%) o nulo (29,3%) infiltrado linfocitario en sus metástasis ganglionares.<sup>124,201</sup> No obstante, otros estudios no han demostrado que la presencia de

TIL mejore la supervivencia de pacientes con melanoma.<sup>131,191,193</sup> Estas diferencias se explican en parte por las diferencias en poblaciones de pacientes investigadas, particularmente en pacientes con melanomas gruesos. El estudio de Clemente et al. mostró el impacto de los TIL en pacientes con melanoma con grosores comprendidos entre 1,7 y 6 mm. El significado pronóstico se perdía en pacientes con grosores mayores.<sup>122</sup> Sin embargo, Barnhill et al. no encontraron ninguna ventaja de supervivencia asociada con infiltrados marcados de TIL, aunque en el estudio se incluyeron tanto a pacientes en fase de crecimiento radial como a pacientes en fase de crecimiento vertical. Además sólo el 25,6% de los pacientes del estudio de Barnhill mostraban grosores mayores de 1,7 mm.<sup>193</sup>

Taylor et al. observaron que los TIL son un factor independiente de predicción de ganglio centinela positivo, siendo el factor predictivo independiente más importante de recurrencia y supervivencia en pacientes con melanoma maligno.<sup>205</sup>

Azimi et al.<sup>207</sup> afirman, en su estudio publicado en julio de 2012, que el grado de infiltrado linfocitario tumoral es un factor predictivo independiente del estado del ganglio centinela y de la supervivencia en pacientes con melanoma cutáneo primario, clínicamente localizado y con grosor mayor o igual a 0,75 mm. En su estudio se realiza una gradación del infiltrado linfocitario, considerándose la densidad de los TIL (leve, moderada o intensa) y su distribución en el componente dérmico del tumor (focal, multifocal o difuso en toda la extensión tumoral):

TIL grado 0	Ausencia de TIL
TIL grado 1	Infiltrado focal leve o moderado Infiltrado multifocal leve
TIL grado 2	Infiltrado focal intenso Infiltrado multifocal moderado o intenso Infiltrado difuso leve
TIL grado 3	Infiltrado difuso moderado o intenso

Según este estudio, los pacientes con TIL grado 3 poseen un excelente pronóstico, independientemente de otros factores pronósticos empleados actualmente.

La siguiente tabla resume los estudios más importantes sobre los TIL realizados hasta la fecha y los hallazgos más importantes:

Diferentes estudios realizados hasta la fecha:	Resultados	Conclusiones
Day et al.(1981 <sup>124</sup> )	Observaron la presencia y el número de TIL	A mayor número de TIL, mejor pronóstico
Clark et al.(1989 <sup>121</sup> )	Clasificaron los infiltrados de TIL en ausente, no abundante y	Poseían pronóstico en fase vertical, pero no en fase

	abundante	horizontal
Clemente et al.(1996 <sup>122</sup> )	Observaron el impacto de los TIL en melanomas con grosores comprendidos entre 1,7 y 6 mm	A mayor infiltrado linfocitario, mejor pronóstico. El significado pronóstico se perdía con grosores mayores a 6 mm
Taylor et al.(2007 <sup>205</sup> )	Observaron la relación entre número de TIL y positividad de ganglio centinela	Negatividad de ganglio centinela a mayor número de TIL. No se observó relación con supervivencia
Azimi et al.(2012 <sup>207</sup> )	Observaron la relación entre número de TIL y supervivencia y positividad de ganglio centinela	Pacientes con TIL grado 3 poseen mejor pronóstico.

El desarrollo de inmunoterapia para el cáncer puede incluir el establecimiento de una metodología capaz de acrecentar el reconocimiento de las características de las células tumorales (diferentes de las células normales) por parte del propio sistema inmune del paciente y acumular células efectoras de la activación inmune en el sitio propio del tumor.<sup>142</sup>

Estudios actuales muestran, particularmente en melanoma, el gran potencial de esta terapia, pese a los resultados desoladores obtenidos anteriormente debido a la pobre especificidad de los TIL y/o la elevada carga tumoral, dependiendo, entre otros, de parámetros como la especificidad del antígeno, la función o la persistencia de los TIL.<sup>208</sup>

La aparición de áreas de despigmentación tipo vitíligo durante el curso de un melanoma maligno ha sido considerado signo de buen pronóstico.<sup>209,210</sup> Existen evidencias que sugiere que la inducción de respuesta inmune limitada puede ser eficiente para eliminar tumores.<sup>211</sup> La despigmentación sucede en pacientes con melanoma maligno de manera espontánea o, con mayor frecuencia, en pacientes que han recibido terapia inmune.<sup>211</sup> Existe evidencia de series en las que se sugiere que la inmunodominancia de células T CD8+ responden directamente contra el epítipo MART-1 en casos de vitíligo y despigmentación asociada a melanoma.<sup>212,213</sup>

### **1.3- FOXP3 Y TREG:**

La capacidad de las células tumorales para evitar la vigilancia inmune representa, entre otros factores, un paso crítico en la progresión tumoral.<sup>214</sup> Sin embargo, una cuestión importante es aclarar por qué la respuesta del huésped falla para prevenir el desarrollo de la enfermedad. Existen múltiples mecanismos inmunosupresores en el microambiente que pueden restringir la intensidad y magnitud de las reacciones citotóxicas en el huésped. Entre ellas destaca una pequeña población de células T reguladoras (Tregs) que transcriben el factor FoxP3.<sup>215,216,217,218,219</sup> El melanoma cutáneo se encuentra dentro de este grupo de neoplasias que poseen el potencial para mitigar la respuesta antitumoral por inducción de células Tregs.<sup>220</sup>

Los Tregs constituyen entre el 5-10% del total de linfocitos T CD4+ en sangre periférica. Se trata de una subpoblación de células T CD4+, derivadas del timo, o bien generadas en la periferia en presencia de exposición a antígenos no inflamatorios y TGF- $\beta$ ,<sup>221,222</sup> que muestran elevados niveles de CD25+, para suprimir la reactividad de células T en periferia.<sup>324,325,326</sup> La inhibición de la maquinaria citotóxica de los linfocitos T CD8+ puede deberse a la inmunosupresión de citocinas liberadas por el tumor o bien a la presencia de células reguladoras T CD4+ CD25+, capaces de suprimir la respuesta inmune. La principal función de estos linfocitos Tregs es mantener la inmunotolerancia periférica, manteniendo bajo control las células T autorreactivas que pueden haber escapado del timo.<sup>226,227</sup> Se ha asociado la ausencia de células CD4+ CD25+ FoxP3+ con síndromes de autoinmunidad severa.<sup>216</sup> Característicamente, los Tregs son un tipo de linfocitos CD4+ que expresan CD25 y FoxP3, considerándose éste último el marcador más apropiado para definir a las células Tregs.<sup>226,227,229,230</sup>

Se ha sugerido la posibilidad de que células Tregs actúen en pacientes con cáncer, debido al aumento de Tregs demostrados en una variedad de cánceres humanos. El aumento de los niveles de Tregs se ha asociado con peor pronóstico en pacientes con diferentes estirpes tumorales y han sido considerados responsables de evitar la inducción de una inmunidad antitumoral efectiva.<sup>231,232,233,234,235,236,237</sup>

Se ha observado que el número de Tregs se encuentra claramente elevado en sangre periférica de pacientes con cáncer. Ello implica que las células neoplásicas escapan de las funciones de las células T efectoras, o bien las propias células T efectoras son incapaces de ser estimuladas por el antígeno o por su función, permaneciendo en un estado de anergia.<sup>160,238,239</sup> La evidencia de anergia para las células T locales (intratumorales) parece ser la teoría más convincente. Las células y el estroma tumorales desarrollan vías para, de forma directa o indirecta, causar anergia en las células T efectoras, demostrándose por la frecuencia con que han sido observadas células T CD4+ y CD25+ en tales circunstancias.<sup>237,241</sup> Las células Tregs interfieren en la protección inmune contra gran

variedad de tumores. El aumento o presencia de células Tregs en sangre o en ganglio centinela de pacientes con cáncer, la identificación de Tregs con especificidad para antígenos expresados por tumores humanos y la presencia y acumulación de Tregs en tumores son buena prueba de ello, implicando peor pronóstico y menor supervivencia.<sup>65</sup>

Se ha observado que en el melanoma cutáneo los pacientes con enfermedad metastásica poseen mayores cantidades de células Tregs comparadas con controles normales.<sup>243</sup> Sin embargo, las células CD25+ FoxP3+, que se encuentran presentes en todo el espectro de lesiones melanocíticas, son menores o casi indetectables en nevos melanocíticos.<sup>244</sup>

Aunque, en ratones, FOXP3 está únicamente asociado a regulación, en humanos se cree que está siempre asociada con la capacidad supresora de las células T. Por lo tanto, en humanos la caracterización de las células Tregs necesita de la combinación de anticuerpos anti CD25+ y anti FOXP3+<sup>245</sup>

Las células T reguladoras FoxP3+ inhiben a las células específicas CD8+ y limitan el efecto de la función de NK y NKT.<sup>259,260</sup> La importancia clínica de las células Tregs que suprimen inmunidad se ilustra por la corta supervivencia de pacientes con abundantes FoxP3+ intratumorales. Los pacientes con ricos infiltrados CD8+ deficientes en FoxP3+ poseen mejor supervivencia y comportamiento con la terapia oncológica.<sup>237</sup> Estos hallazgos dan paso a la posibilidad de estrategias terapéuticas para aumentar los linfocitos T citotóxicos antitumorales que inhiban Tregs FoxP3+ y potencien la inmunidad protectora.<sup>263,264</sup>

Se ha observado correlación entre aumento en la proporción de Tregs y el aumento del grosor de melanomas primarios.<sup>265</sup> Los tumores en estadios iniciales de progresión mostraron cantidades significativamente mayores de infiltrado por Tregs FoxP3+, comparadas con tumores de mayor grosor.<sup>265,266</sup> El crecimiento en fase vertical del melanoma primario cutáneo se asocia significativamente a un mayor número de TIL FoxP3+ que comparativamente en los melanomas en fase radial.<sup>266</sup> Estudios recientes han demostrado que el acúmulo de Tregs CD4+ en el sitio del tumor implica que esas células inducen antígenos específicos e inmunotolerancia local.<sup>265</sup> Al eliminar los Tregs se puede estimular una fuerte inmunidad antitumoral.<sup>267</sup> Este fenómeno también puede ser debido a que al eliminar los Tregs, las células NK recobran su función citotóxica<sup>268</sup>

FoxP3 es el gen regulador maestro del desarrollo y regulación de los Tregs en el timo y en periferia. En ratones, FoxP3 solamente se asocia a células CD4+ CD25+. Por el contrario, en humanos también se asocia a células dendríticas, a células CD4+ CD25- activadas y a células CD8+ activadas. En humanos la proteína maestra de activación puede ser simplemente una proteína de activación más dentro de un conjunto de proteínas activadoras.<sup>269</sup> Por ejemplo, se observa un aumento en la acumulación de células CD4+ CD25+ en el carcinoma ductal infiltrante mamario en relación con la edad (mayores de 50 años). Asimismo, la actividad de los linfocitos CD4+ CD25+

declina con la edad.<sup>269</sup>

Existe un gran número de trabajos que muestran que varios tipos de inmunoterapia contra el cáncer en algunas ocasiones fueron eficaces en el rechazo del cáncer en modelos animales. No obstante, es inadecuado esperar el mismo grado de efectividad en humanos. Una de las razones de esto es la gran diferencia que existe de inmunogenicidad entre modelos experimentales animales y humanos. A la hora de considerar aplicaciones clínicas es, por lo tanto, muy importante investigar los efectos de la inmunoterapia antitumoral, usando en modelos animales células pobremente inmunogénicas.  
270

Aunque, en humanos, FoxP3 se expresa predominantemente en células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, existen pequeñas subpoblaciones FoxP3<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> y FoxP3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> que no han sido incluidas en la mayoría de los estudios previos efectuados.<sup>271,272</sup>

Hasta hace poco tiempo se creía que la expresión de FoxP3 estaba restringida al linaje de las células T. Actualmente se conoce que también se expresa en los linfocitos B y en las células tumorales del melanoma, así como en células B infectadas por virus y células de diferentes tumores sólidos.<sup>273</sup>

Aunque CD25 está fuertemente expresado de manera constitutiva en los Tregs, la posibilidad de identificación de CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> ha sido descartada por algunos autores puesto que las células T recientemente activadas también expresan CD25. No obstante, gran cantidad de estudios han empleado estos parámetros para la identificación de Tregs.<sup>274</sup>

La designación de Treg se otorga idealmente a la fracción de T CD4<sup>+</sup> que poseen actividad supresora sobre la activación y proliferación de otros linfocitos, aunque la actividad supresora en sí misma no pueda ser directamente medida en cada Treg por métodos convencionales. De este modo, para efectos prácticos, FoxP3 ha sido extensamente empleado en numerosos estudios para identificar Tregs, ya que los Tregs expresan mayor cantidad de este factor de transcripción que otras células T.

Basada en la expresión de FoxP3, se ha documentado aumento de Tregs en varios tipos de cáncer, incluyendo el melanoma cutáneo avanzado.<sup>275</sup> No obstante, gran cantidad de estudios recientes sugieren que FoxP3 está también expresado en células T activadas y no reguladoras de humanos, y que FoxP3 puede no sólo ser un marcador absoluto de Tregs inmunosupresores, lo que cuestiona la interpretación de estudios previos.<sup>276,277,278</sup>

Una posible solución a este problema es analizar las subpoblaciones de FoxP3. Miyara et al recientemente han propuesto una clasificación para las células T FoxP3<sup>+</sup>, atendiendo a 3 grupos funcional y fenotípicamente distintos, basados en la expresión de FoxP3, CD45RO y CD45RA.<sup>279</sup>

Las células CD45RO<sup>+</sup> FoxP3<sup>Low</sup> no son células supresoras y producen grandes cantidades de citocinas y, por tanto, se consideran células T activadas no reguladoras. Este tipo de células son abundantes en pacientes con enfermedades autoinmunes como el lupus.<sup>279</sup>

Las células CD45RO+ FoxP3<sup>High</sup> poseen los hallazgos arquetipo de los Tregs, mostrando una potente actividad supresora, mientras que la producción de citocinas es baja.<sup>279,280</sup>

Las células CD45naïve CD45- FoxP3<sup>Low</sup> son células T con hallazgos casi completos de células Tregs, siendo la mayoría de ellas derivadas del timo. Este tipo de células producen niveles bajos de citocinas.<sup>279,281</sup>

Todos los tipos de células T FoxP3+ están aumentadas en sangre en pacientes con melanoma, tanto las células reguladoras como las no reguladoras.<sup>283</sup>

Las células CD45- FoxP3<sup>Low</sup> naïve reguladoras aumentan en sangre periférica con la progresión del tumor.<sup>283</sup>

El aumento de CD45RO+ FoxP3<sup>Low</sup> no reguladoras se restablece a niveles normales tras la resección tumoral. Asumiendo que la carga tumoral aumenta las células FoxP3+, tras la resección quirúrgica del tumor debería esperarse que se redujese el número de estas células. La frecuencia de CD45RO+ FoxP3<sup>Low</sup> no reguladoras disminuye después de la resección tumoral y sus valores son comparables a los de los controles sanos. Por otro lado, la frecuencia de las células T CD45RO- FoxP3<sup>Low</sup> naïve reguladoras y las CD45+ FoxP3<sup>High</sup> efectoras Tregs no se altera de modo significativo.<sup>283</sup>

Las células CD45RO+ FoxP3<sup>High</sup> reguladoras se acumulan en el microambiente tumoral.<sup>283</sup>

Estudios previos han sugerido que los Tregs estaban aumentados en diferentes tipos de tumores malignos, incluyendo el melanoma cutáneo, basándose en el estudio de los marcadores CD25 y/o FoxP3. No obstante estudios más recientes han demostrado no sólo el efecto inmunosupresor de las células CD45RO+ FoxP3<sup>High</sup> efectoras Tregs sino también el de otras 2 poblaciones: CD45RO+ FoxP3<sup>Low</sup> no reguladoras y las células FoxP3 naïve disreguladoras.<sup>284,285,286,287</sup>

Estos datos sugieren que la variación de FoxP3+ en pacientes con melanoma no supone un simple aumento de Tregs. Mas bien parece un sistema complejo de disregulaciones de los procesos homeostáticos y procesos funcionales que suceden en estos subgrupos de células T. Se observan correlaciones positivas entre el aumento de las células FoxP3+ y la progresión tumoral. El significado de estos cambios todavía no está clarificado.<sup>283</sup>

CD45RO+ FoxP3<sup>Low</sup> estaban aumentadas en pacientes con melanoma y disminuyeron significativamente y se normalizaron tras la resección tumoral. Si tenemos en cuenta que estas células no son supresoras y producen citocinas y que cualquier célula T CD4+ naïve puede expresar transitoriamente FoxP3 por simple estimulación antigénica, el aumento de estas células parece responder a estimulación antigénica del tumor.<sup>279</sup> Considerando el elevado porcentaje de estas células no reguladoras que disminuyeron y se normalizaron incluso en pacientes con estadios iniciales de melanoma, un número relativamente pequeño de células de melanoma pueden tener un impacto significativo en todo el sistema inmune. Las células periféricas CD45RO- FoxP3<sup>Low</sup> son supresoras y producen poca cantidad de citocinas. El porcentaje de estas células en sangre periférica

en pacientes con melanoma se correlaciona positivamente con la progresión tumoral. El aumento de estas células en pacientes con melanoma se asocia a mayor número de células productoras de INF- $\gamma$ ,<sup>283</sup> lo que aumenta la posibilidad de que exista un mayor número de células T con activación anómala. Una posibilidad alternativa es que la disregulación inmunológica del microambiente pueda alterar el gen de regulación de estas células, lo que hace que, en estas poblaciones celulares, la actividad de FoxP3 se encuentre atenuada. Hasta donde se ha investigado no se observa ninguna otra anomalía sugestiva de defectos funcionales en estas células como Tregs: la supresión en la producción de citocinas, incluyendo IL2, IL7 y TNF $\alpha$  y la expresión de marcadores asociados con FoxP3, incluyendo CD25, fueron equivalentes a los de los controles sanos. Estas disregulaciones predisponen a estas células a producir INF- $\gamma$ . No es posible concluir, por el momento, que estas células sean funcionalmente poco efectivas, pero se sugiere que el aumento del porcentaje de estas células reprime la inmunidad tumoral, aunque en vez de reflejar disregulación inmunológica del ambiente, puede agravarse con la progresión del melanoma.<sup>283</sup>

Las células CD45RO+ FoxP3<sup>High</sup> son fuertemente supresoras y pobres en la producción de citocinas y se cree que son células efectoras Treg. El porcentaje de estas células se encuentra aumentado en sangre periférica en pacientes con melanoma. Además los Tregs muestran un marcado aumento en los TIL comparado con las mismas en sangre periférica de los mismos pacientes. Si tenemos en consideración que los TCD45+ FoxP3<sup>Low</sup> no reguladores están aumentados en sangre periférica pero no en los TIL, se sugiere que el microambiente inmunológico del melanoma está regulado y, por ello, se produce la inmunosupresión local.<sup>283</sup>

#### **1.4- CCL27:**

Se ha sugerido que la expresión de quimiocinas y receptores de quimiocinas por las células del melanoma puede estar involucrada en la evasión del tumor a la respuesta inmune.<sup>288</sup> Las quimiocinas son una gran familia de pequeñas moléculas de polipéptidos que regulan la migración celular y su invasión en los tejidos, interactuando con sus receptores específicos.<sup>289</sup> Son una familia de citocinas quimiotácticas de bajo peso molecular (8-17Kd) que provocan respuestas de migración celular dirigida, y que son a su vez inducidas por citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y estímulos patógenos. La unión de estas quimiocinas a sus receptores en la superficie celular conlleva una serie compleja de respuestas celulares, como la activación de varias vías de señalización celular y reorganización del citoesqueleto, que favorecen la formación de pseudópodos y permiten el movimiento celular.<sup>290,191</sup>

Aunque las quimiocinas clásicamente se han considerado como mediadores proinflamatorios, también poseen otras funciones en el desarrollo de los tejidos normales, la angiogénesis y el control y proliferación de células germinales y progenitores celulares. También están involucradas en la transformación celular neoplásica, el crecimiento, invasión y metástasis a distancia y en la respuesta antitumoral del huésped. Se ha propuesto que la migración de células tumorales a órganos específicos puede estar determinada por los receptores celulares de quimiocinas y por las quimiocinas expresadas en los órganos diana.<sup>288,292,293,294,295</sup> La comprensión de los mecanismos moleculares que permiten la progresión tumoral en el melanoma es un paso esencial que puede permitir, en última instancia, no sólo predecir, sino intervenir de forma terapéutica para evitar dicho proceso.<sup>296</sup>

Hasta la fecha, varios estudios de terapia antitumoral se han focalizado en la inmunoestimulación de las citocinas, moléculas accesorias o de unión. Desafortunadamente, muchas de estas aproximaciones han mostrado una respuesta antitumoral limitada. Debido a que las células cancerosas son, en sí mismas, células que han eludido los mecanismos normales de regulación homeostática, así como las características específicas del tejido, es conocido que la infiltración de gran cantidad de células efectoras dentro del tumor es difícil.<sup>297,298,299,300</sup> Los intentos para conseguir alcanzar una activación de células inmunes sugieren obstáculos presentes en el sitio del tumor y puede ser iniciada proveyendo de citocinas pro-inflamatorias en la zona del tumor. Existe alguna evidencia que indica que la presencia de linfocitos infiltrando el tumor son un signo favorable.<sup>112</sup> Para poseer una acción favorable debe existir gran número de TIL, como células T y NK. Las quimiocinas muestran actividad quimiotáctica para varios tipos de células inmunes, así como para algunos tipos de células tumorales, que muestran unos niveles de expresión de quimiocinas menores que las células normales. Por todo ello, las quimiocinas actúan como importantes adyuvantes en el

reclutamiento de tipos de leucocitos en el sitio del tumor, potenciando la efectividad de la inmunidad antitumoral.<sup>303</sup> Las células metastásicas migran a sitios específicos atraídas por quimiocinas, lo que explica que ciertos cánceres produzcan metástasis en ciertos órganos predilectos.<sup>304</sup>

Las investigaciones de la relación entre pronóstico y la densidad de infiltración de las células inmunes asociadas a tumor en pacientes con cáncer han indicado que la recurrencia post-tratamiento o metástasis está significativamente suprimida en casos que exhiben elevada infiltración por células inmunes en el tejido del tumor primario y es mayoritariamente aceptado que las células T representan el tipo más potente de células efectoras antitumorales. Por lo tanto, el establecimiento de inmunoterapia capaz de promover la interacción entre células tumorales y células inmunológicas se considera crítica para mejorar la tasa de cura del cáncer. Basándose en estos resultados, una opción que trate de reforzar la acumulación de células inmunes en el tejido tumoral mediante el uso de quimiocinas, mediante el control de migración y de infiltración de células inmunes en el sitio local del cáncer, es muy atractiva para el desarrollo de una inmunoterapia eficaz del cáncer.<sup>112,113,306</sup>

El importante papel de las células T en el rechazo tumoral y su actividad citolítica contra las células tumorales ha sido conocida durante décadas.<sup>121,166</sup> Aunque las células transformadas expresan frecuentemente antígenos reconocibles para el sistema inmune del huésped, los tumores establecen comúnmente un sistema de escape al reconocimiento inmune.<sup>310</sup>

Recientemente se ha observado que la quimiocina asociada a la piel, CCL27, se expresa en queratinocitos epidérmicos y media el reclutamiento de las células T memoria.<sup>311,312,313,314</sup> Se ha propuesto la participación en procesos metastásicos del receptor CCR10, cuyo ligando, CCL27, se expresa predominantemente en las células basales de la epidermis.<sup>288</sup>

Aunque juegan un papel importante, la relevancia de las quimiocinas en la inmunidad antitumoral es limitada.<sup>316</sup> Se demuestra que los tumores cutáneos humanos evaden la respuesta antitumoral inmune mediada por células T regulando a la baja la expresión de la quimiocina CCL27, a través de la activación de EGFR y Ras.<sup>316</sup> Se produce la pérdida de CCL27 durante la carcinogénesis cutánea.<sup>316</sup> El análisis inmunohistoquímico de pieles sanas y muestras obtenidas de queratosis actínicas mostró que CCL27 está abundantemente expresada en la piel normal, pero disminuye marcadamente en pieles con queratosis actínica y se produce una pérdida progresiva de CCL27 durante el proceso de carcinogénesis cutánea.<sup>316</sup>

Las células del melanoma expresan elevados niveles de CCR10, que es el receptor específico de la quimiocina CCL27. Es posible pensar que CCL27 en melanomas puede inducir inmunidad antitumoral y que CCL27 puede suprimir el crecimiento del tumor induciendo el reclutamiento de células T y NK.<sup>317</sup>

Se ha demostrado recientemente que la sobreexpresión de CCL27 en células de melanoma, reduce

el crecimiento del tumor, debido al reclutamiento y la acumulación de células T o NK, resultando realizada la respuesta inmune.<sup>318</sup>

En nevos melanocíticos, la expresión de CCL27 es negativa o se expresa débilmente. La capacidad de internalizar la quimiocina CCL27 puede ser una característica de la célula melanocítica maligna, ya que se ha observado dicha expresión en melanomas malignos y no en lesiones melanocíticas benignas. Algunos estudios han mostrado que los casos de positividad para CCL27 tienden a tener menos densidad de células CD3+ CD8+ comparados con los casos que no expresan CCL27, sugiriendo que CCL27 puede hacer a las células del melanoma menos susceptibles a la respuesta antitumoral del huésped, implicando que, contrariamente a lo observado en otros estudios, la coexpresión de CCR10 y CCL27 por células neoplásicas pueda ir ligada a peor pronóstico en pacientes con melanoma.<sup>312,320</sup>

Las interacciones quimiocina-receptor en unos casos potencian y en otros dificultan la respuesta inmune. Así, la expresión de CCL27 es un importante inductor de la respuesta inmune en neoplasias de células escamosas, y su inhibición contribuye a la evasión de la respuesta inmune que favorece la evasión tumoral. De hecho, la expresión de CCL27 es más baja en metástasis de melanoma en comparación con melanomas cutáneos primarios. Sin embargo, la sobreexpresión de CCR10, el receptor de CCL27 por células de melanoma B16, probablemente estimulada por los altos niveles de CCL27 de origen epidérmico, parece aumentar la resistencia de estas células a la respuesta inmune antitumoral, y protege de la apoptosis mediada por Fas.<sup>321,322</sup>

Un estudio reciente de Monteagudo et al.<sup>323</sup> establece valor pronóstico de la ratio CCL27/CCR10 intratumoral, en relación con el riesgo de metástasis a distancia. Los resultados se resumen en las siguientes tablas:

Para Breslow menor o igual a 4 mm:

Ratio CCL27/CCR10	Punto de corte	Riesgo de metástasis
Breslow – (0,0085 x CCL27/CCR10)	<0,0553	Bajo riesgo
Breslow – (0,0085 x CCL27/CCR10)	>0,0553	Alto riesgo

Para cualquier grosor de Breslow:

Ratio CCL27/CCR10	Punto de corte	Riesgo de metástasis
Breslow – (0,0226 x CCL27/CCR10) – (0,04237 x CXCL12/CXCR4)	< -0,12	Bajo riesgo
Breslow – (0,0226 x CCL27/CCR10) – (0,04237 x CXCL12/CXCR4)	> -0,12	Alto riesgo

En este estudio se observa que la ratio CCL27-CCR10 en tumores primarios se encuentra inversamente asociada con el desarrollo de metástasis a distancia.



## **2- METODOLOGÍA:**



## **2.1- OBJETIVOS:**

Múltiples factores pronósticos han sido estudiados para predecir el comportamiento y evolución del melanoma cutáneo. En la actualidad se considera que el espesor en milímetros (Breslow), la presencia de ulceración y la presencia de mitosis son los parámetros más útiles para el estadiaje. No obstante, existen casos cuyo comportamiento no se justifica en función de estos parámetros. Por ello, para intentar predecir de forma más efectiva el comportamiento clínico del melanoma se han analizado múltiples variables y, entre ellas, el infiltrado linfocitario. El melanoma es un tumor con marcada inmunogenicidad y la presencia de linfocitos peritumorales y/o intratumorales es frecuente.

### **2.1.1- Objetivo general:**

En el presente trabajo nos proponemos el estudio cuantitativo y cualitativo de los diferentes subtipos de los linfocitos asociados a tumor (TIL) y células NK, así como de la quimiocina inmunomoduladora CCL27, en una serie retrospectiva de melanomas cutáneos con un seguimiento clínico prolongado. Dicho estudio será realizado empleando técnicas inmunohistoquímicas convencionales y, por lo tanto, reproducibles en laboratorios estándar de anatomía patológica y dermatología.

### **2.1.2- Objetivos específicos:**

1. Cuantificar los TIL peritumorales e intratumorales en melanomas primarios cutáneos.
2. Tipificar las diferentes subpoblaciones de los TIL mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas.
3. Estudiar el estado de activación de los TIL.
4. Identificar y cuantificar las células T reguladoras (Tregs) presentes en los TIL.
5. Evaluar la expresión de la quimiocina CCL27 en la epidermis, en las células tumorales de melanoma y en los TIL.
6. Estudiar la posible correlación de todos los parámetros anteriormente mencionados con la evolución clínica de los pacientes.

## **2.2- MATERIAL:**

Nuestro estudio incluyó inicialmente 115 muestras de melanoma cutáneo, correspondientes al mismo número de pacientes, registradas en la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia entre los años 1992 y 2002. Dichas muestras tisulares habían sido fijadas en formol neutro al 10% e incluidas en parafina, y sobre ellas se había realizado el estudio rutinario para diagnóstico histopatológico.

### **2.2.1- Criterios de exclusión:**

Fueron excluidos los casos en los que el tejido tumoral fue insuficiente para completar la totalidad del estudio inmunohistoquímico así como aquellos de los que no se disponía de un seguimiento clínico evolutivo prolongado (mínimo de 10 años).

## **2.3- MÉTODOS:**

Se efectuó una revisión histológica de cada caso con la finalidad de confirmar los diagnósticos originales. Posteriormente se valoraron una serie de parámetros histológicos y se revisaron los parámetros clínicos recogidos de las historias clínicas. Asimismo se efectuó el estudio inmunohistoquímico por técnica convencional mediante 9 anticuerpos comerciales frente a: CD20, CD3, CD4, CD8, CD25, CD134, CD56, FoxP3 y CCL27, que se realizó en todos los casos sobre secciones tumorales incluidas en parafina.

### **2.3.1- Estudio clínico:**

Los datos clínicos generales y de seguimiento se obtuvieron a partir de las historias clínicas del archivo del Hospital Clínico Universitario de Valencia y de 2 hospitales periféricos cuyos casos habían sido remitidos para consulta al Hospital Clínico Universitario de Valencia (Hospital de Sagunto y Hospital de Requena). El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo empleando el programa informático SPSS versión 19.

Los parámetros clínicos evaluados son los siguientes:

1. **Sexo:** 1- Mujer; 2- Hombre.
2. **Edad:** En años en el momento del diagnóstico.
3. **Localización de la lesión:** 1- Cabeza y cuello; 2- Tronco (área anterior); 3- Tronco (área posterior); 4- Miembros superiores; 5- Miembros inferiores.
4. **Existencia de progresión de la enfermedad:** 0- No; 1-Si.
5. **Tiempo** expresado en meses hasta el diagnóstico de la **progresión de la enfermedad.**

6. **Existencia de recidiva local:** 0- No; 1- Si.
7. **Tiempo** expresado en meses hasta el diagnóstico de **recidiva local**.
8. **Existencia de metástasis en tránsito:** 0- No; 1- Si.
9. **Tiempo** expresado en meses hasta el diagnóstico de la **metástasis en tránsito**.
10. **Existencia de metástasis ganglionar:** 0- No; 1- Si.
11. **Tiempo** expresado en meses hasta el diagnóstico de **metástasis ganglionar**.
12. **Existencia de metástasis a distancia:** 0- No; 1- Si.
13. **Tiempo** expresado en meses hasta el diagnóstico de **metástasis a distancia**.
14. **Supervivencia a melanoma cutáneo:** 0-No; 1- Si.
15. **Tiempo de supervivencia** expresado en meses desde el diagnóstico de la lesión primitiva.

### 2.3.2- Estudio histológico:

El análisis histológico se realizó sobre muestras de tejido fijadas en formaldehído tamponado al 10%, que fueron procesadas en alcoholes a concentraciones crecientes (deshidratación) y en xiloles, para, a continuación, ser incluidas en parafina. Se realizaron secciones de 3 micrómetros y se montaron en portaobjetos con Poly-L-Lysina para estudio microscópico mediante tinción con hematoxilina-eosina.

#### Tinción de hematoxilina-eosina:

1. Incubamos las muestras a 60°C aproximadamente 20 minutos antes de desparafinar.
2. Desparafinamos las muestras en xilol 5 minutos.
3. Realizamos pases por etanol (90°/80°/70°) para hidratar, de 2 a 5 veces cada uno.
4. Hidratamos las muestras.
5. Realizamos la tinción nuclear con hematoxilina de Harris, 5 minutos. Enjuagamos con agua destilada 2 minutos (en forma de zambullidas).
6. Para decolorar, sumergimos las muestras en ácido clorhídrico al 0,5% (un pase rápido). Lavamos con agua corriente y luego con hidróxido de amonio. Nuevamente realizamos un lavado rápido con agua corriente.
7. Para la tinción citoplasmática, sumergimos las muestras en eosina durante 4 minutos. Lavamos con agua corriente (inmersiones rápidas).
8. Deshidratamos con pases de etanol (70°/80°/90°), aproximadamente de 30 segundos. Finalmente aclaramos con xilol, 1 minuto.
9. Montamos con Entellan<sup>R</sup> y cubreobjetos.

En cada caso se procedió al estudio histológico de las secciones previas disponibles (1-5 laminillas),

y realización de una nueva tinción con hematoxilina eosina, sin conocimiento de los datos clínicos por un primer patólogo (M.M.R.) y posteriormente se efectuó revisión conjunta por este mismo patólogo y por un patólogo experimentado en dermatopatología (C.M.C.).

Se valoraron los siguientes parámetros:

1. **Tipo histológico de melanoma:** 1- melanoma de extensión superficial; 2- melanoma tipo/sobre léntigo maligno; 3- melanoma nodular; 4- melanoma lentiginoso acro; 5- otros.
2. **Fase de crecimiento radial:** 0- no; 1- si.
3. **Fase de crecimiento vertical:** 0- no; 1- si.
4. **Espesor en mm (Breslow):** Medida en mm.
5. **Nivel de Clark:** 1- I; 2-II; 3- III; 4- IV; 5- V.
6. **Presencia de ulceración:** 0- No; 1- Si.
7. **Diámetro de la ulceración:** Medida en mm.
8. **Número de mitosis por mm<sup>2</sup>.**
9. **Existencia de regresión:** 0- no; 1- si <50%; 2- si >50%.
10. **Presencia de infiltrado linfocitario peritumoral:** 0- Ausente o mínimo; 1- Discontinuo; 2- Denso.
11. **Presencia de infiltrado linfocitario intratumoral:** 0- Ausente; 1- Débil; 2- Moderado; 3- Intenso; 4- Muy intenso (cuando dificultaba notablemente la observación de las células tumorales).
12. **Presencia de satelitis:** 0- No; 1- Si.
13. **Presencia de lesión melanocítica asociada:** 0- No; 1- Nevus melanocítico común; 2- Nevus atípico.
14. **Tipo celular predominante en la lesión primaria:** 1- Epitelioide; 2- Fusocelular y desmoplásico.
15. **Presencia de elastosis actínica:** 0- No; 1- Si.

### **2.3.3- Estudio inmunohistoquímico:**

Las técnicas inmunohistoquímicas son técnicas de inmunolocalización de antígenos (Ag) tisulares o celulares mediante su unión con anticuerpos (Ac) específicos, que habitualmente emplean el revelado de una enzima como marcaje. Por este motivo, la reacción Ag-Ac se visualiza añadiendo al final de la reacción el sustrato de la enzima más una sustancia cromógena, que da lugar a un precipitado insoluble y coloreado. La enzima peroxidasa es el trazador más comúnmente empleado en inmunohistoquímica con Ac marcados directa o indirectamente.

Cuando se trata de la técnica con Ac marcados indirectamente, el Ac secundario se une al primario, que a su vez ya se ha unido al antígeno específico en estudio. La técnica ABC o complejo avidina-

biotina-peroxidasa introduce una forma hipersensible para amplificar la reacción, sobretodo cuando los antígenos se encuentran en tejidos de parafina.

Técnica de inmunotinción:

Se seleccionaron en primer lugar las secciones tumorales más representativas que incluyesen mayor número de linfocitos asociados a tumor, tanto peritumoral como intratumoral. Se realizaron secciones de 3 micrómetros en los bloques seleccionados. La técnica empleada fue la técnica de avidina-biotina-inmunoperoxidasa (ABC), aunque con las siguientes modificaciones:

1. Desparafinación: Se calentaron las preparaciones, 24 horas en estufa de 37°C y 45 minutos en estufa de 60°C inmediatamente antes del procedimiento. Posteriormente se incluyeron dichas secciones en xilol durante 15 minutos (3 pases de 5 minutos).
2. Hidratación con alcoholes en concentraciones decrecientes (90%- 80%- 70%) (5 minutos cada pase). Lavados en agua corriente y destilada.
3. Pretratamiento de recuperación antigénica por calor: Se utilizó una solución tampón específica (tampón citrato 0.01mM pH 6.0) diluida 1/10 en agua destilada o en una solución tampón de Tris-EDTA 2mM pH 9.0 posteriormente diluido en agua destilada. Se introdujeron las secciones en esta solución y después en un autoclave (“microclave Selecta”-olla a presión) hasta una presión de 1.5 atmósferas durante 3 minutos. Posteriormente se llevó a cabo la descompresión y el enfriamiento lento de los preparados. Una vez enfriados en un baño de agua corriente, las secciones se lavaron de nuevo con agua destilada.
4. Inhibición de la peroxidasa endógena con 97 volúmenes de metanol al 2% por 3 volúmenes de agua oxigenada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez enfriados en un baño con agua corriente, las secciones se lavaron de nuevo con agua destilada.
5. Se eliminó el exceso de agua de los cristales y se cerclaron las preparaciones con “Sigmacote<sup>R</sup>” (Sigma Co) rodeando el corte para evitar así la expansión del AC.
6. Bloqueo de la colágena tisular para evitar la unión de las inmunoglobulinas al estroma. Para ello se utilizaron 2 volúmenes de suero de caballo por cada 8 de suero fisiológico en una solución final al 20% y se dejó durante 20 minutos.
7. Se voltearon los preparados y, sin lavarlos, se añadió el Ac primario, el cual se incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente.
8. Se lavaron 3 veces las preparaciones con tampón fosfato (PBS) y se incubó seguidamente con el anticuerpo secundario durante 30 minutos. Se empleó el sistema LSAB-2 de DAKO, cuya solución 1 está constituida por una mezcla de Ac monoclonales anti-mouse y policlonales anti-rabbit biotinilados.
9. Se lavaron las preparaciones 3 veces con PBS y se añadió el complejo avidina-biotina (solución 2 del sistema LSAB-2 de DAKO) durante 30 minutos (este complejo se preparó con 30

minutos de antelación).

10. Se volvieron a lavar las preparaciones 3 veces con PBS y se procedió a continuación al revelado de la reacción mediante una solución de diaminobenzidina tetrahidroclorhídrica (DAB) en un tampón de trisclorhídrico 0.2 M hasta un pH=7. Una vez ajustado el pH se añadió la DAB y por último el agua oxigenada pura de 110 volúmenes (para 100 ml de Tris se utilizan 75 mg de DAB y 50 microlitros de agua oxigenada). Durante el revelado, las preparaciones se protegieron de la luz, metiéndolas en la estufa de 37°C durante 5 minutos y al finalizar el revelado se lavó con agua corriente.

11. Se contrastaron las muestras con Giemsa, se deshidrataron los cortes con alcoholes a concentraciones crecientes (70%-80%-90%) y finalmente se realizaron varios pases en xilol y se montaron los cubreobjetos con Entellan<sup>R</sup>.

En el caso de los anticuerpos en los que se empleó el kit de Dako EnVision, HRP (DAKO Cytomation, Dinamarca), se siguieron las especificaciones de la casa comercial, resumidas a continuación: En primer lugar se aplicó el reactivo bloqueante de la peroxidasa endógena para EnVision, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez llevada a cabo la reacción APO-D/anti-APO-D-36C6, en el tiempo de 1 hora, lavamos con PBS 3 veces. Seguidamente incubamos durante 30 minutos con el Ac secundario (EnVision) y lavamos de nuevo. Finalmente colocamos la solución sustrato-DAB cromógeno (EnVision) durante 10 minutos, lavamos con agua destilada y continuamos con el resto del proceso.

La relación de los anticuerpos empleados en este estudio es la siguiente:

CD20: (DAKO) Anti-human CD20cy Clon L26 Mouse monoclonal. 1/100. Recuperación antigénica: Citrato. Autoclave. Sistema de visualización: LSAB (DAKO K0690).

CD3: (DAKO) Anti-human CD3 Rabbit policlonal. 1/100. Recuperación antigénica: Citrato. Autoclave. Sistema de visualización: LSAB (DAKO K0690). DAB DAKO K3468.

CD4: (NOVOCASTRA) Mouse monoclonal Clon 1F6. 1/10. Recuperación antigénica: TRIS-EDTA. Autoclave. Sistema de visualización: ENVISION (DAKO K5007).

CD8: (NOVOCASTRA) Clon 1A5 mouse monoclonal 1/20. Recuperación antigénica: EDTA pH8. Baño 40 minutos. Sistema de visualización: LSAB DAKO K5001.

CD25: (NOVOCASTRA) Anti-human monoclonal clon 4c9 1/200 Recuperación antigénica: Citrato autoclave. Sistema de visualización: LSAB (DAKO K0690).

CD134 (OX40): (BDPHARMINGEN) Anti-human mouse monoclonal. 1/40. Recuperación antigénica: Citrato. Autoclave. Sistema de visualización: ENVISION (DAKO K5007).

FoxP3: (ABCAM, Ab 20034) Mouse monoclonal Clon 236A/E7. 1/100. Recuperación antigénica: TRIS-EDTA. Baño 40 minutos. Sistema de visualización: LSAB (DAKO K0690).

CCL27: (RD SYSTEMS) (MAB 376) Mouse monoclonal. Clon 124308 1/20. Sin

recuperación antigénica. Sistema de visualización: LSAB DAKO. DAB DAKO K3468.

CD56: (NOVOCASTRA): Mouse monoclonal. Clon CD5641/50. Recuperación antigénica: EDTA. Autoclave. Sistema de visualización: ENVISION (DAKO K5007).

#### **2.3.4- Evaluación de la respuesta inmune:**

Todos los recuentos fueron realizados por separado por dos patólogos (M.M.R. Y C.M.C.), tras acordar los criterios de evaluación, con la posterior revisión conjunta por ambos de todos los casos.

Evaluación de la inmunotinción para CD3, CD4, CD8, CD134, CD25 y CD56: Se efectuó el recuento de los linfocitos positivos para dichos ACs sobre un campo de 1mm<sup>2</sup>. Dicho conteo se efectuó sobre el área con un mayor número de linfocitos tras revisar todas las secciones de la misma lesión.

Evaluación del anticuerpo CD20: Para dicho AC se obtuvo un porcentaje global de linfocitos CD20+ sobre el total de los linfocitos mostrados en la laminilla y se hizo el recuento de células positivas para CD20 en el área de 1mm<sup>2</sup> con mayor contenido de CD20+.

Para el anticuerpo FoxP3 se efectuó el recuento de linfocitos (ya previamente descrito para los linfocitos con marcadores T) y se evaluó la inmunotinción de las células tumorales.

La evaluación para el anticuerpo CCL27 se efectuó valorando el porcentaje de inmunotinción en los linfocitos, el porcentaje de inmunoreactividad en las células tumorales y el porcentaje e intensidad observado en las células de la epidermis (que se subdividió en 3 áreas: supratumoral, peritumoral y periférica), y estableciendo tres grados de intensidad (1, 2 y 3), multiplicando la intensidad por el porcentaje.

#### **2.3.5- Análisis estadístico:**

Los datos se han analizado empleando el sistema de análisis SPSS versión 19.

Estadística descriptiva:

Se emplea para estudiar los diferentes aspectos o caracteres referidos a un conjunto de elementos de naturaleza específica, y que reciben la denominación de variables.

El primer paso para el estudio estadístico fue el análisis, en forma descriptiva, de las variables continuas (numéricas), determinándose la media, mediana, desviación estándar y rango de cada una de ellas.

Estadística de inferencia:

Permite extrapolar los resultados a la población que se está estudiando. Comprende las denominadas “pruebas paramétricas”, en las que la población estudiada sigue una distribución

normal, y las pruebas “no paramétricas”, que no son aplicables cuando la población que se desea analizar es demasiado pequeña, o la información disponible es insuficiente para comprobar la hipótesis de trabajo. Estas últimas pruebas permiten extrapolar los resultados de la muestra a la población total que es objeto del análisis.

Prueba U de Mann-Whitney (MW) para dos muestras independientes: se ha empleado para contrastar la homogeneidad de la distribución de una variable, cuando menos ordinal, en dos muestras independientes. Esta prueba contrasta la hipótesis nula de que las muestras proceden de dos subpoblaciones en las que la probabilidad de obtener en la primera un resultado de X menor que en la segunda es igual a la probabilidad de obtener un resultado mayor ( $H_0: P_{X_1} < P_{X_2} = P_{X_1} > P_{X_2}$ ). Si la probabilidad asociada al estadístico de contraste es menor que el nivel de significatividad, se rechaza la hipótesis nula a dicho nivel de significatividad.

Regresión de Cox: Se emplea para poder determinar no sólo la relación entre la tasa de supervivencia y el tiempo, sino también la posible relación con diferentes variables registradas para cada sujeto. Permite, por tanto, calcular la tasa de mortalidad como una función del tiempo y de las variables pronóstico. En el modelo de Cox se analiza el producto de dos componentes, uno que depende del tiempo y otro que depende de las variables pronóstico o covariantes, y no depende el tiempo.

En este modelo los riesgos para dos conjuntos diferentes de valores de los covariantes conservan la misma proporción a lo largo del tiempo; de ahí el nombre de modelos de riesgos proporcionales.

Se empleó tanto en el estudio univariante como multivariante.

Análisis de la proporción libre de enfermedad mediante el método de supervivencia de Kaplan-Meier: Permite estudiar el comportamiento de la supervivencia. Esta metodología permite contrastar si los diferentes niveles de un determinado factor producen o no curvas de supervivencia significativamente distintas utilizando el test del logaritmo del rango. La elección de esta prueba concreta está fundamentada en un elevado número de casos censurados (libres de enfermedad o vivos). La variable “proporción libre de enfermedad” está definida como el tiempo total, expresado en meses, que transcurren desde el diagnóstico del tumor hasta que el paciente presenta un evento de recurrencia, en otro caso, hasta el último control de seguimiento que constata que el paciente permanece vivo. La curva de supervivencia representa la posibilidad de que un paciente permanezca libre de enfermedad un determinado tiempo tras el diagnóstico. El objetivo es obtener, mediante probabilidades condicionadas, una descripción más precisa de la evolución de la progresión de la

enfermedad a lo largo del tiempo. La particularidad del método de Kaplan-Meier frente a otras técnicas de cálculo de supervivencia es que las probabilidades se calculan en los instantes concretos de tiempo en que los pacientes recaen o fallecen, si hablamos de supervivencia global.

El nivel de significatividad empleado en todos los análisis ha sido de 5% ( $\alpha=0.05$ ). Cualquier valor de probabilidad inferior a 0.05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa.



### **3- RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL**



### **3.1- RESULTADOS:**

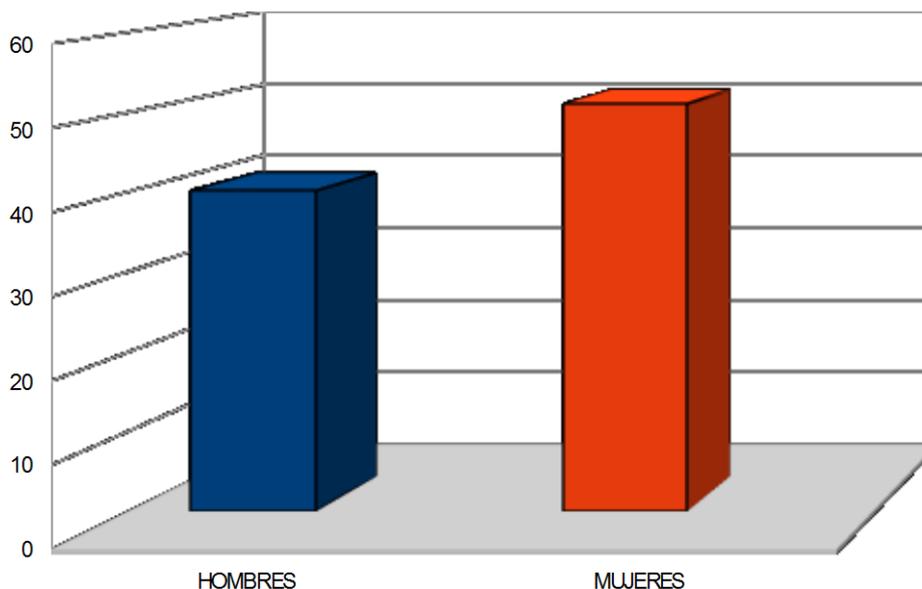
El estudio incluyó finalmente 91 pacientes diagnosticados de melanoma cutáneo, registrados entre los años 1992 a 2002, con material biopsico suficiente incluido en parafina, archivado y disponible en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, y con un seguimiento clínico apropiado de un mínimo de 10 años.

En primer lugar analizaremos las características clínicas de los pacientes y posteriormente las características histológicas.

#### **3.1.1- Parámetros clínicos:**

##### **3.1.1.1- Sexo:**

De los 91 casos analizados, 40 eran hombres y 51 mujeres.



##### **3.1.1.2- Edad:**

La edad de los pacientes se valoró en años en el momento del diagnóstico y estuvo comprendida entre los 21 y 87 años, con una edad media de 57,37 y una desviación típica de 17.99.

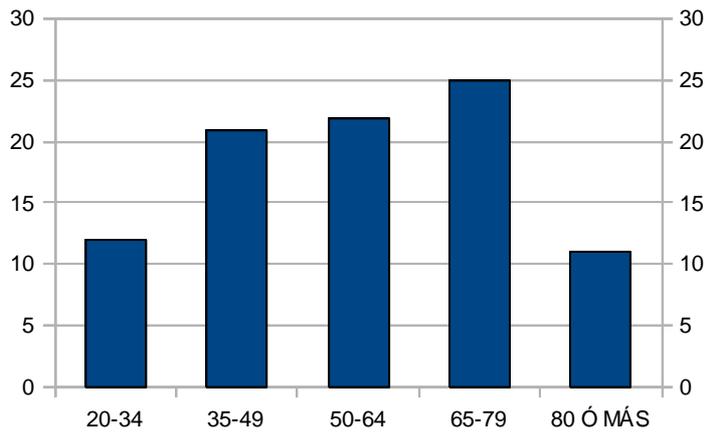
Pacientes con edades comprendidas entre 20-34 años: 12 (13%).

Pacientes con edades comprendidas entre 35-49 años: 21 (23%).

Pacientes con edades comprendidas entre 50-64 años: 22 (24%).

Pacientes con edades comprendidas entre 65-79 años: 25 (28%).

Pacientes con edad igual o mayor de 80 años: 11 (12%).



### 3.1.1.3- Localización de la lesión:

La localización más frecuente fue en miembros inferiores (35%).

Se establecieron 5 grupos anatómicos, obteniéndose los siguientes resultados:

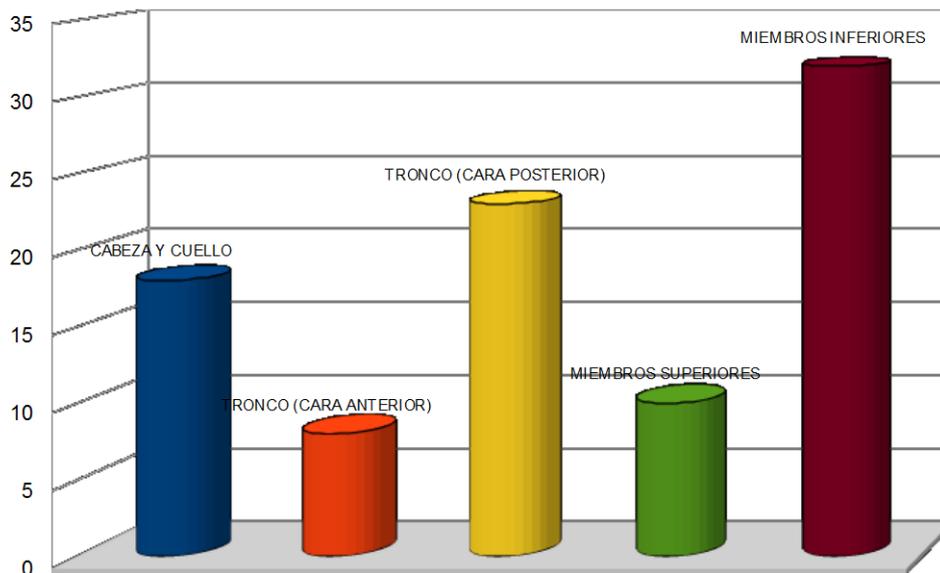
Cabeza y cuello: 18.

Tronco (área anterior): 8.

Tronco (área posterior): 23.

Miembros superiores: 10.

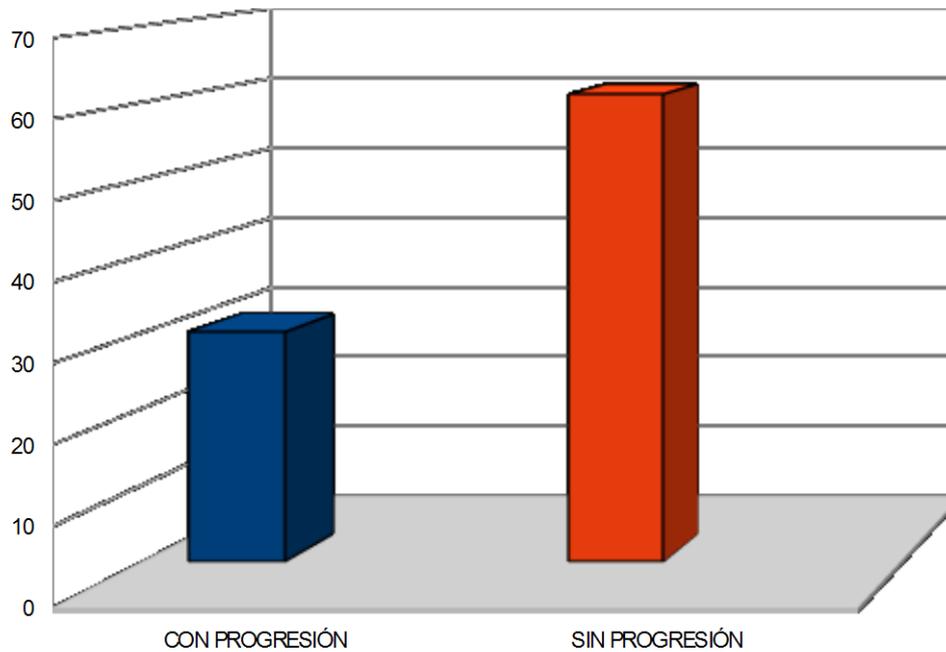
Miembros inferiores: 32.



### 3.1.1.4- Existencia de progresión de la enfermedad:

Casos que presentaron progresión de la enfermedad: 30.

Casos que no presentaron progresión de la enfermedad: 61.



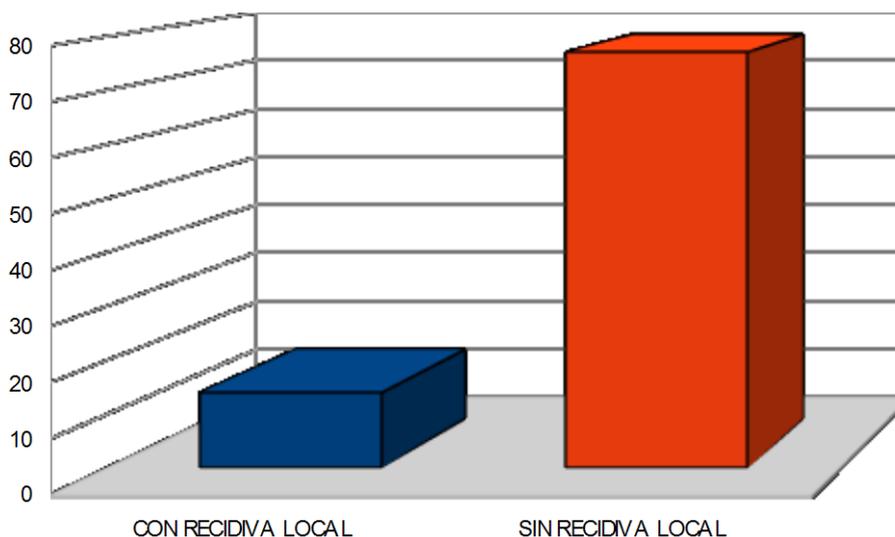
### 3.1.1.5- Tiempo expresado en meses hasta el diagnóstico de la progresión de la enfermedad:

El periodo de tiempo hasta la detección de la progresión de la enfermedad se sitúa entre 1 y 219 meses, con una media de 106,76 y una desviación típica de 72,38.

### 3.1.1.6- Existencia de recidiva local:

Casos que presentaron recidiva local: 14.

Casos que no presentaron recidiva local: 77.



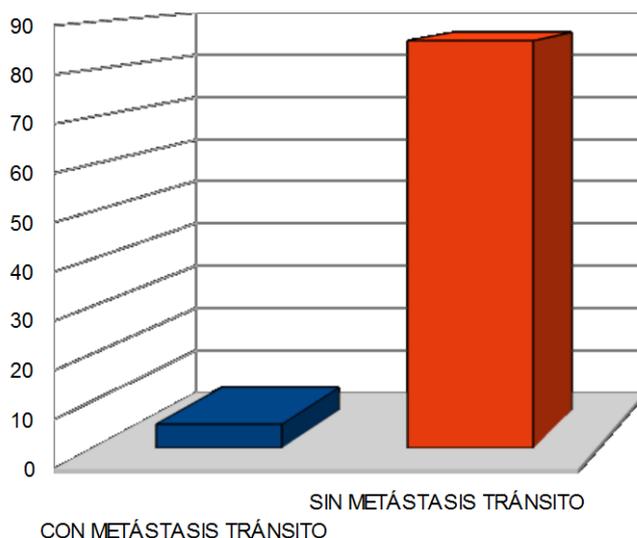
### 3.1.1.7- Tiempo expresado en meses hasta el diagnóstico de recidiva local:

El periodo de tiempo hasta la detección de la recidiva local de la enfermedad se sitúa entre 0 y 80 meses, con una media de 3,29 y una desviación típica de 11,72.

### 3.1.1.8- Existencia de metástasis en tránsito:

Casos que presentaron metástasis en tránsito: 5.

Casos que no presentaron metástasis en tránsito: 86.



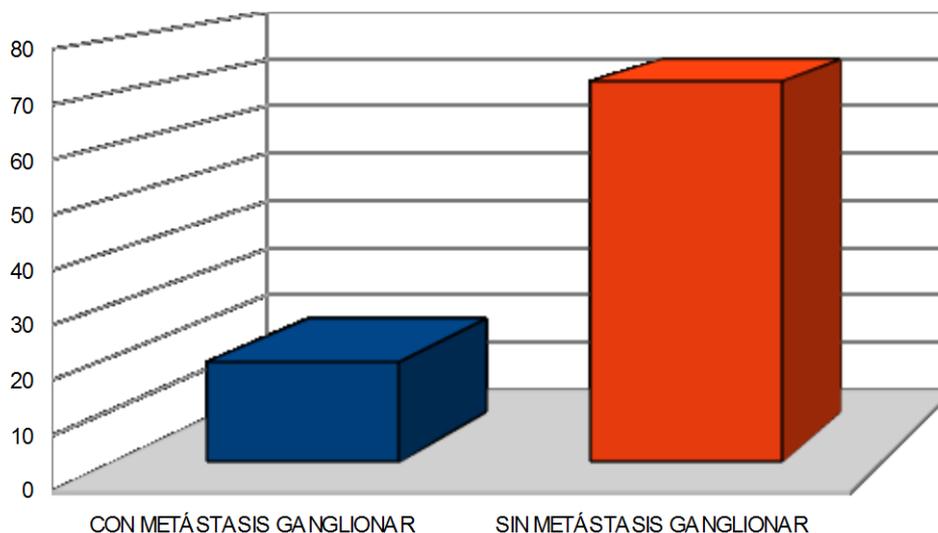
### 3.1.1.9- Tiempo expresado en meses hasta el diagnóstico de la metástasis en tránsito:

El periodo de tiempo hasta la detección de la metástasis en tránsito de la enfermedad se sitúa entre 0 y 80 meses, con una media de 2,20 y una desviación típica de 12,15.

### 3.1.1.10- Existencia de metástasis ganglionar:

Casos que presentaron metástasis ganglionar: 19.

Casos que no presentaron metástasis ganglionar: 72.



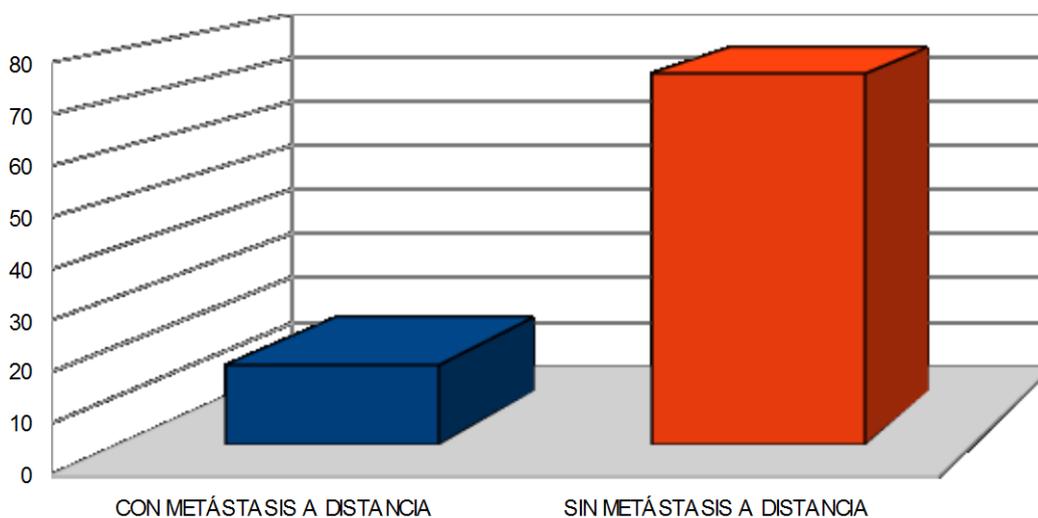
### 3.1.1.11- Tiempo expresado en meses hasta el diagnóstico de la metástasis ganglionar:

El periodo de tiempo hasta la detección de la presencia de metástasis ganglionar se sitúa entre 0 y 95 meses, con una media de 5,37 y una desviación típica de 14,94.

### 3.1.1.12- Existencia de metástasis a distancia:

Casos que presentaron metástasis a distancia: 16.

Casos que no presentaron metástasis a distancia: 75.



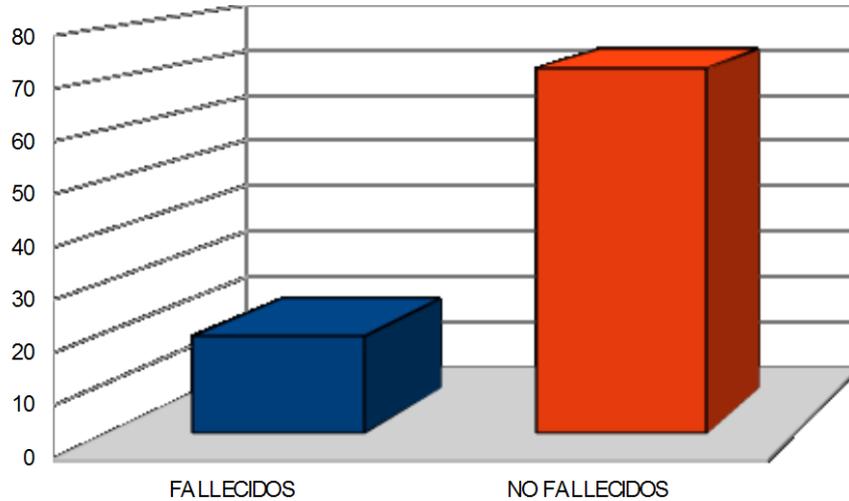
### 3.1.1.13- Tiempo expresado en meses hasta el diagnóstico de la metástasis a distancia:

El periodo de tiempo hasta la detección de la presencia de metástasis a distancia se sitúa entre 0 y 188 meses, con una media de 8,67 y una desviación típica de 25,03.

### 3.1.1.14- Supervivencia a melanoma cutáneo:

Casos que fallecieron por melanoma: 19.

Casos que no fallecieron por melanoma: 72.



### 3.1.1.15- Tiempo de supervivencia expresado en meses desde el diagnóstico de la lesión primitiva:

El periodo de tiempo de supervivencia se sitúa entre 10 y 219 meses, con una media de 128,95 y una desviación típica de 57,59.

### **3.1.2- Parámetros histológicos:**

#### **3.1.2.1- Tipo histológico:**

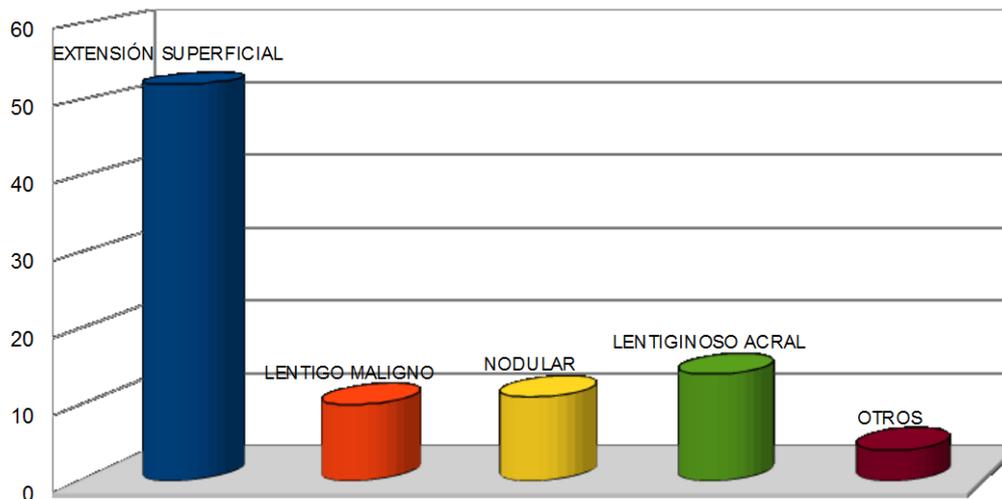
Melanoma de extensión superficial: 52.

Melanoma tipo/sobre léntigo maligno: 10.

Melanoma nodular: 11.

Melanoma lentiginoso acro: 14.

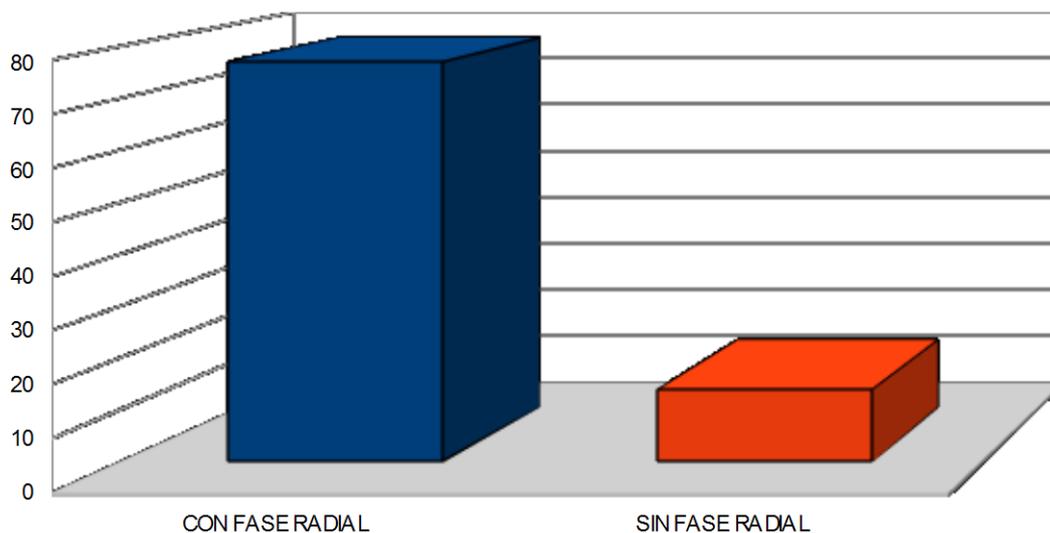
Otros tipos de melanoma: 4.



#### **3.1.2.2- Fase de crecimiento radial:**

Casos que presentaron fase de crecimiento radial: 77.

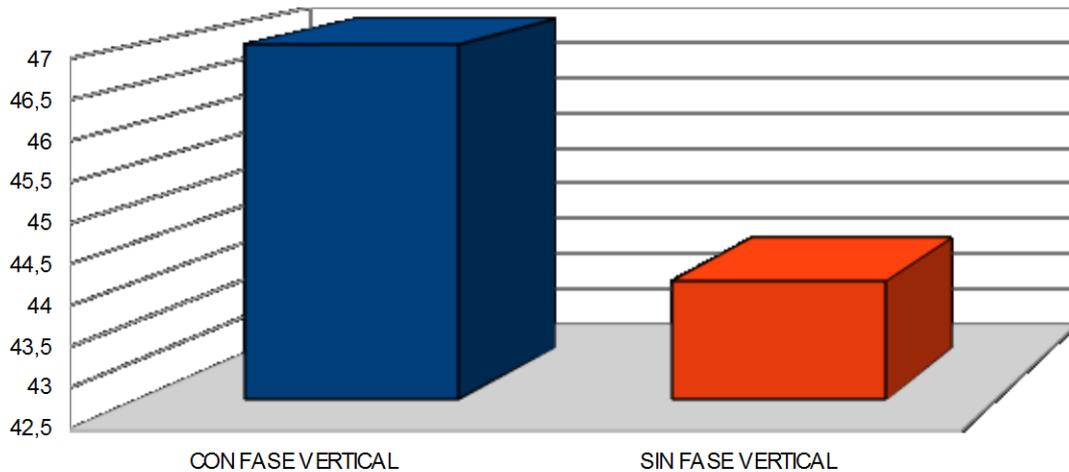
Casos que no presentaron fase de crecimiento radial: 14.



### 3.1.2.3- Fase de crecimiento vertical:

Casos que presentan fase vertical: 47.

Casos que no presentan fase vertical: 44.



### 3.1.2.4- Espesor en mm (Breslow):

Los valores observados para el espesor en mm (Breslow) fueron de 48 casos menores o iguales a 1mm y 43 casos mayores de 1 mm, con valores comprendidos entre 0,10 mm y 9,87 mm, con una media de 1,612 y una desviación típica de 1,80.

Casos que presentaron grosor en mm menor o igual a 1: 48.

Casos que presentaron grosor en mm entre 1.01 y 2.00: 21.

Casos que presentaron grosor en mm entre 2.01 y 4.00: 12.

Casos que presentaron grosor en mm mayor de 4.00: 10.

### 3.1.2.5- Nivel de Clark:

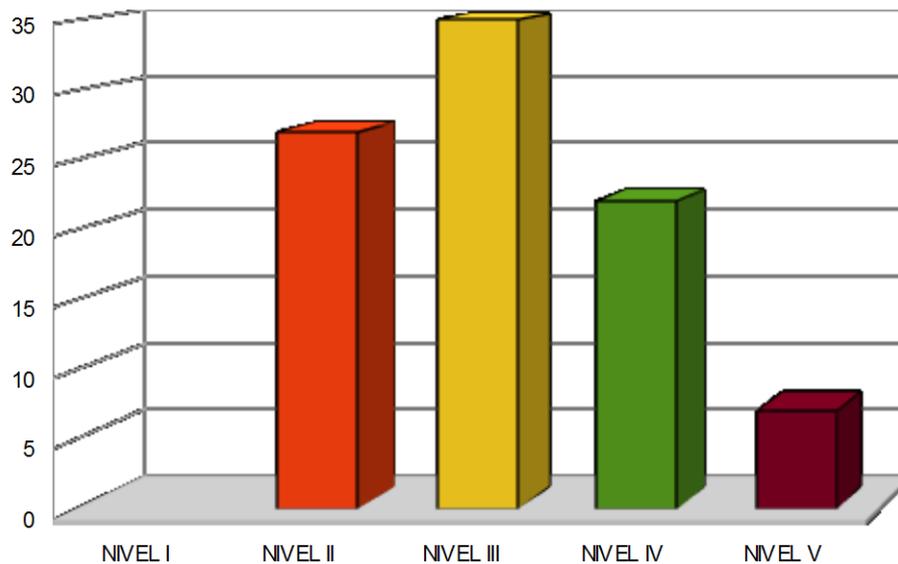
Casos con nivel I: 0.

Casos con nivel II: 27.

Casos con nivel III: 35.

Casos con nivel IV: 22.

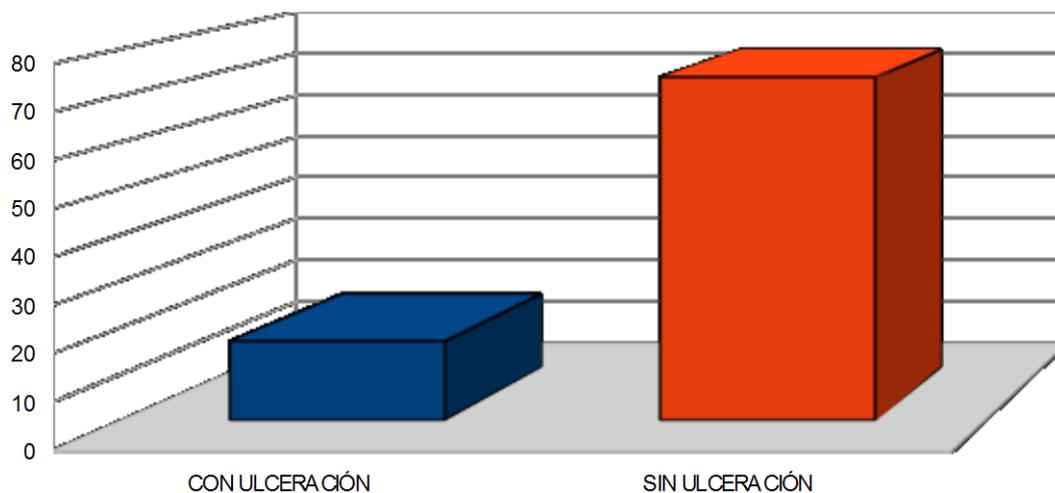
Casos con nivel V: 7.



### 3.1.2.6- Presencia de ulceración:

Casos que presentaron ulceración: 17.

Casos que no presentaron ulceración: 74.



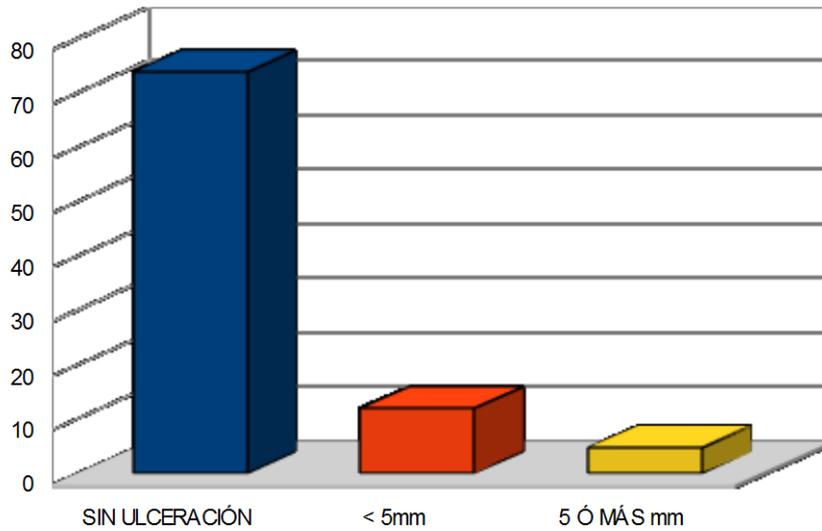
### 3.1.2.7- Diámetro de la ulceración, medida en mm:

El tamaño de la ulceración, estudiado en los 91 casos, se sitúa entre valores de 0 y 12 mm, con una media de 0.79 y una desviación típica de 2.21.

Casos que no presentaron ulceración: 74.

Casos con ulceración menor a 5 mm: 12.

Casos con ulceración igual o mayor de 5mm: 5.



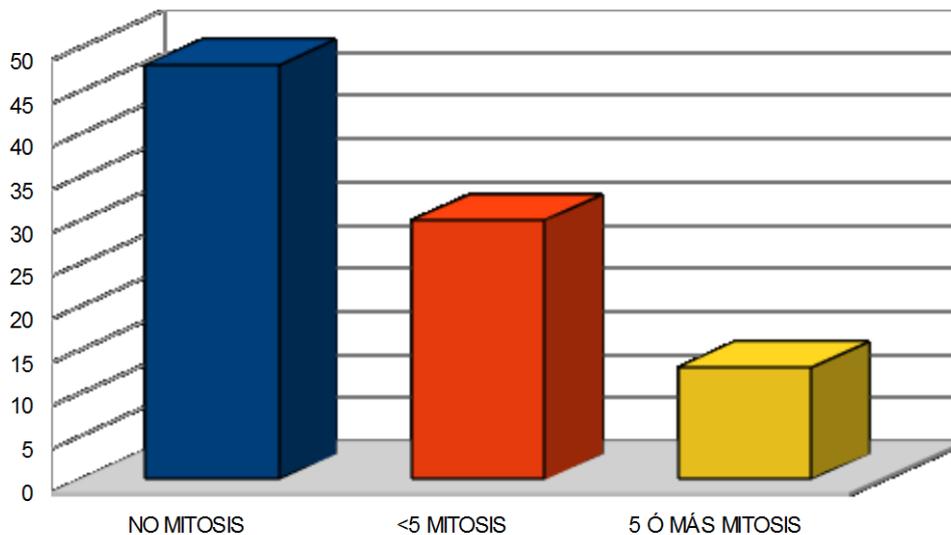
**3.1.2.7- Número de mitosis por mm<sup>2</sup>:**

Los casos estudiados presentaron un número variable de mitosis comprendido entre 0 y 30 mitosis, con una media de 2.31 y una desviación típica de 4.36.

Casos que no presentaron mitosis: 48.

Casos con número de mitosis menor a 5: 30.

Casos con número de mitosis mayor a 5: 13.

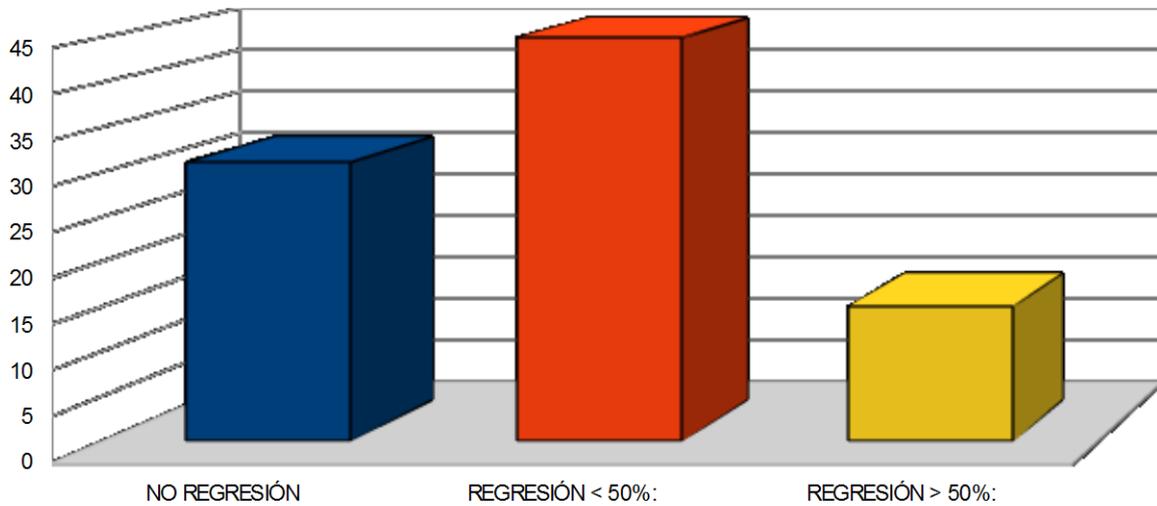


### 3.1.2.9- Existencia de regresión:

Casos que no presentaron regresión: 31.

Casos que presentaron una regresión menor del 50%: 45.

Casos que presentaron una regresión igual o mayor al 50%: 15.

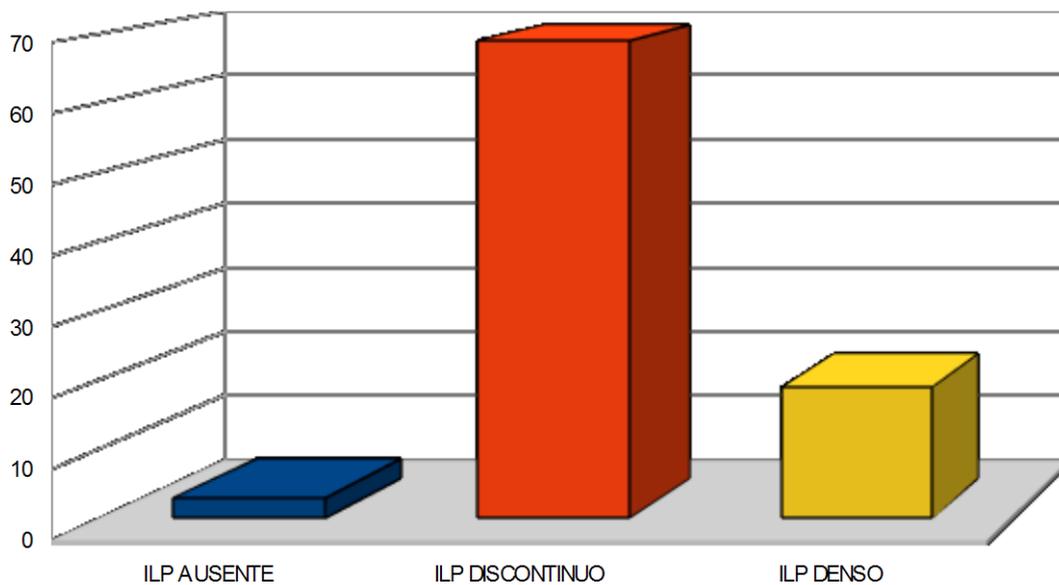


### 3.1.2.10- Presencia de infiltrado linfocitario peritumoral (ILP):

Ausencia de infiltrado linfocitario peritumoral: 3.

Infiltrado linfocitario peritumoral discontinuo: 69.

Infiltrado linfocitario peritumoral denso: 19.



### 3.1.2.11- Presencia de infiltrado linfocitario intratumoral (ILI):

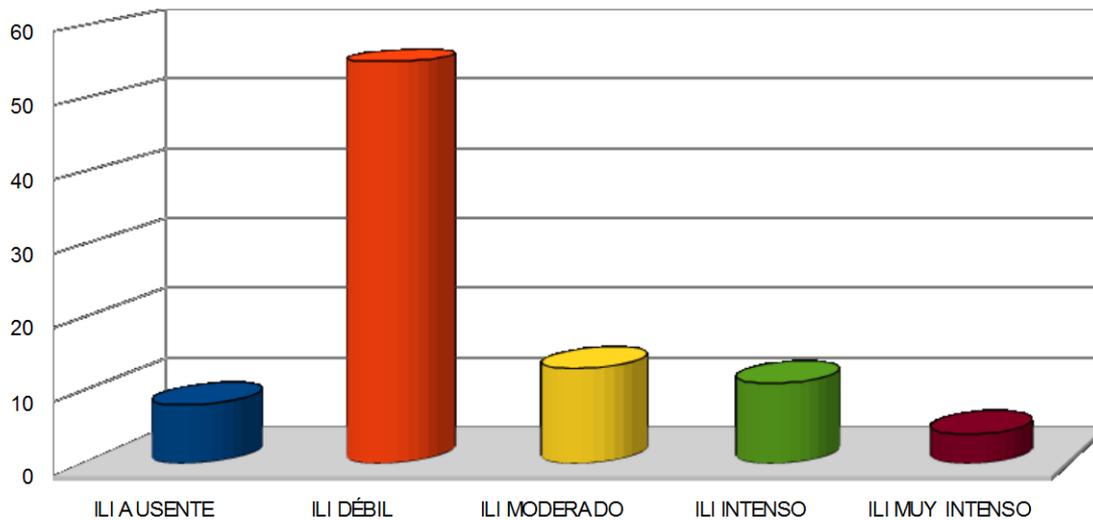
Ausencia de infiltrado linfocitario intratumoral: 8.

Infiltrado linfocitario intratumoral débil: 55.

Infiltrado linfocitario intratumoral moderado: 13.

Infiltrado linfocitario intratumoral intenso: 11.

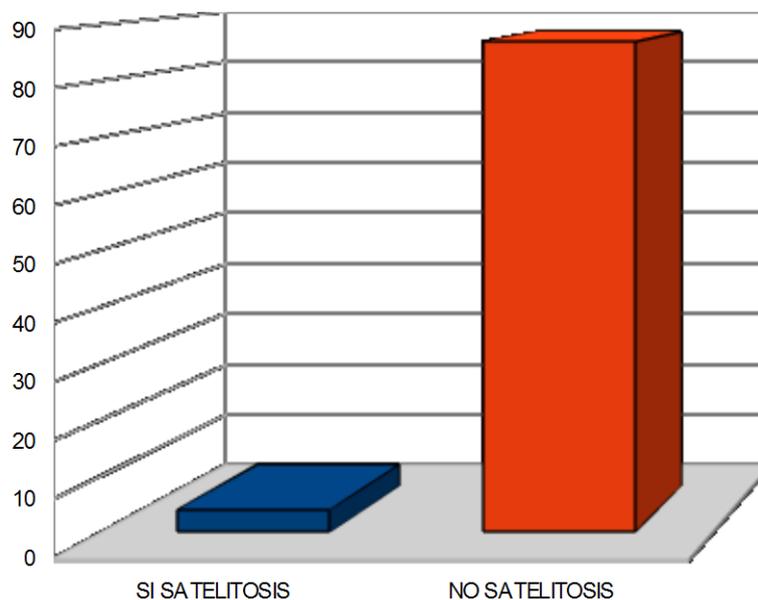
Infiltrado linfocitario intratumoral muy intenso: 4.



### 3.1.2.12- Presencia de satelitos:

Pacientes que presentaron satelitos: 4.

Pacientes que no presentaron satelitos: 87.

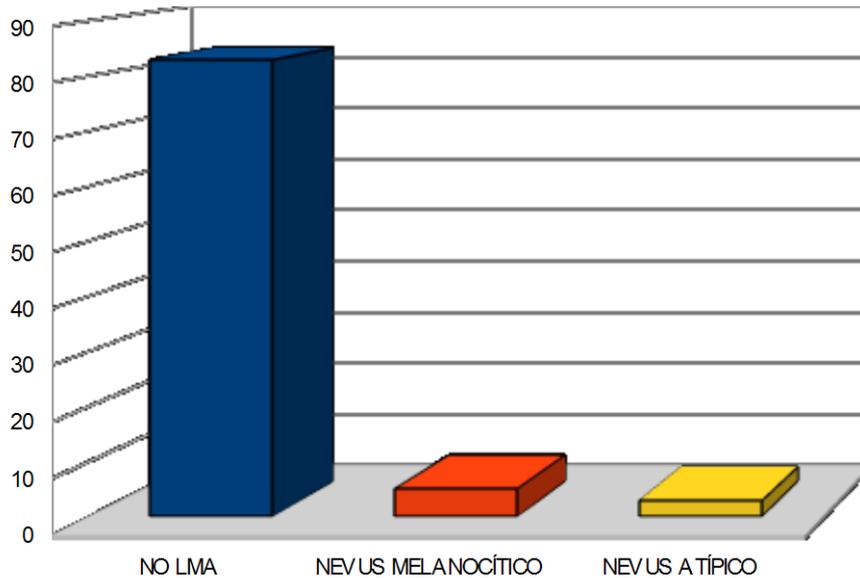


### 3.1.2.13- Presencia de lesión melanocítica asociada (LMA):

Casos sin lesión melanocítica asociada: 83.

Casos con nevus melanocítico asociado: 5.

Casos con nevus atípico asociado: 3.



### 3.1.2.14- Tipo celular predominante en la lesión primaria:

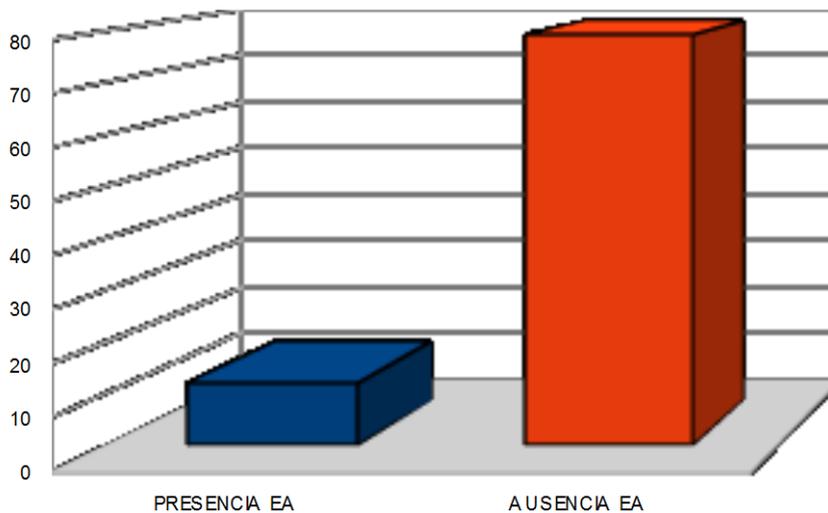
Epitelioide: 84.

Fusocelular: 7.

### 3.1.2.15- Presencia de elastosis actínica (EA):

Casos en los que se observa elastosis actínica: 12.

Casos en los que no se observa elastosis actínica: 79.



### **3.1.3- Parámetros inmunohistoquímicos:**

#### **3.1.3.1- CD20:**

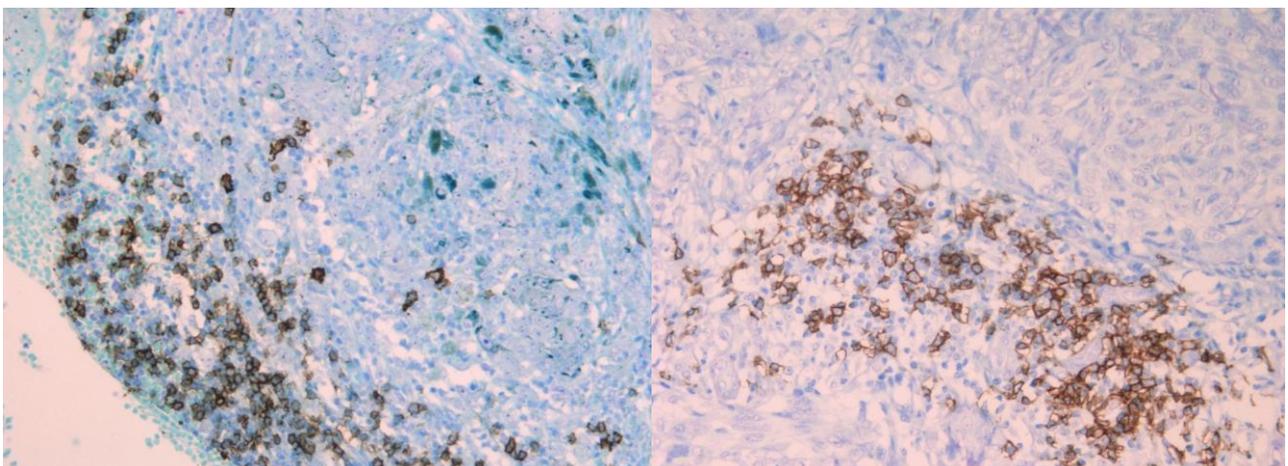
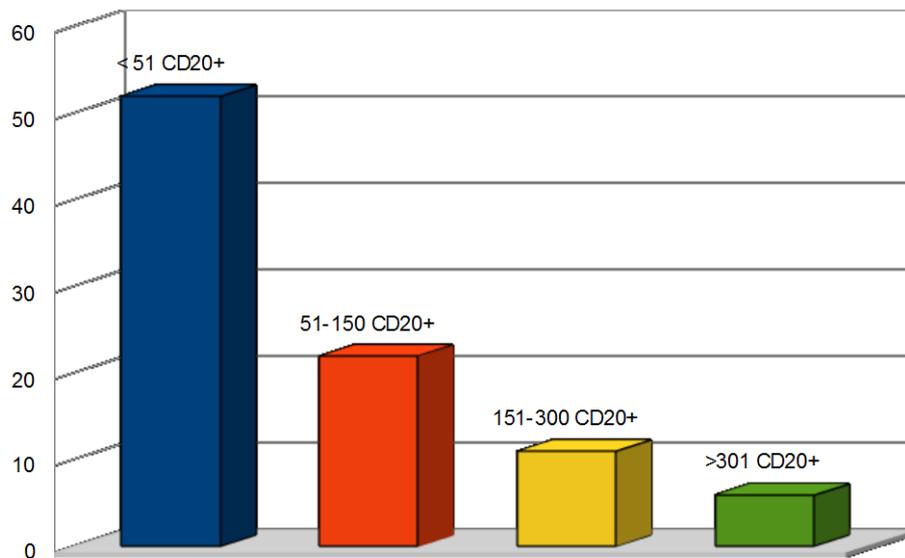
El estudio cuantitativo de linfocitos positivos para CD20 mostró resultados comprendidos entre 0 y 600 linfocitos, con una media de 93,62 y una desviación típica de 132,75.

Casos con número de linfocitos CD20+ menor o igual de 50: 52.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD20+ entre 51-150: 22.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD20+ entre 151-300: 11.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD20+ mayor a 301: 6.



### 3.1.3.2- CD3:

El estudio de linfocitos positivos para CD3 mostró resultados comprendidos entre 50 y 1800 linfocitos, con una media de 453,30 y una desviación típica de 299,16. En los casos de nuestro estudio se comprobó una presencia de linfocitos T muy superior a linfocitos B.

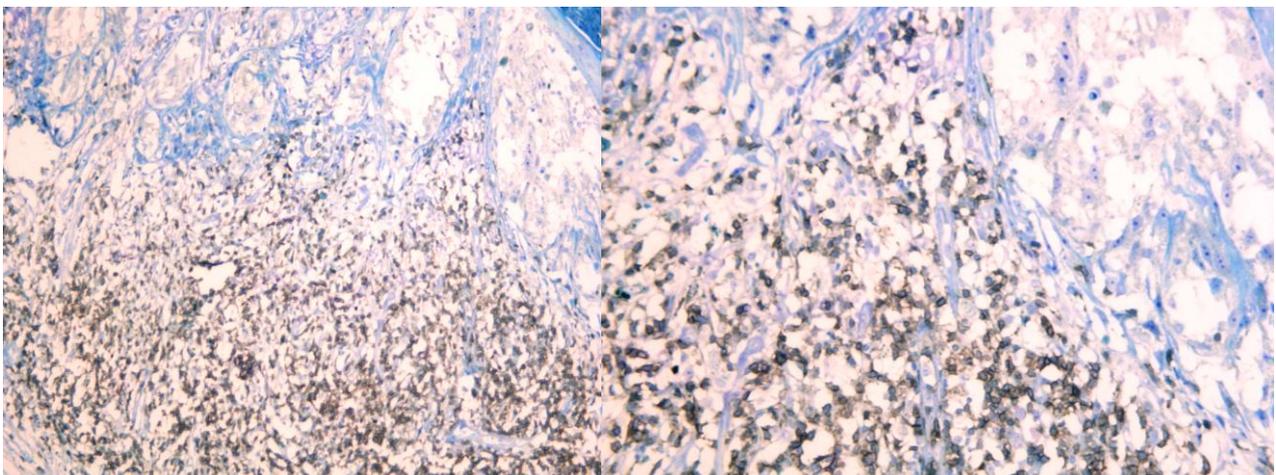
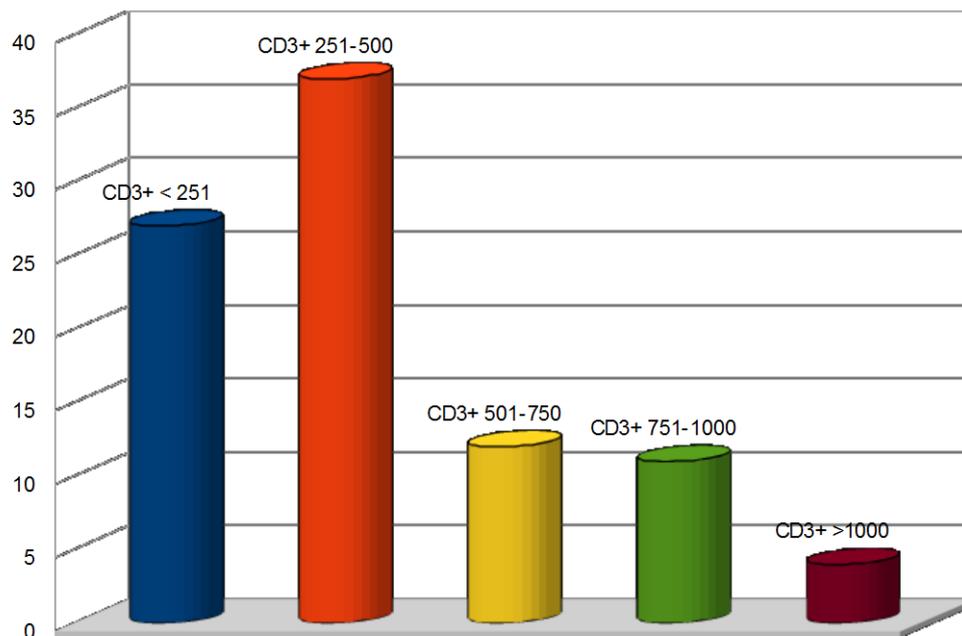
Casos que presentaron un número de linfocitos CD3+ menor o igual a 250: 27.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD3+ entre 251-500: 37.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD3+ entre 501-750: 12.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD3+ entre 751-1000: 11.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD3+ mayor a 1000: 4.



### 3.1.3.3- CD4:

El estudio de linfocitos positivos para CD4 mostró resultados comprendidos entre 0 y 200 linfocitos, con una media de 7,29 y una desviación típica de 21,89. En los casos de nuestro estudio se comprobó una presencia de linfocitos T CD8+ muy superior a los CD4+.

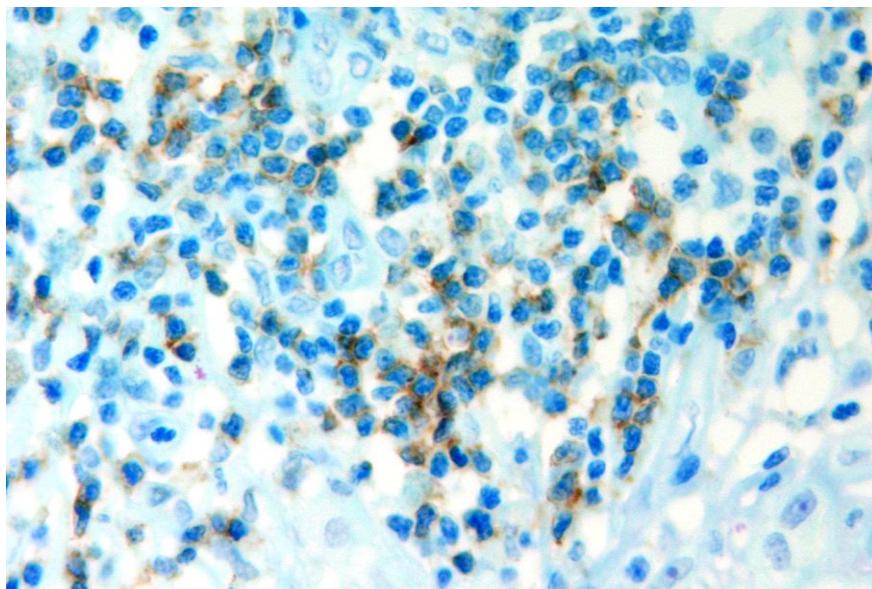
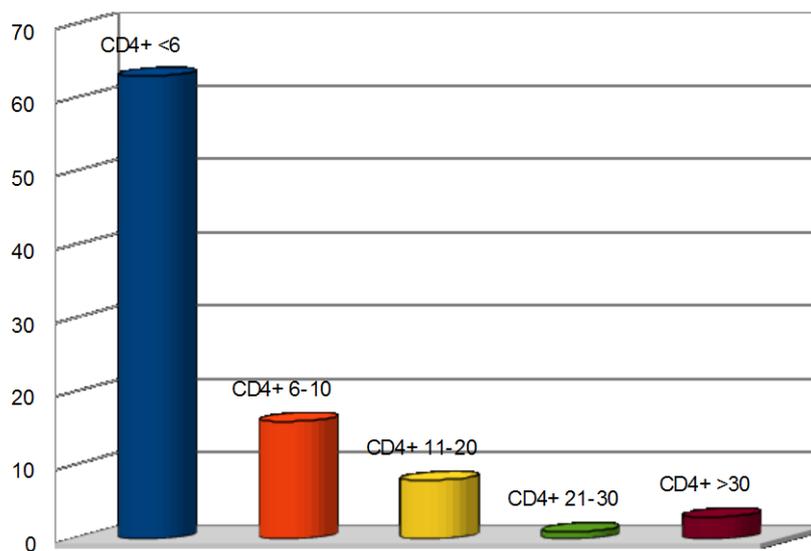
Casos que presentaron un número de linfocitos CD4+ menor o igual a 5: 63.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD4+ entre 6-10: 16.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD4+ entre 11-20: 8.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD4+ entre 21-30: 1.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD4+ mayor a 30: 3.



### 3.1.3.4- CD8:

El estudio de linfocitos positivos para CD8 mostró resultados comprendidos entre 10 y 890 linfocitos, con una media de 244,66 y una desviación típica de 173,16. En los casos de nuestro estudio se comprobó una presencia de linfocitos T CD8+ muy superior a los CD4+.

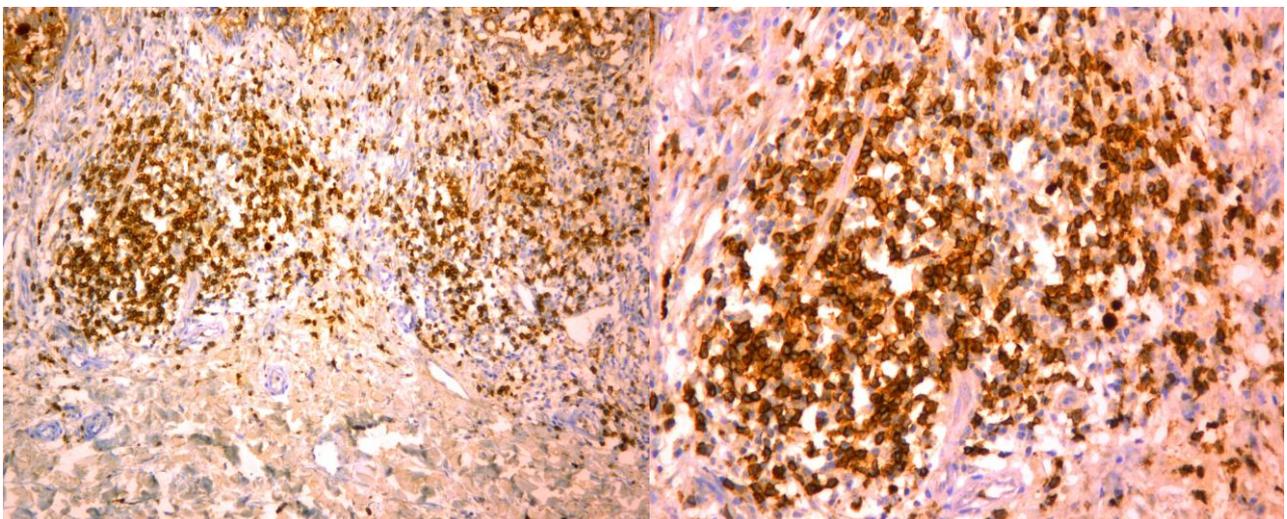
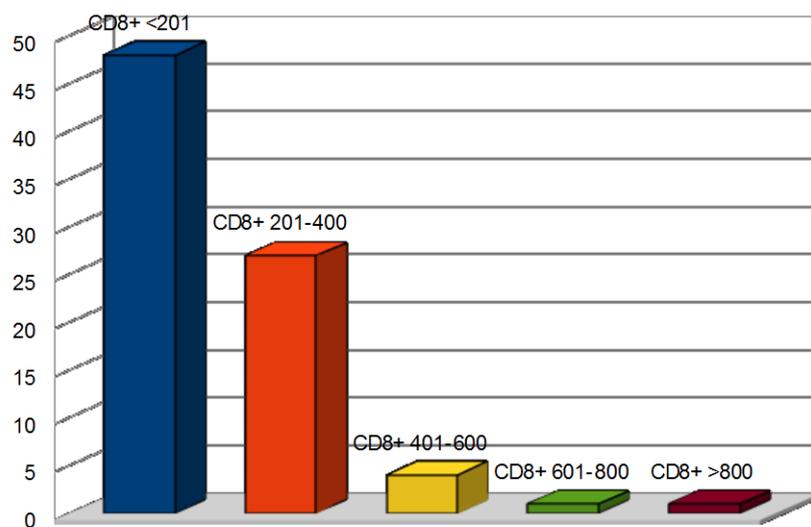
Casos que presentaron un número de linfocitos CD8+ menor o igual a 200: 48.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD8+ entre 201-400: 27.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD8+ entre 401-600: 14.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD8+ entre 601-800: 1.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD8+ mayor a 800: 1.



### 3.1.3.5- CD25:

El estudio de linfocitos positivos para CD25 mostró resultados comprendidos entre 0 y 150 linfocitos, con una media de 24,62 y una desviación típica de 26,37.

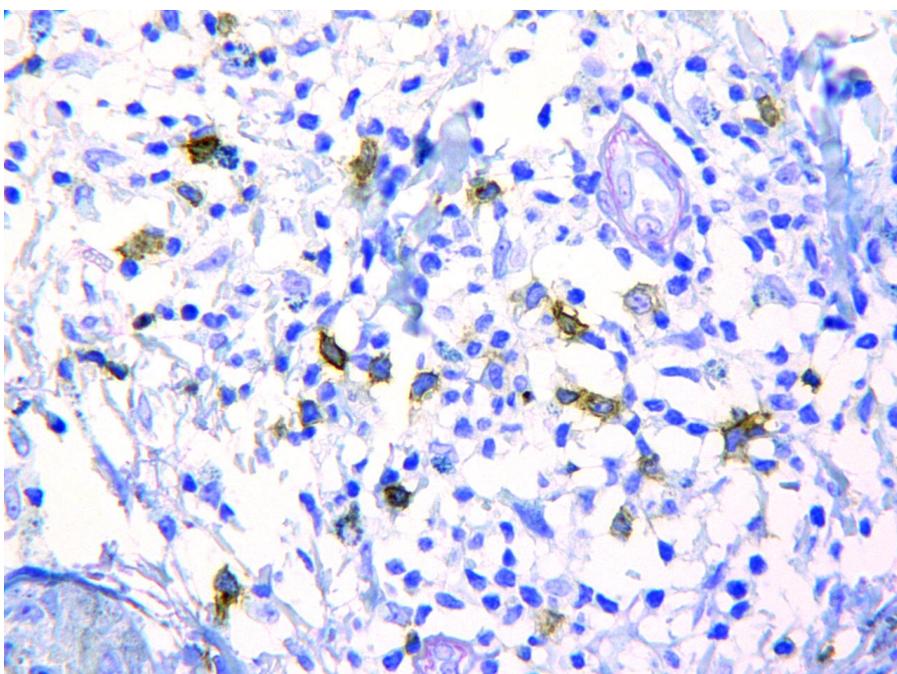
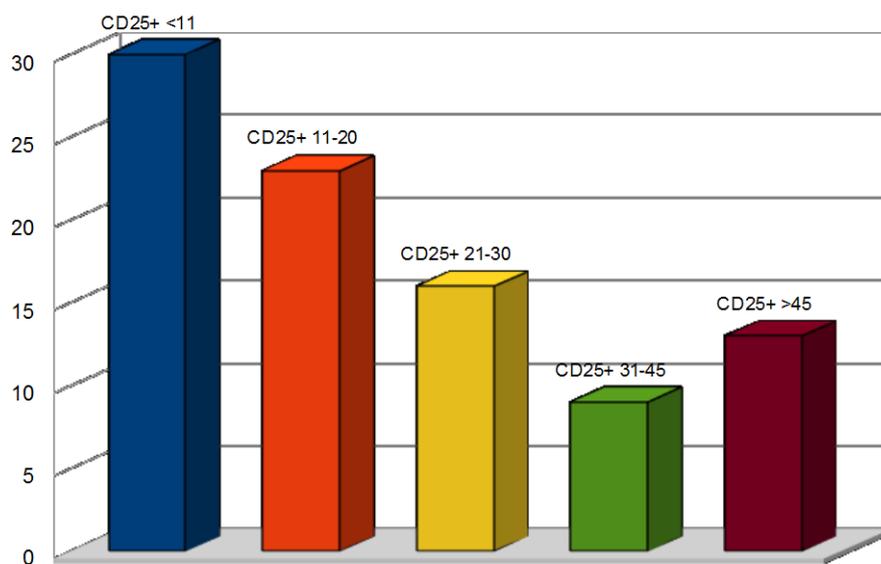
Casos que presentaron un número de linfocitos CD25+ menor o igual a 10: 30.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD25+ entre 11-20: 23.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD25+ entre 21-30: 16.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD25+ entre 31-45: 9.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD25+ mayor 45: 13.



### 3.1.3.6- CD134:

El estudio de linfocitos positivos para CD134 mostró resultados comprendidos entre 0 y 110 linfocitos, con una media de 24,51 y una desviación típica de 22,74.

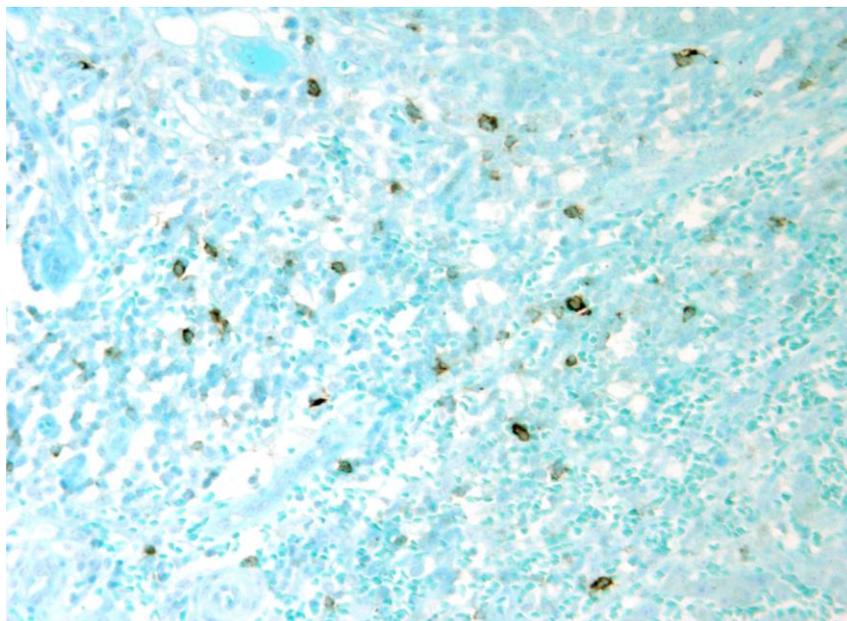
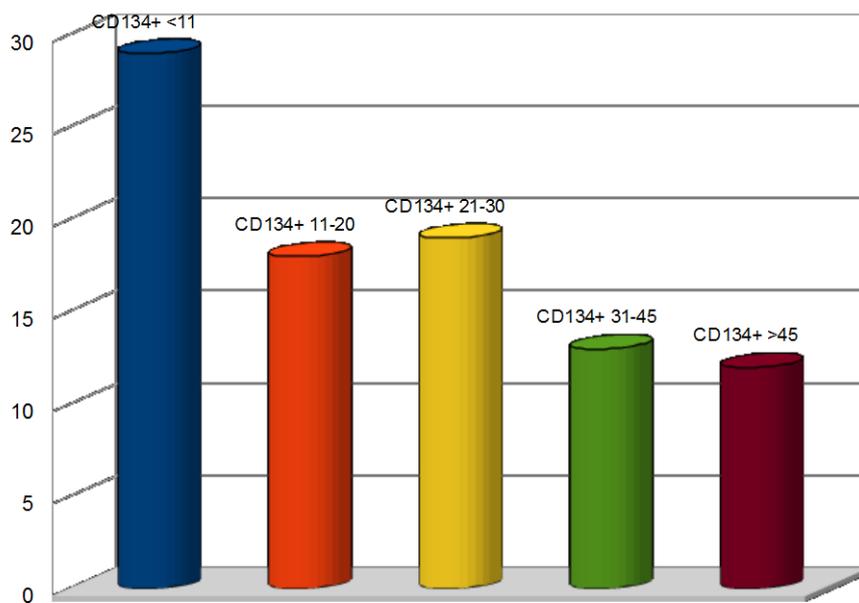
Casos que presentaron un número de linfocitos CD134+ menor o igual a 10: 29.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD134+ entre 11-20: 18.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD134+ entre 21-30: 19.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD134+ entre 31-45: 13.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD134+ mayor a 45: 12.



### 3.1.3.7- FoxP3:

El estudio de linfocitos positivos para FoxP3 mostró resultados comprendidos entre 0 y 250 linfocitos, con una media de 65,99 y una desviación típica de 58,34.

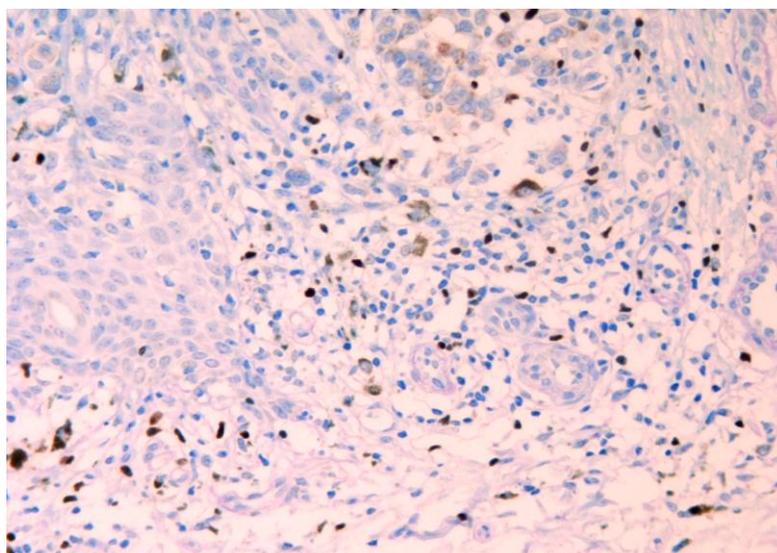
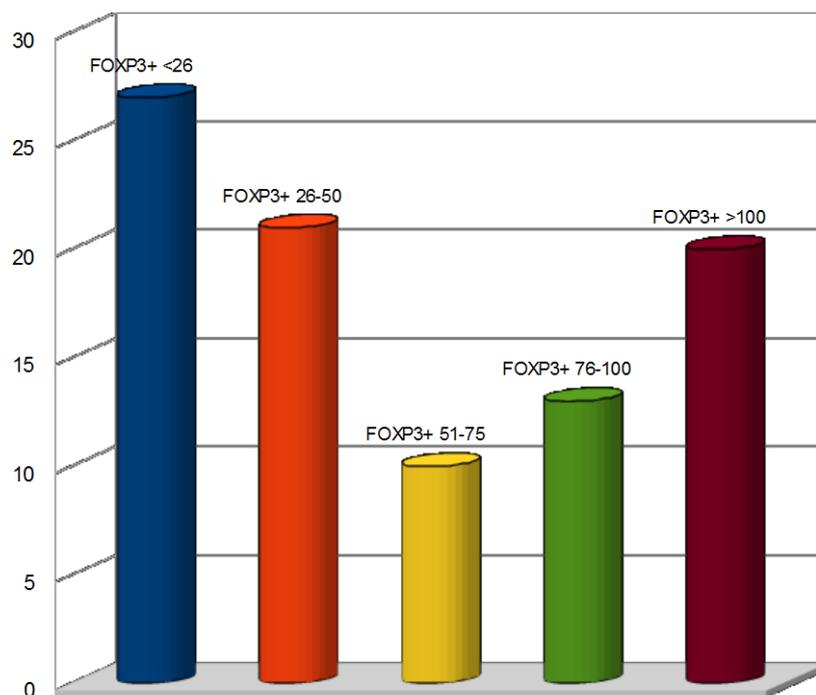
Casos que presentaron un número de linfocitos FoxP3+ menor o igual a 25: 27.

Casos que presentaron un número de linfocitos FoxP3+ entre 26-50: 21.

Casos que presentaron un número de linfocitos FoxP3+ entre 51-75: 10.

Casos que presentaron un número de linfocitos FoxP3+ entre 76-100: 13.

Casos que presentaron un número de linfocitos FoxP3+ mayor a 100: 20.



### 3.1.3.8- CD56:

El estudio de linfocitos positivos para CD56 mostró resultados comprendidos entre 0 y 27 linfocitos, con una media de 2,64 y una desviación típica de 4,97.

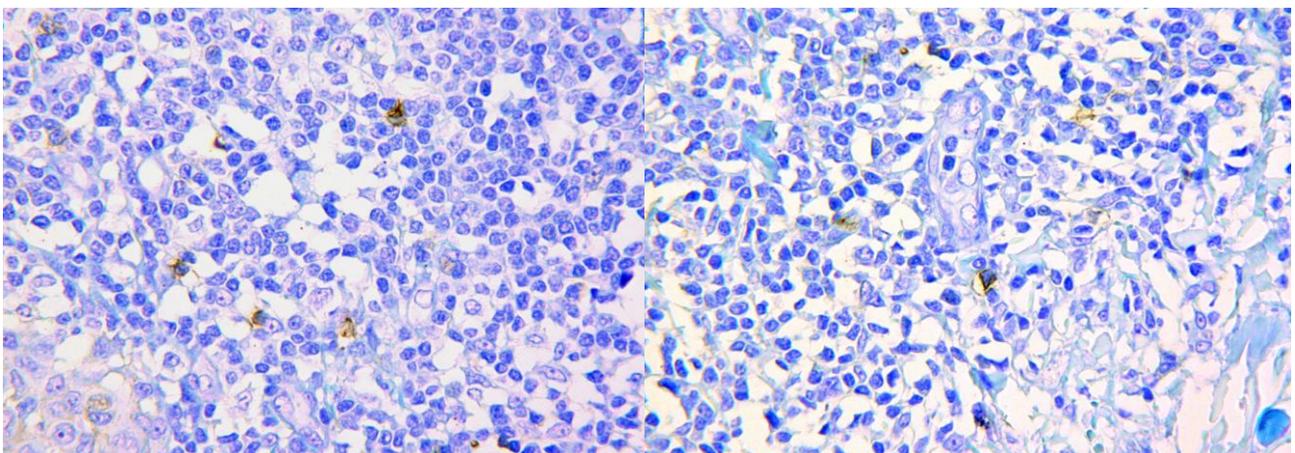
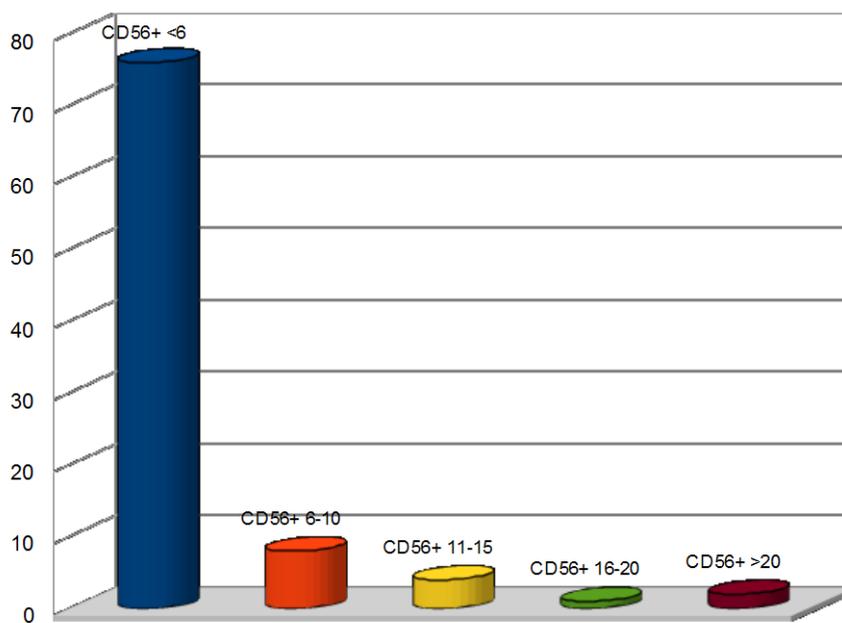
Casos que presentaron un número de linfocitos CD56+ menor o igual a 5: 76.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD56+ entre 6-10: 8.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD56+ entre 11-15: 4.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD56+ entre 16-20: 1.

Casos que presentaron un número de linfocitos CD56+ mayor a 20: 2.



### 3.1.3.9- CCL27 en linfocitos (C27L):

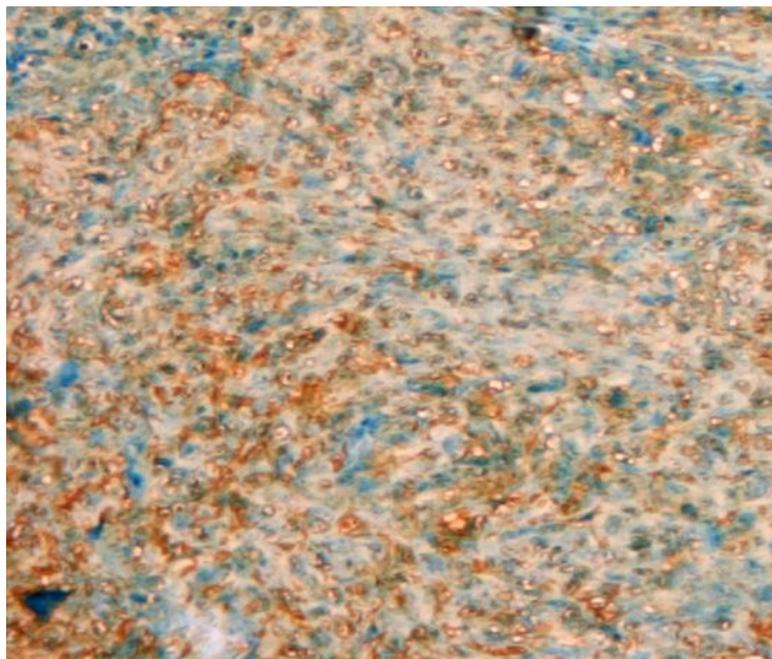
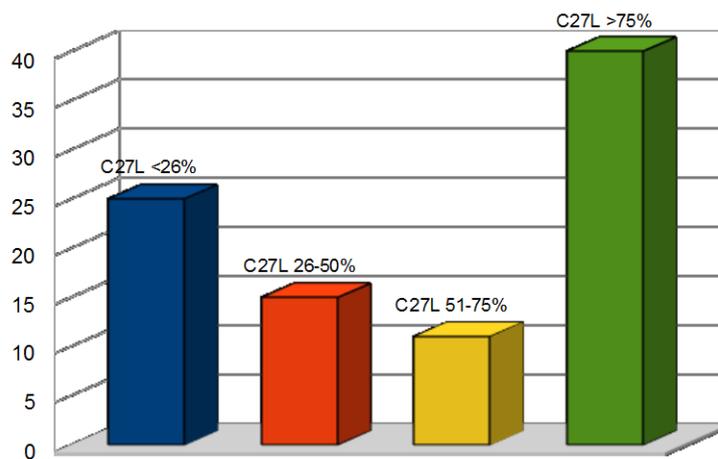
El estudio de la positividad de CCL27 en linfocitos se efectuó midiendo el porcentaje de inmunotinción de los mismos, mostrando una positividad entre el 0% y el 100%, con una media de 54,54 y una desviación típica de 34,48.

Casos que presentaron un porcentaje menor del 25%: 25.

Casos que presentaron un porcentaje entre 26-50%: 15.

Casos que presentaron un porcentaje entre 51-75%: 11.

Casos que presentaron un porcentaje mayor del 75%: 40.



### 3.1.3.10- CCL27 en células tumorales (C27CT):

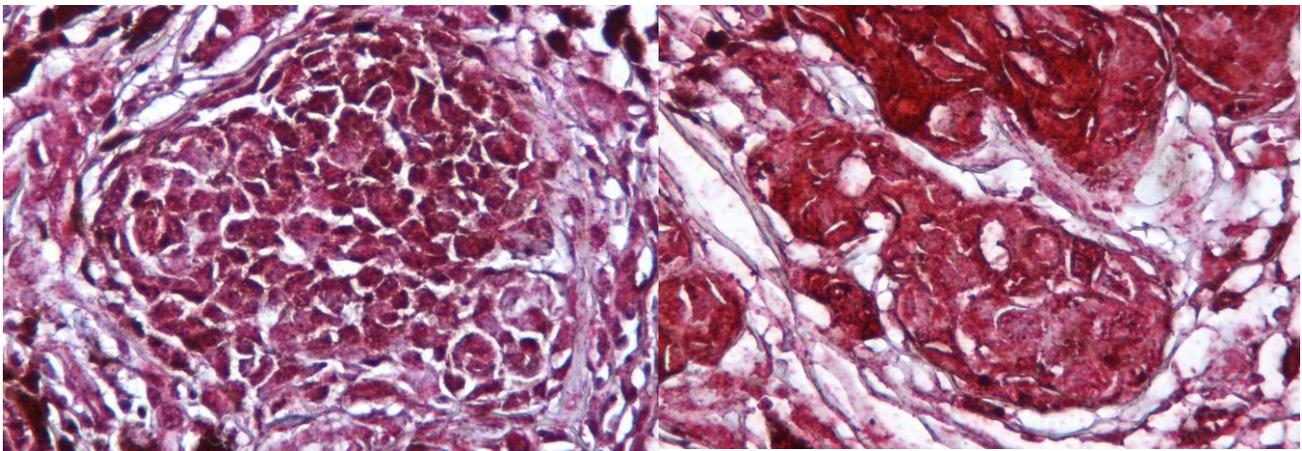
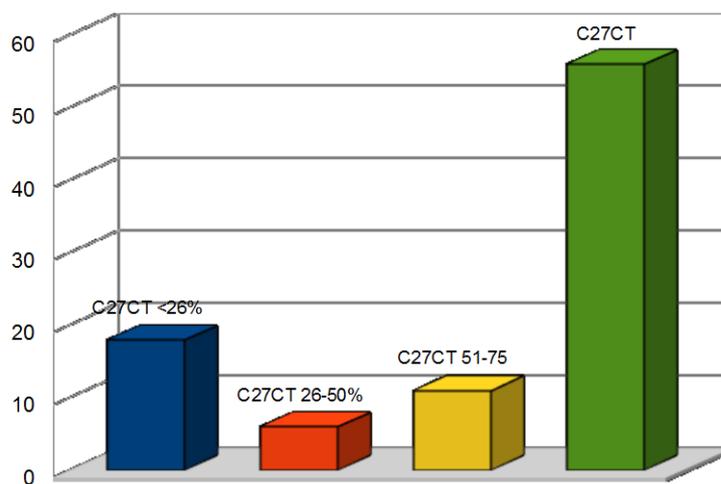
El estudio de la positividad de CCL27 en la masa tumoral se efectuó midiendo el porcentaje de positividad de las células tumorales, mostrando una positividad entre el 0% y el 100%, con una media de 69,82 y una desviación típica de 35,26.

Casos que presentaron un porcentaje menor del 25%: 18.

Casos que presentaron un porcentaje entre 26-50%: 6.

Casos que presentaron un porcentaje entre 51-75%: 11.

Casos que presentaron un porcentaje mayor del 75%: 56.



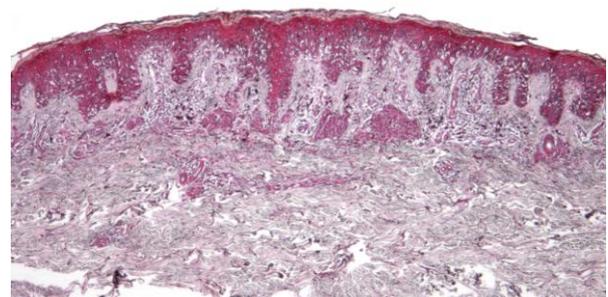
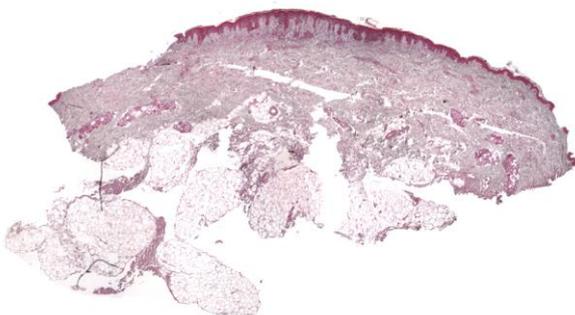
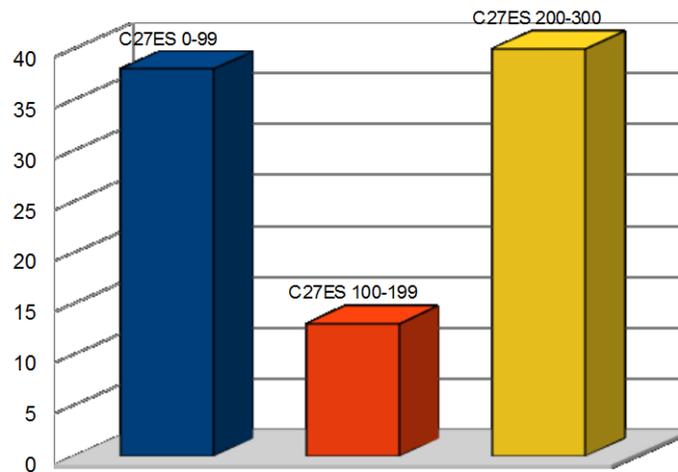
### 3.1.3.11- CCL27 en epitelio supratumoral (C27ES):

El estudio de la positividad de CCL27 en el epitelio supratumoral se efectuó midiendo la intensidad de la tinción (0: negativa; 1: débil; 2: moderada; 3: intensa) y multiplicándolo por el porcentaje de positividad en las células epidérmicas supratumorales, mostrando unos valores entre 0 y 300, con una media de 149,18 y una desviación típica de 115,52. Estadísticamente se obtuvieron 3 grupos con significación estadística

Casos con puntuación entre 0-99: 38.

Casos con puntuación entre 100-199: 13.

Casos con puntuación entre 200-300: 40.



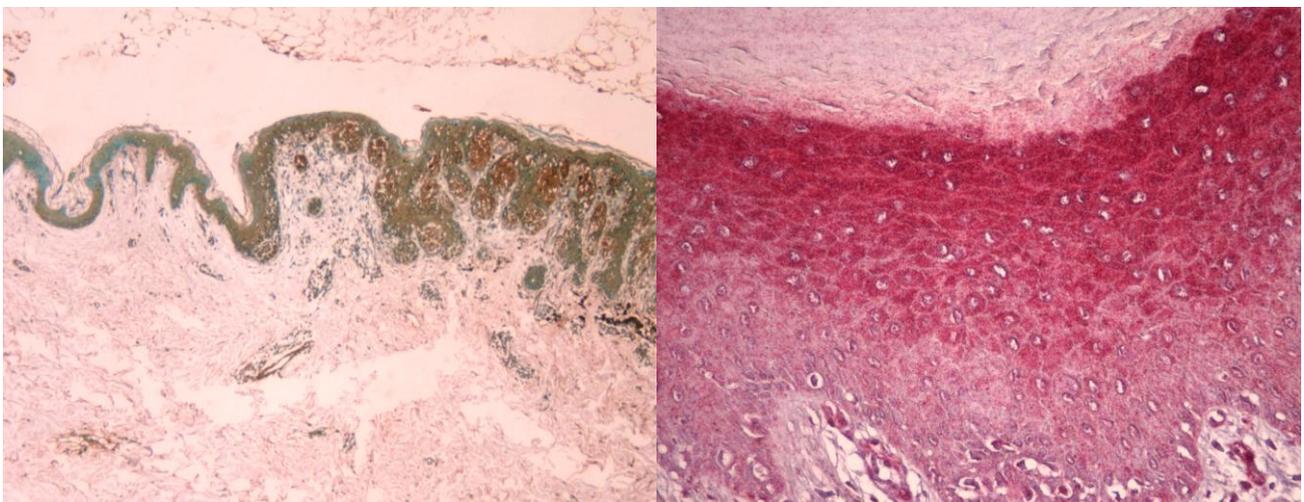
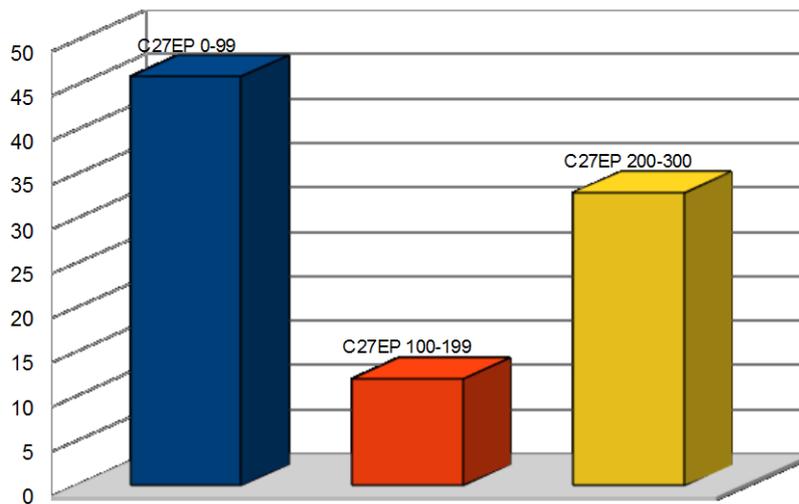
### 3.1.3.12- CCL27 en epitelio peritumoral (C27EP):

El estudio de la positividad de CCL27 en el epitelio peritumoral se efectuó midiendo la intensidad de la tinción (0: negativa; 1: débil; 2: moderada; 3: intensa) y multiplicándolo por el porcentaje de positividad en las células epidérmicas peritumorales, mostrando unos valores entre 0 y 300, con una media de 124,45 y una desviación típica de 117,40. Estadísticamente se obtuvieron 3 grupos con significación estadística.

Casos con puntuación entre 0-99: 46.

Casos con puntuación entre 100-199: 12.

Casos con puntuación entre 200-300: 33.



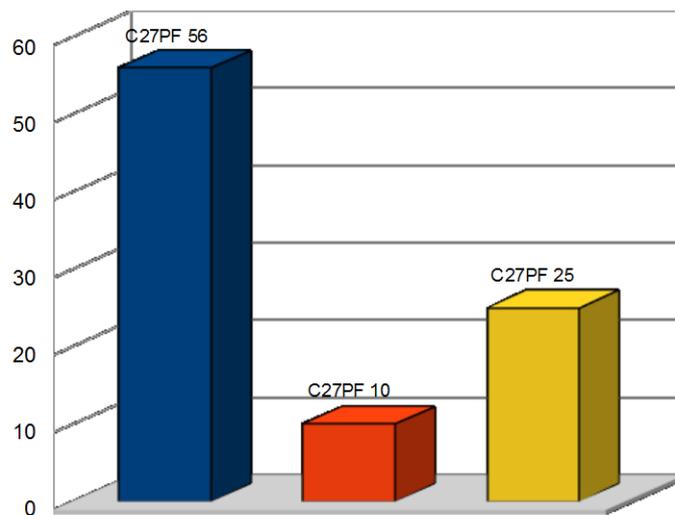
### 3.1.3.13- CCL27 en epitelio periférico (C27PF):

El estudio de la positividad de CCL27 en el epitelio periférico se efectuó midiendo la intensidad de la tinción (0: negativa; 1: débil; 2: moderada; 3: intensa) y multiplicándolo por el porcentaje de positividad en las células epidérmicas periféricas, mostrando unos valores entre 0 y 300, con una media de 98,13 y una desviación típica de 117,33. Estadísticamente se obtuvieron 3 grupos con significación estadística.

Casos con puntuación entre 0-99: 56.

Casos con puntuación entre 100-199: 10.

Casos con puntuación entre 200-300: 25.



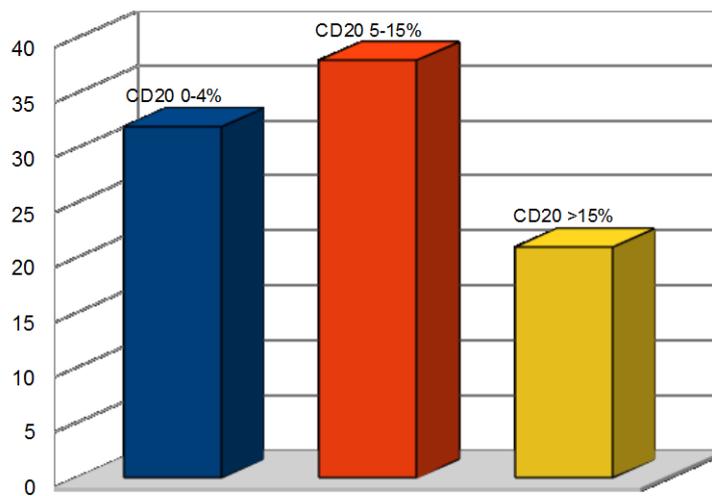
### 3.1.3.14- Porcentaje de linfocitos CD20+:

Se efectuó un estudio del porcentaje total de linfocitos CD20+ observado en la laminilla estudiada de cada tumor respecto al porcentaje de linfocitos CD3+, observándose un claro predominio de linfocitos CD3+. Los valores de porcentaje para linfocitos CD20+ variaron entre 0% y 50%, con una media de 11,16 y una desviación típica de 11,88. El estudio estadístico mostró 3 grupos con significación estadística.

Casos con porcentaje de CD20 entre 0-4%: 32.

Casos con porcentaje de CD20 entre 5-15%: 38.

Casos con porcentaje de CD20 mayor de 15%: 21.



### 3.1.4- Estudio estadístico de todos los casos

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la progresión del melanoma:**

Se obtuvieron los siguientes resultados destacables:

1. Un mayor porcentaje de linfocitos CD20 (variable CD20%) se correlaciona directamente con la progresión del melanoma rozando la significatividad estadística.
2. Una mayor expresión de CCL27 en el epitelio supratumoral se asocia con la ausencia de progresión de melanoma.
3. El resto de variables independientes no clásicas incluidas en nuestro estudio no mostraron asociaciones estadísticamente significativas para progresión de la enfermedad. Sí lo hicieron las variables clásicas Breslow, presencia de ulceración, tamaño de la úlcera, número de mitosis, satelitosis, edad, crecimiento radial y crecimiento vertical.

VARIABLE	P
Porcentaje CD20	0,058
CCL27 epitelio supratumoral	0,012
CD20	0,161
CD3	0,816
CD4	0,699
CD8	0,876
CD25	0,133
CD134	0,104
FOXP3	0,645
CD56	0,478
CCL27 LINFOCITOS (LINF)	0,170
CCL27 TUMOR (TUM)	0,192
CCL27 EPITELIO PERITUMORAL (EP)	0,569
CCL27 EPITELIO PERIFÉRICO (PF)	0,396

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la mortalidad por melanoma:**

Se efectuó el estudio de todas las variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

1. La mayor expresión de CCL27 en el epitelio supratumoral se asocia a una mayor supervivencia.
2. El resto de variables independientes no clásicas incluidas en nuestro estudio no mostraron asociaciones estadísticamente significativas para progresión de la enfermedad. Sí lo hicieron las variables clásicas Breslow, presencia de ulceración, tamaño de la úlcera, número de mitosis, Clark, satelitosis, crecimiento radial y crecimiento vertical

VARIABLE	P
CCL27 epitelio supratumoral	0,045
CD20	0,244
CD3	0,479
CD4	0,247
CD8	0,446
CD25	0,295
CD134	0,703
FOXP3	0,476
CD20%	0,086
CD56	0,775
CCL27 (LINF)	0,668
CCL27 (TUM)	0,314
CCL27 (EP)	0,772
CCL27 (PF)	0,420

**- Estudio univariante (regresión Cox) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el tiempo libre de enfermedad (medido en meses):**

Se efectuó el estudio de todas las variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

1. Un mayor porcentaje de linfocitos CD20 (variable CD20%) se asocia a un menor tiempo

- libre de enfermedad.
2. Una mayor expresión de CCL27 en el epitelio supratumoral se asocia con un mayor tiempo libre de enfermedad.
  3. El resto de variables independientes no clásicas incluidas en nuestro estudio no mostraron asociaciones estadísticamente significativas para progresión de la enfermedad. Sí lo hicieron las variables clásicas Breslow, presencia de ulceración, tamaño de la úlcera, satelitosis, tipo histológico nodular, Clark, crecimiento radial, crecimiento vertical y edad.

VARIABLE	p
Porcentaje CD20	0,024
CCL27 epitelio supratumoral	0,004
CD20	0,393
CD3	0,897
CD4	0,425
CD8	0,501
CD25	0,143
CD134	0,163
FOXP3	0,747
CD56	0,918
CCL27 (LIN)	0,098
CCL27 (TUM)	0,130
CCL27 (EP)	0,314
CCL27 (PF)	0,289

**- Estudio univariante (regresión de Cox) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el tiempo de supervivencia para melanoma (medido en meses):**

Se efectuó el estudio de todas las variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

1. Un mayor porcentaje de linfocitos CD20 (variable CD20%) se asocia a un menor tiempo de supervivencia para melanoma.
2. Una mayor expresión de CCL27 en el epitelio supratumoral se asocia a un mayor tiempo de

supervivencia para melanoma.

3. El resto de variables independientes no clásicas incluidas en nuestro estudio no mostraron asociaciones estadísticamente significativas para progresión de la enfermedad. Sí lo hicieron las variables clásicas Breslow, presencia de ulceración, tamaño de la úlcera, número de mitosis, Clark, satelitosis, crecimiento radial y crecimiento vertical.

VARIABLE	p
Porcentaje CD20	0,015
CCL27 epitelio supratumoral	0,009
CD20	0,465
CD3	0,512
CD4	0,267
CD8	0,225
CD25	0,491
CD134	0,420
FOXP3	0,971
CD56	0,925
CCL27 (LIN)	0,416
CCL27 (TUM)	0,117
CCL27 (EP)	0,238
CCL27 (PF)	0,129

**- Estudio multivariante (regresión logística) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la progresión del melanoma:**

Se efectuó el estudio combinando las diferentes variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

Crecimiento vertical.

CCL27 en epitelio supratumoral combinado con crecimiento vertical.

VARIABLE	p
Crecimiento vertical	0,001
CCL27 epitelio supratumoral asociado a crecimiento vertical	0,007 0,001

**- Estudio multivariante (regresión de Cox) para evaluar el fallecimiento por melanoma:**

Se efectuó el estudio combinando las diferentes variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

Crecimiento vertical.

CCL27 supratumoral combinado con fase de crecimiento vertical.

VARIABLE	p
Crecimiento vertical	0,004
CCL27 epitelio supratumoral asociado a crecimiento vertical	0,016 0,002

**- Estudio multivariante (regresión de Cox) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la progresión de melanoma en el tiempo (medido en meses):**

Se efectuó el estudio combinando las diferentes variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

Diámetro de la úlcera.

CCL27 en el epitelio supratumoral y tamaño de la úlcera.

VARIABLE	p
Diámetro úlcera	0,001
CCL27 epitelio supratumoral asociado a tamaño de la úlcera	0,005  0,001

**- Estudio multivariante (regresión de Cox) para evaluar asociación de los distintos parámetros estudiados con el tiempo de supervivencia para melanoma (medido en meses):**

Se efectuó el estudio combinando las diferentes variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

Tamaño de la úlcera.

CCL27 en el epitelio supratumoral y tamaño de la úlcera.

VARIABLE	P
Tamaño de la úlcera	0,001
CCL27 epitelio supratumoral asociado a tamaño de la úlcera	0,005  0,001

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el desarrollo de recidiva local de melanoma:**

Se efectuó el estudio de todas las variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

1. Una mayor presencia de linfocitos CD25+ se asocia a menor recidiva local.
2. Un mayor porcentaje de linfocitos CD20 (variable CD20%) se asocia a mayor recidiva de melanoma.
3. Una mayor expresión de CCL27 en el epitelio supratumoral se asocia con una menor

recidiva de melanoma.

4. El resto de variables independientes no clásicas incluidas en nuestro estudio no mostraron asociaciones estadísticamente significativas para progresión de la enfermedad. Sí lo hicieron las variables clásicas Breslow y Clark.

VARIABLE	P
CD25	0,005
Porcentaje CD20	0,021
CCL27 epitelio supratumoral	0,002
CD20	0,647
CD3	0,070
CD4	0,318
CD8	0,112
CD134	0,519
FOXP3	0,095
CD56	0,896
CCL27 (LIN)	0,095
CCL27 (TUM)	0,127
CCL27 (EP)	0,143
CCL27 (PF)	0,297

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el desarrollo de metástasis ganglionar por melanoma:**

Se efectuó el estudio de todas las variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

1. Un mayor porcentaje de linfocitos CD20 (variable CD20%) se asocia al desarrollo de metástasis ganglionar por melanoma.
2. El resto de variables independientes no clásicas incluidas en nuestro estudio no mostraron asociaciones estadísticamente significativas para progresión de la enfermedad. Sí lo hicieron las variables clásicas Breslow, presencia de ulceración, tamaño de la úlcera, número de

mitosis, Clark y crecimiento vertical.

VARIABLE	P
Porcentaje CD20	0,033
CD20	0,091
CD3	0,646
CD4	0,608
CD8	0,930
CD25	0,323
CD134	0,446
FOXP3	0,423
CD56	0,273
CCL27 (LIN)	0,357
CCL27 (TUM)	0,882
CCL27 EPITELIO SUPRATUMORAL (ES)	0,132
CCL27 (EP)	0,957
CCL27 (PF)	0,944

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el desarrollo de metástasis a distancia por melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas. Por el contrario sí lo hicieron las variables clásicas Breslow, presencia de ulceración, tamaño de la úlcera, número de mitosis, Clark y crecimiento vertical.

### **3.1.5- Estudio estadístico de casos de melanomas gruesos (Breslow mayor o igual a 1mm):**

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la progresión de melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la mortalidad por melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

**- Estudio univariante (regresión Cox) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la progresión de melanoma en el tiempo (medido en meses):**

Se efectuó el estudio de todas las variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

1. Un mayor porcentaje de linfocitos CD20 (variable CD20%) se asocia a una progresión más rápida del melanoma.
2. Una mayor expresión de CCL27 en la masa tumoral se asocia a una progresión más lenta del melanoma.
3. Una mayor expresión de CCL27 en el epitelio supratumoral se asocia a una progresión más lenta del melanoma.
4. El resto de variables independientes no clásicas incluidas en nuestro estudio no mostraron asociaciones estadísticamente significativas para progresión de la enfermedad.

VARIABLE	p
Porcentaje CD20	0,019
CCL27 epitelio supratumoral	0,004
CCL27 en masa tumoral	0,043
CD20	0,686
CD3	0,363

CD4	0,205
CD8	0,074
CD25	0,084
CD134	0,688
FOXP3	0,290
CD56	0,753
CCL27 (LIN)	0,135
CCL27 (EP)	0,285
CCL27 (PF)	0,558

**- Estudio univariante (regresión de Cox) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el tiempo de supervivencia para melanoma (medido en meses):**

Se efectuó el estudio de todas las variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

1. Una mayor cantidad de linfocitos TCD8+ se asocia a un mayor tiempo de supervivencia rozando la significatividad estadística.
2. Un mayor porcentaje de linfocitos CD20 (variable CD20%) se asocia a menor tiempo de supervivencia para melanoma.
3. Una mayor expresión de CCL27 en el epitelio supratumoral se asocia a mayor tiempo de supervivencia para melanoma.
4. El resto de variables independientes no clásicas incluidas en nuestro estudio no mostraron asociaciones estadísticamente significativas para progresión de la enfermedad.

VARIABLE	p
Porcentaje CD20	0,02
CCL27 epitelio supratumoral	0,015
Mayor presencia de TCD8	0,055
CD20	0,761
CD3	0,300

CD4	0,084
CD25	0,400
CD134	0,862
FOXP3	0,505
CD56	0,995
CCL27 (LIN)	0,728
CCL27 (TUM)	0,063
CCL27 (EP)	0,202
CCL27 (PF)	0,253

**- Estudio multivariante (regresión logística) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la progresión del melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

**- Estudio multivariante (regresión de Cox) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la mortalidad por melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

**- Estudio multivariante (regresión de Cox) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la progresión de melanoma en el tiempo (medido en meses):**

Se efectuó el estudio combinando las diferentes variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

CCL27 en epitelio supratumoral.

CCL27 en el epitelio supratumoral combinado con el tamaño de la úlcera.

VARIABLE	P
CCL27 epitelio supratumoral	0,004
CCL27 epitelio supratumoral asociado a tamaño de la úlcera	0,007 0,049

**- Estudio multivariante (regresión de Cox) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el tiempo de supervivencia para melanoma (medido en meses):**

Se efectuó el estudio combinando las diferentes variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

CCL27 en epitelio supratumoral.

CCL27 supratumoral combinado con tamaño de la úlcera.

VARIABLE	P
CCL27 epitelio supratumoral	0,015
CCL27 epitelio supratumoral asociado a tamaño de la úlcera	0,013 0,028

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el desarrollo de recidiva local de melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el desarrollo de metástasis ganglionar por melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el desarrollo de metástasis a distancia por melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

### **3.1.6- Estudio estadístico de casos de melanomas delgados (Breslow menor de 1mm):**

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la progresión de melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el fallecimiento por melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

**- Estudio univariante (regresión Cox) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la progresión de melanoma en el tiempo (medido en meses):**

Se efectuó el estudio de todas las variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

1. Una mayor expresión de CCL27 en el epitelio supratumoral se asocia a una progresión más lenta para melanoma.
2. No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

VARIABLE	p
CCL27 epitelio supratumoral	0,035
CD20	0,508
CD3	0,884
CD4	0,716
CD8	0,814
CD25	0,387
CD134	0,319
FOXP3	0,794
CD20%	0,791
CD56	0,633
CCL27 (LIN)	0,105
CCL27 (TUM)	0,175
CCL27 (EP)	0,123
CCL27 (PF)	0,133

**- Estudio univariante (regresión de Cox) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el tiempo de supervivencia para melanoma (medido en meses):**

Se efectuó el estudio de todas las variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

1. Una mayor expresión de CCL27 en la masa tumoral se asocia a mayor tiempo de supervivencia para melanoma.
2. Una mayor expresión de CCL27 en el epitelio supratumoral se asocia a mayor tiempo de supervivencia próximo a la significatividad estadística.
3. No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

VARIABLE	p
CCL27 masa tumoral	0,049
CCL27 epitelio supratumoral	0,087
CD20	0,459
CD3	0,543
CD4	0,230
CD8	0,393
CD25	0,819
CD134	0,904
FOXP3	0,417
CD20%	0,527
CD56	0,615
CCL27 (LIN)	0,063
CCL27 (EP)	0,155
CCL27 (PF)	0,335

**- Estudio multivariante (regresión logística) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la progresión del melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

**- Estudio multivariante (regresión de Cox) para evaluar la asociación de los distintos**

**parámetros estudiados con el fallecimiento por melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

**- Estudio multivariante (regresión de Cox) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con la progresión de melanoma en el tiempo (medido en meses):**

Se efectuó el estudio combinando las diferentes variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

CCL27 en epitelio supratumoral.

VARIABLE	p
CCL27 epitelio supratumoral	0,035

**- Estudio multivariante (regresión de Cox) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el tiempo de supervivencia para melanoma (medido en meses):**

Se efectuó el estudio combinando las diferentes variables independientes clínicas e histológicas, obteniéndose los siguientes resultados destacables:

CCL27 en espesor del tumor.

CCL27 en espesor del tumor combinado con FOXP3 en linfocitos, ninguno de ellos con resultado estadísticamente significativo.

VARIABLE	p
CCL27 masa tumoral	0,049
CCL27 masa tumoral asociado a FOXP3 en linfocitos	0,082 0,117

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el desarrollo de recidiva local de melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el desarrollo de metástasis ganglionar por melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

**- Estudio univariante (Mann-Whitney) para evaluar la asociación de los distintos parámetros estudiados con el desarrollo de metástasis a distancia por melanoma:**

No se observó relación estadísticamente significativa para las variables no clásicas.

### **3.1.7- Funciones de supervivencia de Kaplan-Meier:**

Las curvas de supervivencia nos revelan resultados destacables para las variables CCL27 supratumoral y CD20%, tanto en tiempo de supervivencia como en tiempo de progresión.

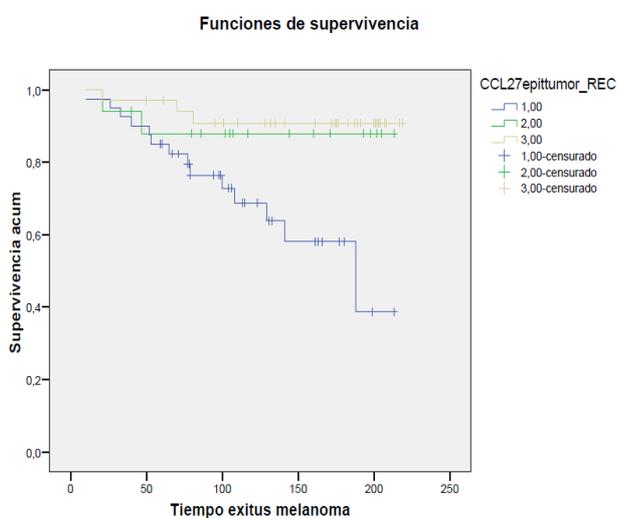
Para dichos parámetros se han establecidos los siguientes grupos:

- **CCL27 en epitelio supratumoral:**

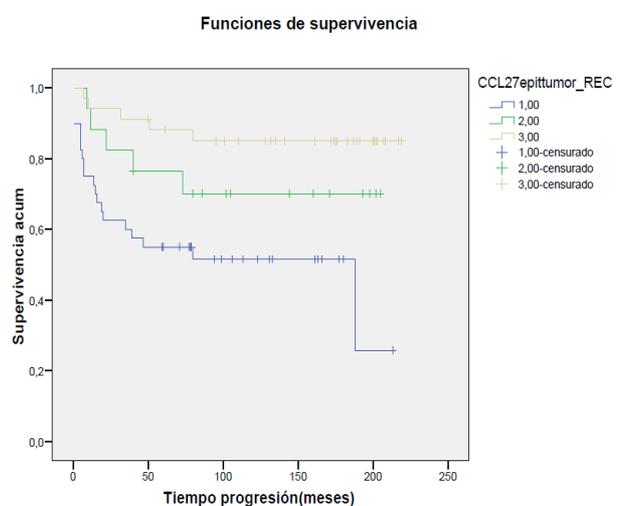
- 1: CCL27 con valores entre 0-99
- 2: CCL27 con valores entre 100-199
- 3: CCL27 con valores entre 200-300

- **CD20 (%)**

- 1: Valores comprendidos entre 0-5%
- 2: Valores comprendidos entre 5,01-15%
- 3: Valores mayores a 15%

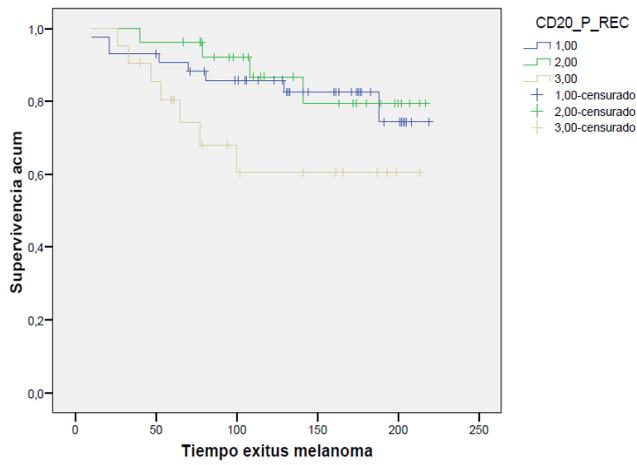


Población total  
P = 0,005



Población total  
P = 0,002

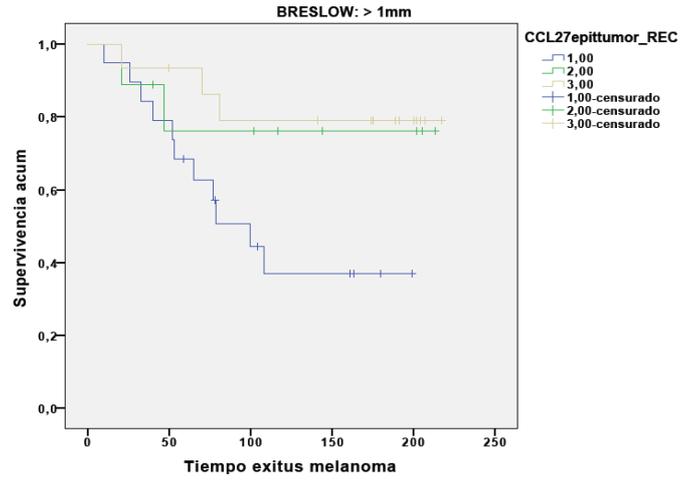
Funciones de supervivencia



Población total

P = 0,120

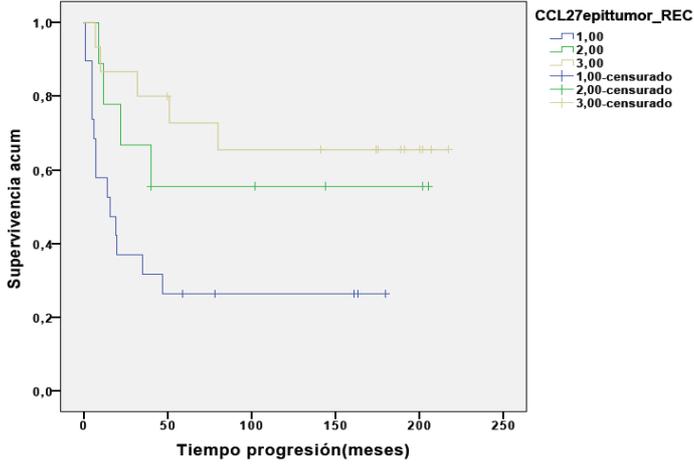
Funciones de supervivencia



Población: Breslow > 1 mm

P = 0,049

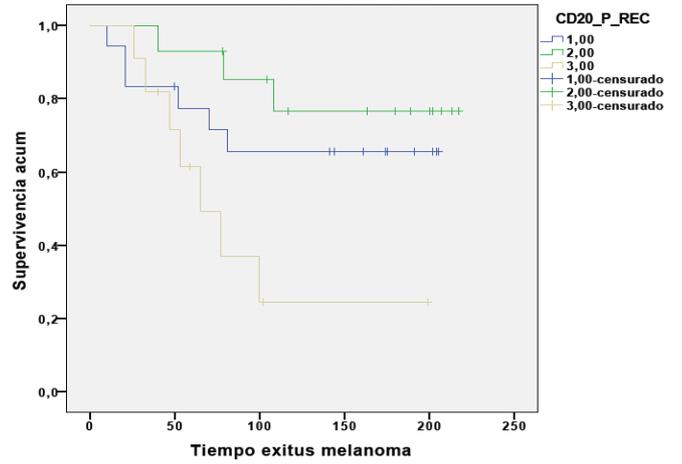
Funciones de supervivencia  
BRESLOW: > 1mm



Población: Breslow > 1 mm

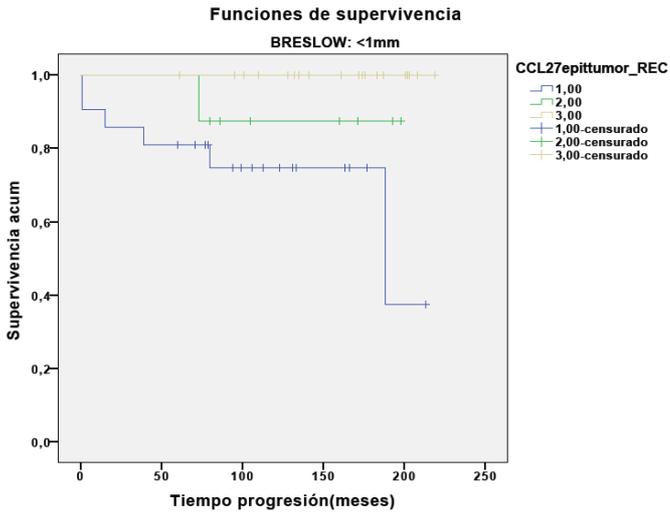
P = 0,013

Funciones de supervivencia  
BRESLOW: > 1mm



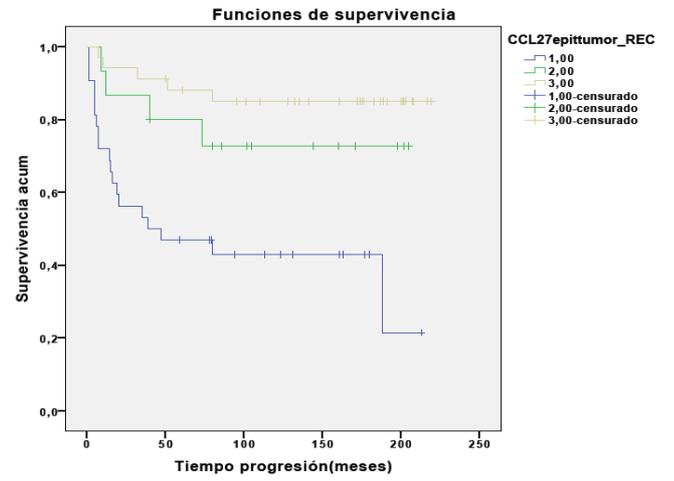
Población : Breslow > 1 mm

P = 0,026



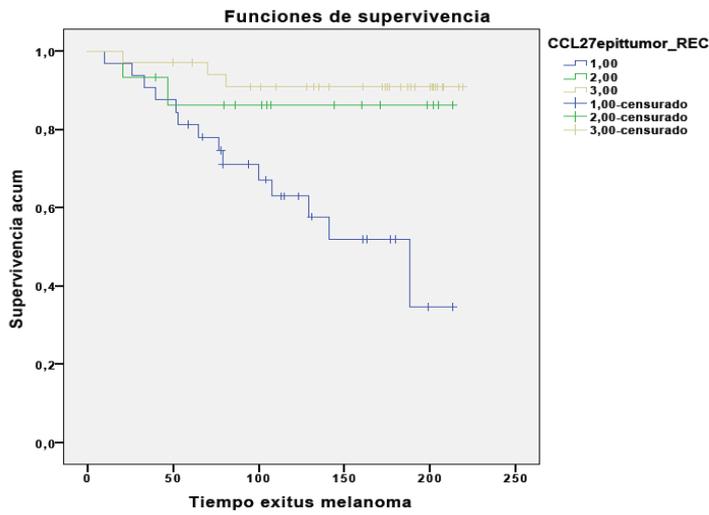
Población: Breslow < 1mm

P = 0,021



Población eliminando tipo histol. 2

P = 0,0005



Población eliminando tipo histol. 2

P = 0,001

### **3.2- DESARROLLO ARGUMENTAL**

El valor pronóstico de la cuantificación global de los infiltrados linfocitarios en el melanoma cutáneo primario ha sido analizado previamente con resultados muy diversos. En la tabla expuesta a continuación se resumen los principales estudios de este tipo realizados hasta la fecha, con los resultados más relevantes:

Autores	Resultados	Conclusiones
Clark et al. (1969 <sup>120</sup> )	Destacan la presencia de infiltrados linfocitarios en el melanoma cutáneo primario.	
Day et al. (1981 <sup>124</sup> )	Evalúan la presencia y el número de TIL	A mayor número de TIL, mejor pronóstico
Clark et al. (1989 <sup>121</sup> )	Clasifican los TIL en: ausente / no abundante / abundante	Valor pronóstico en fase vertical, pero no en fase radial
Clemente et al. (1996 <sup>122</sup> )	Observan el impacto de los TIL en melanomas con grosores comprendidos entre 1,7 y 6 mm	A mayor infiltrado linfocitario, mejor pronóstico. El significado pronóstico se pierde con grosores >6 mm
Taylor et al. (2007 <sup>205</sup> )	Analizan la relación entre el número de TIL y la positividad del ganglio centinela	Negatividad de ganglio centinela a mayor número de TIL. No se observa relación con supervivencia
Azimi et al. (2012 <sup>207</sup> )	Estudian la relación entre número de TIL con supervivencia y positividad del ganglio centinela	Pacientes con TIL grado 3 poseen mejor pronóstico.

En nuestro estudio se ha efectuado la cuantificación del número total de linfocitos, medidos en el área de 1 mm<sup>2</sup> con mayor infiltración linfocitaria para cada lesión, sin haber mostrado significado pronóstico. En cuanto a la cuantificación por separado de los TIL intratumorales y peritumorales, no mostró tampoco resultados significativos en relación con el pronóstico.

La cuantificación global de los TIL en los melanomas delgados (<1mm) en los gruesos (>1mm), y en relación con las fases de crecimiento radial y vertical tampoco mostró valor pronóstico significativo, ni en el estudio univariante ni en el multivariante.

### **3.2.1- TIPIFICACION DEL INFILTRADO LINFOCITARIO**

No sólo el número y la disposición de los TIL ha sido objeto de estudio anteriormente. Algunos autores han analizado las distintas subpoblaciones de linfocitos presentes en el infiltrado linfocitario tumoral, con el objetivo de comprobar si, para lesiones similares, algún tipo particular de población linfocitaria pudiera influir en el diferente comportamiento clínico de éstas. En la mayoría de estudios previos se observa un predominio de linfocitos T sobre linfocitos B,<sup>147,148,149</sup> siendo escasos los estudios con predominio de los linfocitos B.<sup>177,184,185,186</sup> Del mismo modo, los linfocitos T han sido estudiados dividiéndolos en CD4 y CD8, observándose en los estudios anteriores un predominio de la población de linfocitos CD8 citotóxicos respecto a los CD4.<sup>165,166,167,168</sup>

Nuestro estudio valoró la cantidad de linfocitos T y B en el área de 1 mm<sup>2</sup> con mayor concentración de TIL. Asimismo se determinó el porcentaje de linfocitos B y de linfocitos T sobre el total de TIL de la lesión. Los linfocitos T fueron subclasificados en CD4 y CD8.

El estudio del número total de linfocitos T y B en un área determinada evidenció un predominio de linfocitos T, y dentro de estos, del subgrupo CD8. La valoración estadística no nos proporcionó ninguna correlación significativa en relación con el pronóstico.

No obstante, al considerar el porcentaje de linfocitos B sobre el total de linfocitos, pudimos apreciar una evidente repercusión, tanto en lo referente a la supervivencia como a la progresión de la enfermedad. Así, aquellos pacientes cuyo porcentaje de TIL CD20+ era mayor, presentaban un peor pronóstico que los pacientes cuyo porcentaje de TIL CD20+ era menor. Las curvas de supervivencia mostraron resultados que indican un menor tiempo de supervivencia al aumentar el porcentaje de TIL CD20.

Estos datos orientan hacia la importancia, no tanto del número total de linfocitos, sino del porcentaje total de linfocitos CD20+. Dicho resultado podría deberse, bien a la incapacidad de acción citotóxica por parte de los linfocitos B (a diferencia de los T CD8), o bien a una inhibición de la respuesta inmune por parte de los linfocitos CD20+.

En función de nuestros resultados, un mayor número de linfocitos T no mejoraría el pronóstico de los pacientes con melanoma primario cutáneo. Sin embargo, un mayor porcentaje de linfocitos B respecto del total de los TIL sí conllevaría un peor pronóstico.

### **3.2.2- ACTIVACIÓN LINFOCITARIA**

Pese a tener un importante infiltrado linfocitario, muchos casos de melanoma cutáneo progresan hacia una enfermedad letal. Las células tumorales son células autólogas y su inmunogenicidad es débil cuando se la compara con los antígenos que provienen del exterior. Además, las células tumorales secretan factores solubles que inducen fallos en la respuesta del huésped, produciendo la tolerancia a las mismas. Estos datos han propiciado estudios, con resultados similares a los nuestros, que propugnan que la detección de TIL por sí misma puede no ser un marcador sensible de respuesta inmune y, por contra, el estado de su activación sí podría serlo.<sup>116</sup> Entre los factores de activación estudiados anteriormente, destacan CD25 y CD134.<sup>195,196,197,198,199</sup>

Diversos estudios han demostrado que la densidad del infiltrado linfocitario que expresan estas moléculas tiene un impacto significativo en la supervivencia de los pacientes.<sup>195,196,197,199</sup> Pacientes con elevada densidad peritumoral de linfocitos CD25+ o CD134+ poseen mayor supervivencia al compararlos con los que poseen menor número de este tipo de células. La importancia para CD25 es significativa solamente en pacientes con un grosor de melanoma mayor de 1mm.<sup>199</sup>

Nuestros resultados no mostraron valor pronóstico significativo para ninguno de los dos marcadores de actividad linfocitaria empleados, ni en términos de progresión de la enfermedad ni de supervivencia, tanto en el estudio univariante como en el multivariante.

### **3.2.3- LINFOCITOS REGULADORES**

No solamente el estado de activación linfocitario es importante. Asimismo, podemos encontrar factores en el microambiente tumoral que pueden restringir la intensidad y magnitud de las reacciones citotóxicas en el huésped. Entre ellas destaca una pequeña población de células T reguladoras (Tregs) que transcriben el factor FoxP3.<sup>215,216,217,218,219</sup>

Característicamente, los Tregs son un tipo de linfocitos CD4+ que expresan CD25 y FoxP3, considerándose éste último el marcador más apropiado para definir a las células Tregs.

Se ha observado que el número de Tregs se encuentra claramente elevado en sangre periférica de pacientes con cáncer. Ello implica que las células neoplásicas escapen de las funciones de las células T efectoras, o bien que las propias células T efectoras sean incapaces de ser estimuladas por el antígeno o por su función, permaneciendo en un estado de anergia.<sup>160,238,239</sup> Las células y el estroma tumorales desarrollan vías para, de forma directa o indirecta, causar anergia en las células T efectoras, observándose con frecuencia células T CD4+ y CD25+ en tales circunstancias.<sup>237,241</sup>

Se ha observado que, en el melanoma cutáneo, los pacientes con enfermedad metastásica poseen mayores cantidades de células Tregs comparadas con controles normales.<sup>243</sup> Sin embargo, las células CD25+ FoxP3+, que se encuentran presentes en todo el espectro de lesiones melanocíticas, son menos numerosas o casi indetectables en los nevos melanocíticos.<sup>244</sup>

Aunque, en ratones, FOXP3 está únicamente asociado a regulación, en humanos se cree que está siempre asociada con la capacidad supresora de las células T. Por lo tanto, en humanos, la caracterización de las células Tregs necesita de la combinación de anticuerpos frente a CD25+ y a FOXP3+.<sup>245</sup>

Las células T reguladoras FoxP3+ inhiben a las células específicas CD8+ y limitan el efecto de la función de las células NK y NKT.<sup>259,260</sup> La importancia clínica de las células Tregs que suprimen inmunidad se ilustra por la corta supervivencia de pacientes con abundantes FoxP3+ intratumorales. Los pacientes con ricos infiltrados CD8+ deficientes en FoxP3+ poseen mejor supervivencia y comportamiento con la terapia oncológica.<sup>237</sup>

Aunque CD25 está fuertemente expresado de manera constitutiva en los Tregs, la posibilidad de identificación de CD4+CD25+ ha sido descartada por algunos autores puesto que las células T recientemente activadas también expresan CD25. No obstante, gran cantidad de estudios han empleado estos parámetros para la identificación de Tregs.<sup>274</sup>

La designación de Treg se otorga idealmente a la fracción de células T CD4+ que poseen actividad supresora sobre la activación y proliferación de otros linfocitos, aunque la actividad supresora en sí misma no pueda ser directamente medida en cada Treg por métodos convencionales. De este modo, para efectos prácticos, FoxP3 ha sido extensamente empleado en numerosos estudios para

identificar Tregs, ya que los Tregs expresan mayor cantidad de este factor de transcripción que otras células T.

Basada en la expresión de FoxP3, se ha documentado un aumento de Tregs en varios tipos de cáncer, incluyendo el melanoma cutáneo avanzado.<sup>275</sup> No obstante, gran cantidad de estudios recientes sugieren que FoxP3 está también expresado en células T activadas y no reguladoras de humanos y que FoxP3 puede no sólo ser un marcador absoluto de Tregs inmunosupresores, lo que cuestiona la interpretación de estudios previos.<sup>276,277,278</sup>

Una posible solución a este problema es analizar las subpoblaciones de FoxP3. Miyara et al han propuesto recientemente una clasificación para las células T FoxP3+, atendiendo a 3 grupos, funcional y fenotípicamente distintos, basados en la expresión de FoxP3, CD45RO y CD45RA.<sup>279</sup>

Otro factor destacable en la disparidad de resultados de los diferentes estudios efectuados es la gran variabilidad observada con el uso de los diferentes clones de anticuerpo FOXP3 empleado, habiéndose mostrado como más fiable el clon 236A/E7.<sup>275</sup>

Por ello, nuestro estudio fue efectuado empleando este clon 236A/E7 (ab20034), Los resultados obtenidos, no mostraron valores estadísticamente significativos para la evaluación de la expresión de FOXP3 en linfocitos, ni en relación con el pronóstico ni con la progresión tumoral, y ello tanto en el estudio univariante como en el multivariante.

Los resultados obtenidos en nuestro estudio, junto a los observados en estudios anteriores, podrían deberse a la inespecificidad de los marcadores inmunohistoquímicos CD25 y FOXP3, observados tanto en linfocitos activados como en linfocitos reguladores, y no sólo presentes en linfocitos reguladores, como puede observarse en el estudio de Miyara et al.<sup>279</sup> Por lo tanto, no podemos asegurar que las células que expresan las tinciones inmunohistoquímicas CD25 y/o FOXP3 sean células activadas, células inhibitoras o una mezcla de ambas poblaciones.

### **3.2.4- CITOCINAS**

Se ha sugerido que la expresión de quimiocinas y receptores de quimiocinas por las células del melanoma puede estar involucrada en la capacidad del tumor para evadir la respuesta inmune.<sup>288</sup> También están involucradas en la transformación celular neoplásica, el crecimiento, invasión y metástasis a distancia y en la respuesta antitumoral del huésped.<sup>288,292</sup>

Se ha propuesto que la migración de células tumorales a órganos específicos puede estar determinada por los receptores celulares de quimiocinas y por las quimiocinas expresadas en los órganos diana.<sup>288,292,293,294,295</sup> La comprensión de los mecanismos moleculares que permiten la progresión tumoral en el melanoma es un paso esencial que puede permitir, en última instancia, no sólo predecir, sino intervenir de forma terapéutica para evitar dicho proceso.<sup>296</sup>

Debido a que las células cancerosas son, en sí mismas, células que han eludido los mecanismos normales de regulación homeostática, así como las características específicas del tejido, es conocido que la infiltración de gran cantidad de células efectoras dentro del tumor es difícil.<sup>297,298,299,300</sup> Los intentos para conseguir alcanzar una activación de células inmunes sugieren obstáculos presentes en el sitio del tumor, y que esta activación puede ser iniciada proveyendo de citocinas pro-inflamatorias en el microambiente tumoral. Existen algunas evidencias que indican que la presencia de linfocitos infiltrando el tumor representan un signo favorable.<sup>112</sup> Y para ello debe existir una gran cantidad de TIL, como células T y NK. Las quimiocinas muestran actividad quimiotáctica para varios tipos de células inmunes. Pero algunos tipos de tumores muestran unos niveles de expresión de quimiocinas menores que los de las células normales. Por todo ello, las quimiocinas actúan como importantes adyuvantes en el reclutamiento de tipos de leucocitos en el sitio del tumor, potenciando la efectividad de la inmunidad antitumoral.<sup>303</sup> Las células metastásicas migran a sitios específicos atraídas por quimiocinas, lo que explica que ciertos cánceres produzcan metástasis en ciertos órganos predilectos.<sup>304</sup>

En los últimos años se ha observado que la quimiocina asociada a la piel, CCL27, se expresa en queratinocitos epidérmicos e interviene en el reclutamiento de las células T memoria.<sup>311,312,313,314</sup> Se ha propuesto la participación en los procesos de diseminación metastásica del receptor CCR10, cuyo ligando, CCL27, se expresa predominantemente en las células basales de la epidermis.<sup>288</sup>

Pero, aunque juegan un papel importante, la relevancia de las quimiocinas en la inmunidad antitumoral es limitada. Se demuestra que los tumores cutáneos humanos evaden la respuesta antitumoral inmune mediada por células T regulando a la baja la expresión de la quimiocina CCL27, a través de la activación de EGFR y Ras.<sup>316</sup> Así, se ha descrito la pérdida de expresión de CCL27 durante la carcinogénesis cutánea.<sup>316</sup> El análisis inmunohistoquímico de pieles sanas y muestras obtenidas de queratosis actínicas mostró que CCL27 está abundantemente expresada en la

piel normal, pero disminuye marcadamente en pieles con queratosis actínica y se produce una pérdida progresiva de CCL27 durante el proceso de carcinogénesis cutánea.<sup>316</sup>

Por el contrario, se ha demostrado recientemente que la sobreexpresión de CCL27 en células de melanoma, reduce el crecimiento del tumor, debido al reclutamiento y la acumulación de células T o NK, que da lugar a un incremento de la respuesta inmune.<sup>318</sup>

En los nevos melanocíticos, la expresión de CCL27 está ausente o es débil. La capacidad para internalizar la quimiocina CCL27 puede ser una característica de la célula melanocítica maligna, ya que se ha observado dicha expresión en melanomas y no en lesiones melanocíticas benignas. Algunos estudios han mostrado que los casos con positividad para CCL27 tienden a tener menor densidad de células CD3+ CD8+ comparados con los casos que no expresan CCL27, sugiriendo que CCL27 puede hacer a las células del melanoma menos susceptibles a la respuesta antitumoral del huésped, lo que implica que, contrariamente a lo observado en otros estudios, la coexpresión de CCR10 y CCL27 por células neoplásicas pueda ir ligada a un peor pronóstico en pacientes con melanoma.<sup>312,320</sup>

La quimiocina CCL27 puede ser expresada a nivel cutáneo tanto por las células de melanoma como por células epidérmicas y linfocitos. En nuestro estudio procedimos a examinar las tres variables, tanto de manera independiente como asociada. Efectuando la observación microscópica de los casos, pudimos observar que el marcaje de las células epidérmicas era variable, diferenciándose tres áreas en la epidermis: el área epidérmica ubicada sobre el tumor, el área epidérmica peritumoral y el área de epidermis más alejada del tumor. Dichas áreas mostraban en algunos casos una clara diferenciación en cuanto a porcentaje de células marcadas, así como la intensidad de la tinción, lo que nos planteó cuantificar y tipificar dichas variables.

El estudio estadístico detectó una alta correlación entre la expresión de CCL27 en la epidermis supratumoral, con una mayor supervivencia a la enfermedad así como con la ausencia de progresión del melanoma. Dichos datos fueron muy evidentes tanto en el estudio univariante como en el multivariante, obteniendo, en nuestro estudio, resultados con mayor significatividad estadística que los parámetros pronósticos más empleados actualmente, y universalmente aceptados, como son el espesor tumoral medido en milímetros (Breslow) y la presencia de ulceración.

No obstante, se observó cierta discordancia en un pequeño grupo de casos respecto al patrón de CCL27 en el epitelio supratumoral y la evolución clínica de los mismos. Dichos casos pertenecían al grupo histológico de melanomas tipo/sobre léntigo maligno. Este hallazgo podría justificarse por la propia naturaleza de estas lesiones. Este subtipo de melanoma se caracteriza por desarrollarse sobre áreas corporales sometidas a periodos prolongados de exposición a las radiaciones solares. Las radiaciones solares producen un daño crónico en la piel, produciéndose, como consecuencia del mismo, la desaparición de la expresión de CCL27 en dicha área cutánea,<sup>316</sup> lo que explicaría la

menor expresión de CCL27 supratumoral en este tipo concreto de lesión. Así pues, es posible que no se trate de una reducción de dicha citocina relacionada con el tumor, sino que sería la propia radiación solar prolongada en el tiempo la que conduciría a la drástica reducción o desaparición de la expresión de CCL27 en la epidermis supratumoral.

Cuando realizamos el estudio estadístico sobre la expresión supratumoral de CCL27 en relación a la evolución clínica, excluyendo los casos pertenecientes al tipo histológico de melanoma tipo/sobre lentigo maligno, la significatividad estadística se vio aumentada, con unos valores de representatividad muy superiores a los mostrados por las variables pronósticas clásicas, y presentando unos resultados muy evidentes en las curvas de supervivencia.

Dado que el estudio inmunohistoquímico de CCL27 y la tipificación de los linfocitos B y T son fácilmente reproducibles en cualquier laboratorio estándar de histopatología o dermatopatología, consideramos importante la confirmación por otros autores de nuestros hallazgos, ya que estas determinaciones podrían aportar una importante información pronóstica en los melanomas primarios, con las consiguientes repercusiones en el manejo de los pacientes e incluso para el posible desarrollo de futuras dianas terapéuticas para el melanoma cutáneo.

## **4- CONCLUSIONES FINALES**



## **CONCLUSIONES:**

De los resultados obtenidos en este estudio se extraen las siguientes conclusiones:

1. Del estudio inmunohistoquímico para tipificar los linfocitos T y estudiar su grado de activación se deduce que, en nuestro estudio, el infiltrado linfocitario T no influye en la mortalidad por melanoma.
2. Un mayor número de linfocitos CD25+ se asocia a una menor recidiva local por melanoma.
3. Un mayor porcentaje de linfocitos CD20 sobre linfocitos CD3 se asocia a mayor progresión de melanoma, así como a un menor intervalo de tiempo libre de enfermedad.
4. Un mayor porcentaje de linfocitos CD20 sobre linfocitos CD3 se asocia a menor tiempo de supervivencia por melanoma.
5. Una mayor expresión de CCL27 en la epidermis supratumoral se asocia a una menor progresión del melanoma, así como a un mayor intervalo de tiempo libre de enfermedad.
6. Una mayor expresión de CCL27 en la epidermis supratumoral se asocia a menor mortalidad, así como a mayor tiempo de supervivencia para melanoma.
7. La expresión de CCL27 en el epitelio supratumoral se muestra como un valor pronóstico muy importante, superando a Breslow y presencia de ulceración, en el estudio realizado.
8. El valor pronóstico de CCL27 en epitelio supratumoral se incrementa al eliminar del estudio el melanoma tipo/sobre léntigo maligno, lo que podría explicarse por la inactivación de CCL27 en este subtipo debida a la lesión solar crónica.



## **9- BIBLIOGRAFÍA**



## **BIBLIOGRAFÍA**

- 1: De Vries E, et al. "Cutaneous malignant melanoma in Europe." *Eur J Cancer* 2004; 40: 2355-2366.
- 2: Laennec RTH. "Sur les melanosos." *Bull Faculté Med Paris* 1812; 1: 23-26.
- 3: Hussein MR, et al. "Genetic pathways to melanoma tumorigenesis." *J Clin Pathol* 2004; 57: 797-801.
- 4: Szabo G, et al. "The number of melanocytes in human epidermis." *Br Med J* 1954; 1: 1016-1017.
- 5: Algazi AP, et al. "Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects". *Cancer Manag Res* 2010; 2: 197-211.
- 6: Nishimura EK, et al. "Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination." *Nature* 2002; 416: 854-860.
- 7: Yu H, et al. "Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles." *Am J Pathol* 2006; 168: 1879-1888.
- 8: Curtin JA, et al. "Distinct sets of genetic alterations in melanoma". *N Engl J Med* 2005; 353: 2135-2147.
- 9: Thompson JF, et al. "Cutaneous melanoma". *Lancet* 2005; 365:687-701.
- 10: Ferlay J, et al. "Globocan 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. 1 ed." IARC Press: Lyon, 2000.
- 11: SEER: SEER Stat Fact Sheets: Melanoma of the skin. Available at: <http://seer.cancer.gov/ststfacts/html/melan.html#incidence-mortality>. Accessed September 1, 2010.
- 12: Mikkilineni R, et al. "Epidemiology, in Sober AJ, Haluska FG (eds): Atlas of clinical oncology: Skin cancer." London, BC Decker 2001; pp 1-15.

- 13: Pubmed. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Accessed September 1, 2010.
- 14: Albert VA, et al. “Years of potential life lost: another indicator of the impact of cutaneous malignant melanoma on society.” *J Am Acad Dermatol* 1990; 23: 308-310.
- 15: Brochez L, et al. “The melanoma burden in Belgium; premature morbidity and mortality make melanoma a considerable health problem.” *Melanoma Res* 1999; 9: 614-618.
- 16: Osterlind A, et al. “Epidemiology on malignant melanoma in Europe.” *Acta Oncol* 1992; 31: 903-908.
- 17: SEER: Table 1. Median age of cancer patients at death, 2002-2007 by primary cancer site, race and sex. Available at:  
[http://seer.cancer.gov/crs/1975\\_2007/results\\_single/sect\\_01\\_table.13\\_2pgs.pfd](http://seer.cancer.gov/crs/1975_2007/results_single/sect_01_table.13_2pgs.pfd). Accessed September 1, 2010.
- 18: El cáncer en España. Fundación científica de la Asociación Española Contra el Cáncer, 2005: 5-21.
- 19: Plan oncológico de la Comunitat Valenciana 2007-2010. Generalitat Valenciana. Consellería de Sanitat, 2007: 33-55.
- 20: Armstrong B. “Epidemiology of cutaneous melanoma and current trends.” In: Thompson JF, Morton DL, Kroon BBR, eds. *Textbook of Melanoma*. London: Martin Dunitz, 2004: 65–80.
- 21: Linos E, et al. “Increasing burden of melanoma in the United States.” *J Invest Dermatol* 2009; 129: 1666-1674.
- 22: Lee JA, et al. “Secular trends in mortality from malignant melanoma.” *J Natl Cancer Inst* 1970; 45: 91-97.
- 23: Magnus K. “Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955-1970. Variations in the time and space and solar radiation.” *Cancer* 1973; 32: 1275-1286.
- 24: Hodi FS et al. “The biologic importance of tumor-infiltrating lymphocytes”. *J Cutan Pathol*

2010; 37: 48-53.

25: Amstrong BK, et al. "How much melanoma is caused by sun exposure?" *Melanoma Res* 1993; 3: 395-401.

26: Gilchrest BA, et al. "The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation." *N Engl J Med* 1999; 340: 1341-1348.

27: Kricger A, et al. "Ambient UV, personal sun exposure and risk of multiple primary melanomas." *Cancer Causes Control* 2007; 18: 295-304.

28: Buckel TB, et al. "Recent tanning bed use: a risk factor for melanoma." *Arch Dermatol* 2006; 142: 485-488.

29: El Ghissassi F, et al. "A review of human carcinogenesis-part D: radiation." *Lancet Oncol* 2009; 10: 701-702.

30: Aitken J, et al. "CDKN2A variants in a population-based sample of Queensland families with melanoma." *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 446-452.

31: Dong J, et al. "BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma." *Cancer Res* 2003; 63: 3883-85.

32: Pollock PM, et al. "High frequency of BRAF mutations in nevi." *Nat Genet* 2003; 33: 19-20.

33: Uribe P, et al. "BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin." *Am J Dermatopathol* 2003; 25: 365-70.

34: Kefford RF, et al. "Counseling and DNA testing for individuals perceived to be genetically predisposed to melanoma: a consensus statement of the melanoma genetics consortium." *J Clin Oncol* 1999; 17(10): 3245-3251.

35: Franceschi S, et al. "Site distribution of different types of skin cancer: new aetiological clues." *Int J Cancer* 1996; 67: 24-28.

- 36: Green A, et al. "A case-control study of melanomas of the soles and palms (Australia and Scotland)." *Cancer Causes Control* 1999; 10: 21-25.
- 37: Pérez Segura P, et al. "Melanoma heredo-familiar." *Rev Cancer* 2011; 4: 166-171.
- 38: Clemente C, et al. "Histopathologic diagnosis of melanoma." Milan: Grafiche Rekord 1998.
- 39: Viros A. et al. "Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features." *PLOS Med* 2008; 5: e120. Doi: 10.1371/journal.pmed.0050120.
- 40: Whiteman DC, et al. "Anatomic site, sun exposure, and risk of cutaneous melanoma." *J Clin Oncol* 2006; 24: 3172-3177.
- 41: Whiteman DC, et al. "Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma." *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 806-812.
- 42: Newton-Bishop JA, et al. "Melanocytic nevi, nevus genes, and melanoma risk in a large case-control study in the United Kingdom." *Cancer Epidemiol* 2010; 19: 2043-2054.
- 43: Whiteman DC, et al. "The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin". *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; 24: 879-897.
- 44: Monteagudo C. "Lesiones precursoras de melanoma maligno: histología del melanoma". *Rev Cancer* 2011; 4: 1-9.
- 45: Garate P, et al. "Nuevos tratamientos para el melanoma: inhibidores de BRAF". *Rev Cancer* 2011; 25: 180-186.
- 46: George E, et al. "Subclassification of desmoplastic melanoma: pure and mixed variants have significantly different capacities for lymph node metastasis". *J Cutan Pathol* 2009; 36: 425-432.
- 47: Scherer D, et al. "Association between the germline MC1R variants and somatic BRAF/NRAS mutations in melanoma tumors." *J Invest Dermatol* 2010; 130: 2844-2848.

- 48: Sauter ER, et al. "Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma." *Cancer Res* 2002; 62: 3200-3206.
- 49: Van Dijk M, et al. "Distinct chromosomal aberrations in sinonasal mucosal melanoma as detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 151-158.
- 50: Muthusamy V, et al. "Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma." *Genes Chromosomes Cancer* 2006; 45: 447-454.
- 51: Udayakumar D, et al. "Genetics determinants of cutaneous melanoma predisposition". *Semin Cutan Med Surg* 2010; 29: 190-195.
- 52: Ko JM, et al. "Pathways to melanoma." *Semin Cutan Med Surg* 2010; 29: 210-217.
- 53: Davies H, et al. "Mutations of the BRAF gene in human cancer." *Nature* 2002; 417: 949-954.
- 54: Viros A, et al. "Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features". *Plos Med* 2008; 5: 941-952.
- 55: Maldonado JL, et al. "Determinants of BRAF mutations in primary melanoma." *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1878-1890.
- 56: Pollock PM, et al. "High frequency of BRAF mutations in nevi." *Nat Genet* 2003; 33: 19-20.
- 57: Beadling C, et al. "KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes." *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6821-6828.
- 58: Curtin JA, et al. "Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma." *J Clin Oncol* 2006; 24: 4340-4346.
- 59: Albino AP, et al. "Transforming Ras genes from human melanoma: a manifestation of tumor heterogeneity?" *Nature* 1984; 308: 69-72.
- 60: Albino AP, et al. "Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype." *Oncogene* 1989; 4: 1363-1374.

- 61: Downward J, et al. "Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 11-22.
- 62: Van Elsas A, et al. "Relevance of ultraviolet-induced N-ras oncogene point mutations in development of primary human cutaneous melanoma." *Am J Pathol* 1996; 149: 883-893.
- 63: Homsy J, et al. "Cutaneous melanoma: Prognostic factors". *Cancer Control* 2005; 4: 223-229.
- 64: Balch MB et al. "Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification". *J Clin Oncol* 2009; 27: 6199-6206.
- 65: Baecher-Allan C, et al. "Regulatory cells and human cancer." *Semin Cancer Biol* 2006; 16: 98-105.
- 66: Balch CM, et al. "A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods." *Ann Surg* 1978; 188: 732-742.
- 67: Balch CM, et al. "An analysis of prognostic factors of 8500 patients with cutaneous melanoma" in "Cutaneous Melanoma." 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, PA: Lippincott 1992; 165-187.
- 68: Fleming ID, et al. "Manual for staging of cancer." 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven 1997; 163-167.
- 69: Balch CM, et al. "A new American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma." *Cancer* 2000; 88: 1484-1491.
- 70: Cook MG, et al. "Identification of histological features associated with metastatic potential in thin (<1.0mm) cutaneous melanoma with metastases. A study on behalf of the EORTC melanoma group". *J Pathol* 2002; 197: 188-193.
- 71: Gimotty PA, et al. "Thin primary cutaneous malignant melanoma: a prognostic tree for 10-year metastasis is more accurate than American Joint Committee on cancer staging". *J Clin Oncol* 2004; 22: 3668-3676.

- 72: Anichini A, et al. "Clonal analysis of cytotoxic T-lymphocyte response to autologous human metastatic melanoma." *Int J Cancer* 1985; 35: 683-689.
- 73: Anichini A, et al. "The paradox of T cell-mediated antitumor immunity in spite of poor clinical outcome in human melanoma". *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53: 855-864.
- 74: Hanna G, et al. "Specific immunotherapy of established visceral micrometastases by BCG-tumor cell vaccine alone or as an adjunct to surgery." *Cancer* 1978; 42: 2613-2625.
- 75: Nestle FO, et al. "Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate-pulsed dendritic cells." *Nat Med* 1998; 4: 328-332.
- 76: Schwartzenuber DM, et al. "gp100 peptide vaccine and interleukine-2 in patients with advanced melanoma." *N Engl J Med* 2011; 364: 2119-2127.
- 77: Morton D, et al. "An international, randomized, phase III trial of bacillus Calmatte-Guerin (BCG) plus allogenic melanoma vaccine (MCV) or placebo after complete resection of melanoma metastatic to regional or distant sites." *J Clin Oncol* 2007; 25(474S):Abstract 8508.
- 78: Berrocal A, et al. "Immunoterapia de la enfermedad avanzada." *Rev Cancer* 2011; 25: 202-209.
- 79: Kirkwood JM, et al. "Comparison of intramuscular and intravenous recombinant alpha-2 interferon in melanoma and other cancers." *Ann Intern Med* 1985; 103: 32-36.
- 80: Taniguchi T, et al. "Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2." *Nature* 1983; 302: 305-310.
- 81: Atkins MB, et al. "High-dose recombinant interleukin-2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993." *J Clin Oncol* 1999; 17: 2105-2116.
- 82: Rosenberg SA, et al. "Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin-2." *JAMA* 1994; 271: 907-913.
- 83: Julia F, et al. "Targeted therapies in metastatic melanoma: toward a clinical breakthrough?"

Anticancer Agents Med Chem 2010; 10: 661-665.

84: Agarwala SS. "Current systemic therapy for metastatic melanoma." *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; 9: 587-595.

85: Tchekmedyian S, et al. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2002; 21 (abstract): 56.

86: Melero I, et al. "Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 95-106.

87: O'Day SJ, et al. "Targeting cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4): a novel strategy for the treatment of melanoma and other malignancies." *Cancer* 2007; 110: 2614-2627.

88: Fong L, et al. "Anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 antibody: the first in an emerging class of immunomodulatory antibodies for cancer treatment." *J Clin Oncol* 2008; 26: 5275-5283

89: Robert C, et al. "What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma?" *Oncologist* 2009; 14: 848-861.

90: Hodi FS, et al. "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." *N Engl J Med* 2010; 363: 711-723.

91: Robert C, et al. "Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma". *N Engl J Med* 2011; 30: 2517-2526.

92: Riquelme A, et al. "Nuevos tratamientos para el melanoma: Ipilimumab." *Rev Cancer* 2011; 25: 210-215.

93: Durda PJ, et al: "Induction of antigen silencing in melanoma by oncostatin M: down-modulation of melanocyte antigen expression." *Mol Cancer Res* 2003; 1: 411-419.

94: Garbe C, et al. "Melanoma epidemiology and trends". *Clin Dermatol* 2009; 27: 3-9.

95: Ilkovich D, et al. "Immune modulation by melanoma-derived factors". *Exp Dermatol* 2008; 17: 977-985.

- 96: Chapman PB, et al. "Improved survival with vemurafemib in melanoma with BRAF V600E mutation". *N Engl J Med* 2011; 30: 2507-2516.
- 97: Balkwill F, et al. "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *Lancet* 2001; 357: 539-545.
- 98: Rollins BJ. "Inflammatory chemokines in cancer growth and progression." *Eur J Cancer* 2006; 42: 760-767.
- 99: Moore OS Jr, et al. "The relative favourable prognosis of medullary carcinoma of the breast." *Cancer* 1949; 2: 635-642.
- 100: Dougan M, et al. "Immune therapy for cancer". *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 83-117.
- 101: Parmiani G. "Tumor-infiltrating T cells- friend or foe of neoplastic cells?" *N Engl J Med* 2005; 2640-2641.
- 102: Vesalinen S, et al. "Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma." *Eur J Cancer* 1994; 30A: 1797-1803.
- 103: Halpern AC, et al. "Prognostic models in melanoma." *Semin Oncol* 1997; 24 (Suppl 4) S2-S7.
- 104: Marrogi AJ, et al. "Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma." *Int J Cancer* 1997; 74: 492-501.
- 105: Chao HT, et al. "Lymphocyte-infiltrated FIGO stage 333 IIB squamous cell carcinoma of the cervix is a prominent factor for disease-free survival." *Eur J Gynaecol* 1998; 20: 136-140.
- 106: Naito Y, et al. "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer." *Cancer Res* 1998; 58: 3491-3494.
- 107: Schumacher K, et al. "Prognostic significance of activated CD8+ T cell infiltrations within esophageal carcinomas." *Cancer Res* 2001; 61: 3932-3936.

- 108: Zhang L, et al. "Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer". *N Engl J Med* 2003; 348: 203-213.
- 109: Cho Y, et al. "CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2003; 63: 1555-1559.
- 110: Shibakita M, et al. "Prognostic significance of Fas and Fas ligand expressions in human esophageal cancer." *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2464-2469.
- 111: Nakano O, et al. "Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity". *Cancer Res* 2001; 61: 5132-5136.
- 112: Gershenwald J E, et al "2010 TNM staging system for cutaneous melanoma... and beyond". *Ann Surg Oncol* 2010; 17: 1475-1477.
- 113: Naito Y, et al. "CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer". *Cancer Res* 1998; 58: 3491-3494.
- 114: Pages F, et al. "Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer". *N Engl J Med* 2005; 353: 2654-2666.
- 115: Galon J, et al. "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome". *Science* 2006; 313: 1960-1964.
- 116: Kuphal S, et al. "Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma". *J Pathol* 2009; 219: 400-409.
- 117: Dieu-Nosjean MC, et al. "Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures". *J Clin Oncol* 2008; 26: 4410-4417.
- 118: Dave SS, et al. "Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor infiltrating immune cells". *N Engl J Med* 2004; 351: 2159-2169.
- 119: Shibakita M, et al. "Prognostic significance of Fas and Fas ligand expressions in human

esophageal cancer.” *Clin Cancer Res* 1999; 5: 2464-2469.

120: Clark WH Jr, et al. “The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin”. *Cancer Res* 1969; 29: 705-727.

121: Clark WH Jr, et al. “Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression”. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1893-1904.

122: Clemente C, et al. “Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma”. *Cancer* 1996; 77: 1303-1310.

123: Okada N, et al. “Anti-tumor activity of chemokine is affected by both kinds of tumors and the activation state of the host's immune system: implications for chemokine-based cancer immunotherapy”. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317: 68-76.

124: Day CL Jr, et al. “A prognosis model for clinical stage I melanoma of the upper extremity. The importance of anatomic subsites in predicting recurrent disease.” *Ann Surg* 1981; 193: 436-440.

125: Tuthill RJ, et al. “Southwest Oncology Group. Risk assesment in localized primary cutaneous melanoma: a Southwest Oncology Group study evaluating nine factors and a test of the Clark logistic regression prediction model.” *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 504-511.

126: Elder DE, et al. “The role of lymph node dissection for clinical stage I malignant melanoma of intermediate thickness (1.51-3.99 mm).” *Cancer* 1985; 56: 413-418.

127: Ernstoff MS “Been there, not done that – melanoma in the age of molecular therapy”. *N Engl J Med* 2011; 30: 2547-2548.

128: Müller-Berghaus J, et al. “Melanoma-reactive T cells in the bone marrow of melanoma patients: association with disease stage and disease duration”. *Cancer Res* 2006; 66: 5997-6001.

129: McDermott NC, et al. “Identification of vertical growth phase in malignant melanoma: a study of interobserver agreement.” *Am J Clin Pathol* 1998; 110: 753-757.

130: Busam KJ, et al. “Histologic classification of tumor-infiltrating lymphocytes in primary

cutaneous malignant melanoma". [Am J Clin Pathol](#) 2001; 115: 856-860.

131: Thörn M, et al. "Clinical and histopathologic predictors of survival in patients with malignant melanoma: a population based in study in Sweden." *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 761-769.

132: Masback A, et al. "Prognostic factors in invasive cutaneous melanoma: a population-based study and review." *Melanoma Res* 2001; 11: 435-445.

133: Anastassiou G, et al. "Expression of cell adhesion molecules and tumor infiltrating leucocytes in conjunctival melanoma". *Melanoma Res* 2004; 14: 381-385.

134: Worth AJ, et al. "Pathologic prognostic factors for cutaneous malignant melanoma: the Western Canada Melanoma Study." *Int J Cancer* 1989; 43: 370-375.

135: Drzewiecki KT, et al. "Malignant melanoma. Changing trends in factors influencing metastasis-free survival from 1964 to 1982." *Cancer* 1990; 65: 362-366.

136: Barnhill RL, et al. "Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study." *Cancer* 1996; 78: 427-432.

137: Urban JL, et al. "Tumor antigens." *Annu Rev Immunol* 1992; 10: 617-644.

138: Mackensen A, et al. "Direct evidence to suport the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma." *J Clin Invest* 1994; 93: 1397-1402.

139: Smyth MJ, et al. "A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy." *Nat Immunol* 2001; 2: 293-299.

140: Tada T, et al. "Transforming growth factor-B-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance of immunosuppression in the tumor-bearing state." *J Immunol* 1991; 146: 1077-1082.

141: Ohm JE, et al. "VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency." *Immunol Res* 2001; 23: 263-272.

- 142: Okada N, et al. "Tumor suppressive efficacy through augmentation of tumor-infiltrating immune cells by intratumoral injection of chemokine-expressing adenoviral vector". *Cancer Gene Ther* 2006; 393-405.
- 143: Wiznerowicz M, et al. "Double-copy bicistronic retroviral vector platform for gene therapy and tissue engineering: application to melanoma vaccine development." *Gene Ther* 1997; 4: 1061-1068.
- 144: Aruga A, et al. "Tumor-specific granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma secretion is associated with in vivo therapeutic efficacy of activated tumor draining lymph node cells." *Cancer Immunol Immunother* 1995; 41: 317-324.
- 145: Cole DJ, et al. "Histopathological analysis of metastatic melanoma deposits in patients receiving adoptive immunotherapy with tumor-infiltrating lymphocytes." *Cancer Immunol Immunother* 1994; 38: 299-303.
- 146: Hussein MR, et al. "Immunohistological characterization of tumour infiltrating lymphocytes in melanocytic skin lesions". *J Clin Pathol* 2006; 59: 316-324.
- 147: Fritsch M, et al. "Immunohistologic responses within dermal metastatic melanoma lesions of patients treated with a synthetic peptide vaccine." *J Immunother* 2000; 23: 557-569.
- 148: Barbour AH, et al. "Dendritic cell density and activation status of tumor-infiltrating lymphocytes in metastatic human melanoma: possible implications for sentinel node metastases." *Melanoma Res* 2003; 13: 263-269.
- 149: Hernberg M, et al. "Tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma receiving chemoimmunotherapy." *J Immunother* 1997; 20: 488-495.
- 150: O'Connell J, et al. "The Fas counterattack: cancer as a site of immune privilege." *Immunol Today* 1999; 20: 46-52.
- 151: O'Connell J, et al. "The Fas counterattack: Fas-mediated T cells killing by colon cancer cells expressing Fas ligand." *J Exp Med* 1996; 184: 1075-1082.

- 152: Lurquin C, et al. "Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen." *J Exp Med* 2005; 201: 249-257.
- 153: Bennett MW, et al. "The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma." *J Immunol* 1998; 160: 5669-5675.
- 154: Rabinowich H, et al. "Lymphocyte apoptosis induced by Fas ligand-expressing ovarian carcinoma cells: implications for altered expression of TCR in tumour-associated lymphocytes." *J Clin Invest* 1998; 101: 2579-2588.
- 155: Uzzo RG, et al. "Mechanisms of apoptosis in T cells from patients with renal cell carcinoma." *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1219-1229.
- 156: De Paola F, et al. "Restored T-cell activation mechanisms in human tumour-infiltrating lymphocytes from melanomas and colorectal carcinomas after exposure to interleukin-2." *Br J Cancer* 2003; 88: 320-326.
- 157: Garcia-Lora A, et al. "MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape." *J Cell Physiol* 2003; 195: 346-355.
- 158: Nakagomi H, et al. "Decreased expression of the signal-transducing  $\zeta$  chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma." *Cancer Res* 1993; 53: 5610-5612.
- 159: Sheu BC, et al. "Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma." *Hum Immunol* 1997; 56: 39-48.
- 160: Boon T, et al. "Human T cell responses against melanoma". *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 175-208.
- 161: Deeths MJ, et al. "CD8<sup>+</sup> T cells become nonresponsive (anergic) following activation in the presence of co stimulation." *J Immunol* 1999; 163: 102-110.
- 162: Marzo AL, et al. "Tumor-specific CD4<sup>+</sup> T cells have a major "post-licensing" role in CTL

mediated antitumor immunity.” *J Immunol* 2000; 165: 6047-6055.

163: Lefebvre S, et al. “Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer.” *J Pathol* 2002; 196: 266-274.

164: Llano M, et al. “HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer.” *Eur J Immunol* 1998; 28: 2854-2863.

165: Strohal R, et al. “T-cell receptor repertoire of lymphocytes infiltrating cutaneous melanoma is predominated by V alpha specificities present in T-cells of normal human skin.” *Cancer Res* 1994; 54: 4734-4739.

166: Topolian SL, et al. “Tumor-specific cytolysis by lymphocytes infiltrating human melanomas.” *J Immunol* 1989; 142: 3714-3725.

167: Rosenberg SA, et al. “Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report.” *N Eng J Med* 1988; 319: 1676-1680.

168: Janeway CA, et al. “Immunobiology: The immune system in health and disease. 4<sup>th</sup> ed.” New York (NY): Garland Science 2005.

169: Whiteside TL, et al. “The biology of human natural killer cells.” *Ann Ist Super Sanita* 1990; 26: 335-348.

170: Atzpodien J, et al. “Expansion of peripheral blood natural killers cells correlates with clinical outcome in cancer patients receiving recombinant subcutaneous interleukin-2 and interferon-alpha-2.” *Tumor Biol* 1993; 14: 354-359.

171: Jovic V, et al. “Impaired perforin-dependent NK cells cytotoxicity and proliferative activity of peripheral blood T cells is associated with metastatic melanoma.” *Tumori* 2001; 87: 324-329.

172: Jorkov AS et al. “Immune response in blood and tumor tissue in patients with metastatic

malignant melanoma treated with IL-2, INF alpha and hystamine dihychloride.” *Anticancer Res* 2003; 23: 537-542.

173: Orange JS, et al. “Natural killer cells in human health and disease.” *Clin Immunol* 2006; 118: 1-10.

174: Jørkov AS, et al. “Immune response in blood and tumour tissue in patients with metastatic malignant melanoma treated with IL-2, INF alpha and histamine dihydrochloride.” *Anticancer Res* 2003; 23: 537-542.

175: Azogui O, et al. “Tumor-infiltrating CD3- NK cells are more effective than CD3+ T cells in killing autologous melanoma cells.” *J Invest Dermatol* 1991; 97: 425-429.

176: Moretta A, et al. “A novel surface antigen expressed by a subset of human CD3-CD16+ natural killer cells. Role in cell activation and regulation of cytolytic function.” *J Exp Med* 1990; 171: 695.

177: Chiou SH, et al. “Current concepts of tumor-infiltrating lymphocytes in human malignancies”. *J Reproduct Immunol* 2005; 67: 35-50.

178: Roszkowski JJ, et al. “Simultaneous generation of CD8+ and CD4+ melanoma-reactive T cells by retroviral-mediated transfer of a single T-cell receptor.” *Cancer Res* 2005; 65: 1570-1576.

179: Viguiier M, et al. “Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells.” *J Immunol* 2004; 173: 1444-1453.

180: Zheng SG, et al. “Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10.” *J Immunol* 2004; 172: 5213-5221.

181: Chattopadhyay S, et al. “Regulatory T cells and tumor immunity.” *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 1153-1161.

182: Harlin H, et al. “Tumor progression despite massive influx of activated CD8+ T cells in a patient with malignant melanoma ascites.” *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1185-1197.

- 183: Ito N, et al. "Cytolytic cells induce HMGB1 release from melanoma cell lines". *J Leukocyte Biol* 2007; 81: 75-83.
- 184: Pavoni E, et al. "Tumor-infiltrating B lymphocytes as an efficient source of highly specific immunoglobulins recognizing tumor cells." *BMC Biotechnol* 2007; 7: 70.
- 185: Yeilding NM, et al. "Analysis of two human monoclonal antibodies against melanoma." *Int J Cancer* 1992; 52: 967-973.
- 186: Ralfkiaer E, et al. "Immunohistological analysis of the lymphoid infiltrate in cutaneous malignant melanomas." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1987; 410: 355-361.
- 187: Mortarini R, et al. "Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8+ T cells at tumor site in spite of antitumor immunity to self-antigens in human metastatic melanoma". *Cancer Res* 2003; 63: 2535-2545.
- 188: Sondergaard K, et al. "Survival with primary cutaneous malignant melanoma, evaluated from 2012 cases. A multivariate regression analysis." *Virch Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985; 406: 179-195.
- 189: Steinman L. "A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage". *Nat Med* 2007; 13: 139-145.
- 190: Phan GQ, et al. "Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma". *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8372-8377.
- 191: Larsen TE, et al. "A retrospective histological study of 669 cases of primary cutaneous malignant melanoma in clinical stage I. 3. The relation between the tumor-associated lymphocyte infiltration and age and sex, tumour cell type, pigmentation, cellular atypia, mitotic count, depth of invasion, ulceration, tumour type and prognosis." *Acta Pathol Microbiol Scand* 1978; 86A: 523-530.
- 192: Wang RF, et al. "Recognition of an antigenic peptide derived from tyrosinase-related protein-2

by CTL in the context of HLA-A31 and -A33". *J Immunol* 1998; 160: 890-897.

193: Barnhill RL, et al. "Predicting five-year outcome for patients with cutaneous melanoma in a population-based study. *Cancer* 1996; 78: 427-432.

194: Lepage S, et al. "Melanosomal targeting sequences from gp100 are essential for MCH class II-restricted endogenous epitope presentation and mobilization to endosomal compartments". *Cancer Res* 2006; 66: 2423-2432.

195: Whiteside TL, et al. "Evidence for local and systemic activation of immune cells by peritumoral injections of interleukin-2 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck." *Cancer Res* 1993; 53: 5654-5662.

196: Si Z, et al. "Clinical responses and lymphoid infiltrates in metastatic melanoma following treatment with intralesional GM-CSF." *Melanoma Res* 1996; 6: 247-255.

197: Maxwell-Armstrong et al. "Increased activation of lymphocytes infiltrating primary colorectal cancers following immunizations with the anti-idiotypic monoclonal antibody 105AD7." *Gut* 1999; 45: 593-598.

198: Weinberg A, et al. "OX-40: life beyond the effector T-cell stage." *Semin Immunol* 1998; 10: 471-480.

199: Ladányi A, et al. "T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma". *Clin Cancer Res* 2004; 10: 521-530.

200: Prlic M et al. "An antibody paradox, resolved". *Science* 2006; 311: 1875-1876.

201: Mihm MC Jr, et al. "Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response." *Lab Invest* 1996; 74: 43-47.

202: Lugini L, et al. "Cannibalism of live lymphocytes by human metastatic but not primary melanoma cells". *Cancer Res* 2006; 66: 3629-3638.

- 203: Zippelius A, et al. "Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance". *Cancer Res* 2004; 64: 2865-2873.
- 204: Somasundarem R, et al: "Human leukocyte antigen-A2-restricted CTL responses to mutated BRAF peptides in melanoma patients" *Cancer Res* 2006; 66: 3287-3293.
- 205: Taylor RC, et al. "Tumor-infiltrating lymphocytes predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma." *J Clin Oncol* 2007; 25: 869-875.
- 206: Balch CM, et al. " Prognostic factors analysis of 17600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system." *J Clin Oncol* 2001; 19: 3622-3634.
- 207: Azimi F, 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: 2678-2683.
- 208: Dreno B, et al. "Randomized trial adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma." *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51: 539-546.
- 209: Nordlund JJ, et al. "Vitiligo in patients with metastatic melanoma: a good prognostic sign." *J Am Acad Dermatol* 1983; 9: 689-696.
- 210: Bystryn JC et al. "Prognostic significance of hypopigmentation in malignant melanoma." *Arch Dermatol* 1987; 123: 1053-1055.
- 211: Rosenberg SA. "Cancer vaccines based on the identification of genes encoding cancer regression antigens." *Immunol Today* 1997; 18: 175-182.
- 212: Riker AI, et al. "Threshold levels of gene expression of the melanoma antigen gp100 correlate with tumor cell recognition by cytotoxic T lymphocytes." *Int J Cancer* 2000; 86: 818-826.
- 213: Yee C, et al. "Melanocyte destruction after antigen-specific immunotherapy of melanoma: direct evidence of T cell-mediated vitiligo." *J Exp Med* 2000; 192: 1637-1644.

- 214: Simonetti O, et al. "Potential role of CCL27 and CCR10 expression in melanoma progression and immune escape". *Eur J Cancer* 2006; 42: 1181-1187.
- 215: Brunkow ME, et al. "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorders of the scurfy mouse". *Nat Genet* 2001; 27: 68-73.
- 216: Fontenot JD, et al. "FOXP3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells". *Nat Immunol* 2003; 4: 330-336.
- 217: Fontenot JD, et al. "Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor FOXP3". *Immunity* 2005; 22: 329-341.
- 218: Ochs HD, et al. "FOXP3 acts as a rheostat of the immune response". *Immunol Rev* 2005; 203: 156-164.
- 219: Sakaguchi S. "Naturally arising FOXP3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and nonself". *Nat Immunol* 2005; 6: 345-352.
- 220: Rosenberg SA, et al. "Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report." *N Engl J Med* 1988; 319: 1676-1680.
- 221: Apostolou I, et al. "In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells". *J Exp Med* 2004; 199: 1401-1412.
- 222: Schevach E. "CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers". *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 389-400.
- 223: Sadlack B, et al. "Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene". *Cell* 1993; 75: 253-261.
- 224: Sadlack B, et al. "Development and proliferation of lymphocytes in mice deficient for both interleukins-2 and -4". *Eur J Immunol* 1995; 25: 3053-3059.

- 225: Sadlack B, et al. "Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells". *Eur J Immunol* 2002; 2: 389-400.
- 226: Walker LS, et al. "CD4+CD25+ T reg: divide and rule?" *Immunology* 2004; 111: 129.
- 227: Nielsen J, et al. "Origin, disease models and clinical aspects." *APMIS* 2004; 112: 642-650.
- 228: Sober AJ, et al. "Guidelines of care for primary cutaneous melanoma". *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: 579-586.
- 229: Wraith DC, et al. "Regulatory CD4+ T cells and the control of autoimmune disease." *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 695.
- 230: Holm TL, et al. "CD4+CD25+ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology." *APMIS* 2004; 112: 629.
- 231: Wolf AM, et al. "Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients". *Clin Res Cancer* 2003; 9: 606-612.
- 232: Liyanage UK, et al. "Prevalence of regulatory T cells in increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma". *J Immunol* 2002; 169: 2756-2761.
- 233: Woo EY, et al. "Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation". *J Immunol* 2002; 168: 4272-4276.
- 234: Ichihara F, et al. "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: 4404-4408.
- 235: Ormandy LA, et al. "Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma". *Cancer Res* 2005; 65: 2457-2464.
- 236: Sasada T, et al. "CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: Possible involvement of regulatory T cells in disease progression". *Cancer* 2003; 98: 1089-1099.

- 237: Curiel TJ, et al. "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival". *Nat Med* 2004; 10: 942-949.
- 238: Germeau C, et al. "High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens." *J Exp Med* 2005; 201: 241-248.
- 239: Haanen JBAG, et al. "Melanoma-specific tumor-infiltrating lymphocytes but not circulating melanoma-specific T cells may predict survival in resected advanced-stage melanoma patients". *Cancer Immunol Immunother* 2005; 55: 451-458.
- 240: Oijen M, et al. "On the role of melanoma-specific CD8+ T-cell immunity in disease progression of advanced-stage melanoma patients". *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4754-4760.
- 241: Woo EY, et al. "Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer." *Cancer Res* 2001; 61: 4766-4772.
- 242: Nagorsen D, et al: "Natural T cell immunity against cancer". *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4296-4303.
- 243: Carreras J, et al. "High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma." *Blood* 2006; 108: 2957-2964.
- 244: Mourmouras V, et al. "Evaluation of tumour-infiltrating CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human cutaneous benign and atypical naevi, melanomas and melanoma metastases". *Br J Dermatol* 2007; 157: 531-539.
- 245: Hiraoka N, et al. "Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its malignant lesions." *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5423-5434.
- 246: Melief CJM. "Immune pact with the enemy". *Cancer* 2007; 450: 803-804.
- 247: Petrov MB, et al. "Progression of cutaneous squamous cell carcinoma in immunosuppressed patients is associated with reduced CD123+ and FOXP3+ cells in the perineoplastic inflammatory

infiltrate”. *Histopathology* 2009; 55: 67-76.

248: Solomon GJ, et al. “FoxP3 expression in cutaneous T-cell lymphocytic infiltrates”. *J Cutan Pathol* 2008; 35: 1032-1039.

249: Vuylsteke RJCLM, et al. “Tumor-specific CD8+ T cell reactivity in the Sentinel lymph node of GM-CSF-treated stage I melanoma patients is associated with high myeloid dendritic cell content”. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 2826-2833.

250: Yoshie O, et al. “Chemokines in immunity.” *Adv Immunol* 2001; 78: 57-110.

251: Requena C, et al. “Regresión en el melanoma: problemas en su definición e implicación pronóstica”. *Actas Dermosifiliogr* 2009; 100: 759-766.

252: Gao J-Q, et al. “NK cells are migrated and indispensable in the anti-tumor activity induced by CCL27 gene therapy”. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 58: 291-299.

253: Jacobs JFM, et al. “Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy?” *Lancet Oncol* 2012; 13: e32-e42.

254: Slettenaar VI, et al. The chemokine network: a target in cancer biology?” *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58: 962-974.

255: Paillard F. “Cytokine and chemokine: a stimulating couple.” *Hum Gene Ther* 1999; 10: 695-696.

256: Steinman RM. “Dendritic cells: versatile controllers of the immune system”. *Nat Med* 2007; 13: 1155-1159.

257: Flenniken ML, et al. “Melanoma and lymphocyte cell-specific targeting incorporated into a heat shock protein cage architecture”. *Chem Biol* 2006; 13: 161-170.

258: Piris A, et al. “AJCC melanoma staging update: impact on dermatopathology practice and patient management”. *J Cutan Pathol* 2011; 38: 394-400.

- 259: Chen ML, et al. "Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo". Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 419-424.
- 260: Nishikawa H, et al. "CD4+CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses". Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 10902-10906.
- 261: Zubieta MR, et al. "Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies". Am J Pathol 2006; 168: 1666-1675.
- 262: Sato E, et al. "Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer". Proc Natl Acad Sci USA 2005; 102: 18538-18543.
- 263: Gao Q, et al. "Intratumor balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection". J Clin Oncol 2007; 25: 2586-2593.
- 264: Bates GF, et al. "Qualification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse". J Clin Oncol 2006; 24: 5373-5380.
- 265: Kimpfler S, et al. "Skin melanoma development in ret transgenic mice despite the depletion of CD25+FoxP3+ regulatory T cells in lymphoid organs". J Immunol 2009; 183: 6330-6337.
- 266: Panfilis GD, et al. "Phase and stage-related proportions of T cells bearing the transcription factor FOXP3 infiltrate primary melanoma". J Invest Dermatol 2008; 128: 676-684.
- 267: Yu P, et al. "Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors." J Exp Med 2005; 201: 779-791.
- 268: Shimizu J, et al. "Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity." J Immunol 1999; 163: 5211-5218.
- 269: Leong PP, et al. "Phenotyping of lymphocytes expressing regulatory and effector markers in infiltrating ductal carcinoma of the breast". Immunology letters 2006; 102: 229-236.
- 270: Horikawa NH, et al. "In vivo elimination of CD 25+ regulatory T cells leads to tumor rejection

- of B16F10 melanoma, when combined with interleukin-12 gene transfer". *Exp Dermatol* 2004; 13: 613-620.
- 271: Banham AH, et al. "Cell surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3 regulatory T cells." *Trends Immunol* 2006; 27: 541-544
- 272: Roncador G, et al. "Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level." *Eur J Immunol* 2005; 35: 1681-1691.
- 273: Ebert LM, et al. "The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells". *Cancer Res* 2008; 68: 3001-3009.
- 274: Boer OJ, et al. "Immunohistochemical analysis of regulatory T cell markers FOXP3 and GIRT on CD4+CD25+ T cells in normal skin and inflammatory dermatoses". *J Histochem Cytochem* 2007; 55: 891-898.
- 275: Woo YL, et al. "FOXP3 immunohistochemistry on formalin-fixed paraffin-embedded tissue: poor correlation between different antibodies". *J Clin Pathol* 2008; 61: 969-971.
- 276: Allan SE, et al: "Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production." *Int Immunol* 2007; 19: 345-354.
- 277: Tran DQ, et al. "Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype." *Blood* 2007; 110: 2983-2990.
- 278: Wang J, et al. "Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells." *Eur J Immunol* 2007; 37: 129-138.
- 279: Miyara et al. "Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FOXP3 transcription factor." *Immunity* 2009; 30: 899-911.
- 280: Vukmanovic-Stejic M, et al. "Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo." *J Clin Invest* 2006; 116: 2423-2433

- 281: Seddiki N, et al. "Persistence of naive CD45RA+ regulatory T cells in adult life." *Blood* 2006; 107: 2830-2838.
- 282: Vigneron N, et al. "Identification of a new peptide recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma". *Cancer Immunity* 2002; 2: 9-19.
- 283: Fujii H, et al. "Perturbations of both nonregulatory and regulatory FOXP3+ T cells in patients with malignant melanoma". [Br J Dermatol](#) 2011; 164: 1052-1060.
- 284: Ahmadzadeh M, et al. "Expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions." *Blood* 2008; 112: 4953-4960.
- 285: Fu J, et al. "Increased regulatory cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients." *Gastroenterology* 2007; 132: 2328-2339.
- 286: Jandus C, et al. "Selective accumulation of differentiated FOXP3 (+) CD4(+) T cells in metastatic tumor lesions from melanoma patients compared to peripheral blood." *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57: 1795-1805.
- 287: Mizukami Y, et al. "CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer." *Int J Cancer* 2008; 122: 2286-2293.
- 288: Muller A, et al. "Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis." *Nature* 2001; 410: 50-56.
- 289: Zlonik A, et al. "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." *Immunity* 2000; 12: 121-127.
- 290: Lazenec G, et al. "Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation." *Trends Mol Med* 2010; 16: 133-144.
- 291: Balkwill F, et al. "Cancer and the chemokine network." *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 540-550.
- 292: Nagasawa T, et al. "Defects of B-cell lymphopoiesis in mice lacking the CXC chemokine

PBSF/SDF-1.” *Nature* 1996; 382: 635-681.

293: Strieter RM, et al. “Chemokines and cancer.” Clifton (NJ): Humana; 1999. p 143.

294: Graham GJ. “Growth inhibitors in haematopoiesis and leukemogenesis.” *Ballieres Clin Haematol* 1997; 10: 539-559.

295: Strieter RM, et al. “The functional role of ELR motif in C-X-C chemokine mediated angiogenesis.” *J Biol Chem* 1995; 270: 1083-1086.

296: Monteagudo C, et al. “Papel de las quimiocinas en la progresión del melanoma”. *Actas dermo-sifiliogr* 2011; 102: 498-504.

297: Blattman JN, et al. “Cancer immunotherapy: a treatment for the masses.” *Science* 2004; 305: 200-205.

298: Berzofsky JA, et al. “Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer.” *J Clin Invest* 2004; 113: 1515-1525.

299: Gao JQ, et al. “Immune cell recruitment and cell-based system for cancer therapy.” *Pharm Res* 2008; 25: 752-768.

300: Stutman O. “Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice.” *Science* 1974; 183: 534-536.

301: Koebel CM, et al. “Adaptative immunity maintains occult cancer in an equilibrium state”. *Nature* 2007; 450: 903-908.

302: Speiser DA, et al. “A novel approach to characterization clonality and differentiation of human melanoma-specific T cell responses: spontaneous priming and efficient boosting by vaccination”. *J Immunol* 2006; 177: 1338-1348.

303: Nomura T, et al. “Chemikines and anti-cancer immunotherapy: anti-tumor effect of EBI1-ligand chemokine (ELC) and second lymphoid tissue chemokine (SLC).” *Anticancer Res* 2000; 20: 4073-4080.

- 304: Pawelec G. "Immunotherapy and immunoselection – tumour escape as the final hurdle." *FEBS Lett* 2004; 567: 63-66.
- 305: Harlin H, et al. "Tumor progression despite massive influx of activated CD8+ T cells in a patient with malignant melanoma ascites". *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1185-1197.
- 306: Shankaran V, et al. "INF-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour development and shape tumour immunogenicity." *Nature* 2001; 410: 1107-1111.
- 307: Mellado M, et al. "A potential immune escape mechanism by melanoma cells through the activation of chemokine-induced T cell death". *Curr Biol* 2001; 11: 691-696.
- 308: Ferradini L, et al: "Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma. Evidence for in situ T cell clonal expansion". *J Clin Invest* 1993; 91: 1183-1190.
- 309: Yazdi AS, et al. "Heterogeneity of T-cell clones infiltrating primary malignant melanomas". *J Invest Dermatol* 2006; 126: 393-398.
- 310: Pawelec G. "Immunotherapy and immunoselection – tumour escape as the final hurdle." *FEBS Lett* 2004; 567: 63-66.
- 311: Homey B, et al. "Cutting edge: the orphan chemokine receptor G protein-coupled receptor-2 (GPR-2, CCR10) binds the skin-associated chemokine CCL27 (CTACK/ALP/ILC)." *J Immunol* 2000; 164: 3465-3470.
- 312: Homey B, et al. "CCL27-CCR10 interactions regulate T cells mediated skin inflammation." *Nat Med* 2002; 8: 157-165.
- 313: Morales J, et al. "CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells." *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14470-14475.
- 314: Hudak S, et al. "Immune surveillance and effector functions of CCR10+ skin homing T cells." *J Immunol* 2002; 169: 1189-1196.

- 315: Letsch A, et al. "Bone marrow contains melanoma-reactive CD8+ effector T cells and, compared with peripheral blood, enriched numbers of melanoma-reactive CD8+ memory T cells". *Cancer Res* 2003; 63: 5582-5586.
- 316: Homey B, et al. "Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer." *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 175-184.
- 317: Guo J, et al. "Macrophage-derived chemokine gene transfer results in tumor regression in murine lung carcinoma model through efficient induction of antitumor immunity." *Gene Ther* 2002; 9: 793-803.
- 318: Pivarcsi A, et al. "Tumor immune escape by the loss of homeostatic chemokine expression". *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 19055-19060.
- 319: Appay V, et al. "New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site". *J Immunol* 2006; 177: 1670-1678.
- 320: Gortz A, et al. "The chemokine ESKINE/CCL27 displays novel modes of intracrine and paracrine function." *J Immunol* 2002; 169: 1387-1394.
- 321: Jaeger J, et al. "Gene expression signatures for tumor progression, tumor subtype, and tumor thickness in laser-microdissected melanoma tissues." *Clin Cancer Res* 2007; 13: 806-815.
- 322: Murakami T, et al. "Immune evasion by murine melanoma mediated through chemokine receptor-10." *J Exp Med* 2003; 199: 1337-1347.
- 323: Monteagudo C, et al. "CCL27-CCR10 and CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor mRNA expression ratio: new predictive factors of tumor progression in cutaneous malignant melanoma" *Clin Exp Metastasis* 2012; 29: 625-37.
- 324: Oble DA, et al. "Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma". *Cancer Immunity* 2009; 9:3-23.
- 325: Kawakami Y, et al. "Immunobiology of human melanoma antigens MART-1 and gp-100 and

their use for immuno-gene therapy.” *Int Rev Immunol* 1997; 14: 173-192.

326: Baumgartner J, et al. “Melanoma induces immunosuppression by upregulating FOXP3+ regulatory T cells”. *J Surg Res* 2007; 141: 72-77.

327: Piras F, et al. “The predictive value of CD8, CD4, CD68 and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase”. *Am Cancer Soc* 2005; 104: 1246-1254.

328: Ramstad T, et al. “Immunohistochemical analysis of primary breast tumors and tumor-draining lymph nodes by means of the T-cell costimulatory molecule OX-40”. *Am J Surg* 2000; 179: 400-406.

329: Bogunovic D, et al. “Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival”. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 20429-20434.

330: Cesanna GC, et al. “Characterization of CD4+CD25+ regulatory cells in patients treated with high-dose interleukin-2 for metastatic melanoma or renal cell carcinoma”. *J Clin Oncol* 2006. 24: 1169-1177.

331: Solana R, et al. “Lymphocyte activation in response to melanoma: interaction of NK-associated receptors and their ligands”. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 56: 101-109.

332: Psaty ET, et al. “Defining the patient at high risk for melanoma”. *Int J Dermatol* 2010; 49: 362-376.

333: King R. “Lentiginous melanoma” *Arch Pathol Lab Med* 2001; 135: 337-341.

334: Benlalam H, et al. “Infusion of melan-A/Mart-1 specific tumor-infiltrating lymphocytes enhanced relapse-free survival of melanoma patients”. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 56: 515-526.

335: Hussein MR. “Tumour-infiltrating lymphocytes and melanoma tumorigenesis: an insight”. *Br J Dermatol* 2005; 153: 18-21.

- 336: Mühleisen B, et al. "Progression of cutaneous squamous cell carcinoma in immunosuppressed patients is associated with reduced CD123+ and FOXP3+ cells in the perineoplastic inflammatory infiltrate". *Histopathology* 2009; 55: 67-76.
- 337: Balch CM, et al. "Prognostic factors analysis of 17600 melanoma patients: validation of the American Joint Comitee on cancer melanoma staging system". *J Clin Oncol* 2001; 19: 3622-3644.
- 338: Balch CM, et al. "Final version of the American Joint Committee on cancer staging system for cutaneous melanoma". *J Clin Oncol* 2001; 19: 3635-3648.
- 339: Molenkamp BG, et al. "Immunomodulation of the melanoma sentinel lymph node: a novel adjuvant therapeutic option". *Immunobiology* 2006; 211: 651-661.
- 340: Burton A. "Tumours escape immune attack using chemokines". *Lancet Oncol* 2001; 396.
- 341: Bodey B, et al. "Controversies on the prognostic significance of tumor infiltrating leukocytes in solid human tumors". *Anticancer Res* 2000; 20: 1759-1768.
- 342: Voo KS, et al. "CD4+ T-cell response to mitochondrial cytochrome b in human melanoma". *Cancer Res* 2006; 66: 5919-5926.
- 343: Rigel DS. "Epidemiology of melanoma". *Sem Cutan Med Surg* 2010; 29: 204-209.
- 344: Nagore E, et al. "Factores pronósticos en el melanoma maligno cutáneo localizado: estudio de 639 pacientes". *Med Clin* 2005; 124: 361-367.
- 345: Andrew A, et al. "Melanoma and genetics". *Clin Dermatol* 2009; 27: 46-52.
- 346: La situación del cáncer en España. Ministerio de Sanidad y consumo, 2005: 15-76.