



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Patología

Programa de Doctorado en Medicina

Tesis Doctoral

**ESTUDIO DEL ESTADO DE METILACIÓN GENÓMICA  
Y EXPRESIÓN DE miRNAs EN TUMORES  
MELANOCÍTICOS SPITZOIDES PARA DETERMINAR  
SU GRADO DE MALIGNIDAD.**

Presentada por:

Jose Francisco González Muñoz

Dirigida por:

Dr. José Carlos Monteagudo Castro

Valencia, mayo de 2023



VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Patología

Programa de Doctorado en Medicina

Tesis Doctoral

**ESTUDIO DEL ESTADO DE METILACIÓN GENÓMICA  
Y EXPRESIÓN DE miRNAs EN TUMORES  
MELANOCÍTICOS SPITZOIDES PARA DETERMINAR  
SU GRADO DE MALIGNIDAD.**

Presentada por:

Jose Francisco González Muñoz

Dirigida por:

Dr. José Carlos Monteagudo Castro

Valencia, mayo de 2023

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: Carlos Monteagudo Castro N.I.F. 24311281M, Departamento/Instituto: Departamento de Patología Centro: Facultad de Medicina

2.- Apellidos y nombre: N.I.F. , Departamento/Instituto: Centro:

3.- Apellidos y nombre: N.I.F. , Departamento/Instituto: Centro:

Tutor o tutora (si procede)

Apellidos y nombre. .N.I.F. , Departamento/Instituto: Centro:

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: "Estudio del estado de metilación genómica y expresión de miRNAs en tumores melanocíticos spitzoides para determinar su grado de malignidad."

de D/Dña. Jose Francisco González Muñoz,

estudiante del Programa de Doctorado 3139 Medicina (RD99/2011) en Medicina de la Universitat de València, emiten informe favorable (favorable/desfavorable) para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

Fecha: 13/04/2023

Fdo.: Carlos Monteagudo Castro

Fdo.:

Fdo.:

Fdo.:



Director/a

Director/a

Director/a

Tutor/a

ESCUELA DOCTORAL

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

## AGRADECIMIENTOS

Ha tardado, pero ya ha llegado a su fin.

Primero, me gustaría agradecer a mi director de tesis, Carlos, su confianza en mí desde el primer momento y sus ánimos en los momentos en los que solo albergaba dudas. No quiero olvidarme de mis dos grandes compañeras de laboratorio, Bea y Gema, con las que he compartido muchos momentos, y aunque pasen los años, siempre les tendré una gran estima y consideración.

Gracias al resto de patólogos, resis, técnicos y demás personal del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Valencia, sobre todo a Carolina, Jaime y María. Con vosotros todo se enfoca de otra manera.

Com a suecà, de poble, açò va en valencià:

No podria haver arribat fins ací sense l'ajuda incondicional dels meus pares, Pepe i Paqui, que han estat en tots els moments en els que els he necessitat, sacrificant-se per a que no em faltara res. La vostra insistència i constància fa que hui estiga ací, tot i la meua falta de insistència i constància. Espere que estigau orgullosos de mi, com jo ho estic de ser el vostre fill.

A la meua germana Sandra, pel seu suport i per estar sempre ahí. Als meus nebots Óliver i Joel, per ser l'alegria de la casa.

Idoia, gràcies. Gràcies per aguantar-me sempre, però sobretot en els meus atacs d'estrés i nervis per tindre que ficar-me cara l'ordinador i no vore el final. Eres una peça fonamental en la meua vida i també per a que haja acabat la tesi.

Per últim, Kodak. La millor estàtua que he tingut mai. Però quanta falta fas quan no estàs.

## **FINANCIACIÓN**

Este trabajo ha sido financiado mediante dos proyectos competitivos nacionales: PI20/00094 y PI17/02019 del Instituto de Salud Carlos III y Fondos Europeos FEDER (IP: Carlos Monteagudo. Investigador: Jose Francisco González Muñoz).

## **ÍNDICE DE CONTENIDOS**

Portada.....	1
Informe del director.....	2
Agradecimientos .....	3
Financiación.....	4
Índice de contenidos .....	5
1. Símbolos, abreviaturas y siglas.....	7
2. Índice de figuras .....	8
3. Índice de tablas .....	12
4. Introducción .....	14
4.A. Descripción y epidemiología .....	14
4.B. Historia y evolución.....	16
4.C. Parámetros clínicos e histológicos .....	18
4.D. Parámetros moleculares.....	21
4.D.I. Hibridación genómica comparada e hibridación fluorescente in situ .....	21
4.D.II. Estudio mutacional .....	22
4.D.III. Fusiones de kinasas.....	24
4.D.IV. Next-Generation Sequencing (NGS) .....	25
4.D.V. Otras técnicas .....	26
4.E. Epigenética: Metilación y miRNAs.....	26
4.F. Problemas diagnósticos, pronósticos, psicológicos y económicos .....	29
5. Materiales y métodos .....	32
5.A. Diseño de estudio y selección de pacientes .....	32
5.B. Extracción de ácidos nucleicos.....	32
5.C. Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS).....	34
5.D. Estudio bioinformático .....	41
5.E. Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM).....	43

5.F PCR a tiempo real .....	47
5.G. Estudio estadístico .....	50
5.H. Limitaciones del estudio .....	51
6. Resultados .....	52
6.A. Estudio clínico e histológico .....	52
6.B. Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) .....	59
6.C. Estudio bioinformático .....	63
6.D. Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM) .....	84
6.E. PCR a tiempo real de genes .....	92
6.F. PCR a tiempo real de miRNAs .....	93
6.G. Relación entre metilación y miRNAs .....	100
6.H. Relación entre metilación y variables clínicas e histológicas .....	105
6.I. Relación entre miRNAs y variables clínicas e histológicas .....	112
7. Discusión .....	126
8. Conclusiones .....	133
9. Bibliografía .....	134

## **1. SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS**

**ADN / DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN / RNA:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**AST:** Atypical Spitz Tumor

**AUC:** Area Under the Roc Curve o Área Bajo la Curva

**cDNA:** ADN complementario

**CGH:** Comparative genomic hybridization

**CNV:** Copy number variations

**CpG:** Dinucleótido de citosina y guanina enlazados por fosfatos

**ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**FFPE:** Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

**FISH:** Fluorescence *in situ* hibridisation

**MeDIP:** Methylated DNA immunoprecipitation

**MELTUMP:** Melanocytic tumors of uncertain malignant potencial

**miRNA / microRNA:** Fragmento pequeño de ARN monocatenario no codificante

**MLPA:** Multiplex Ligation dependent Probe Amplification

**MS-HRM:** Methylation- Sensitive High-Resolution Melting

**MS-HRM:** Methylation-Specific High-Resolution Melting

**MS-MLPA:** Methylation-specific Multiplex Ligation dependent Probe Amplification

**MS-PCR:** Methylation-Specific PCR

**NGS:** Next-Generation Sequencing

**PCA:** Análisis de componentes principales

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

**qPCR / qRT-PCR:** PCR cuantitativa a tiempo real (Quantitative Real Time PCR)

**ROC:** Receiver Operating Charateristic

**RRBS:** Reduced Representation Bisulfite Sequencing

**RT-PCR:** PCR con transcriptasa reversa (Reverse Transcription PCR)

**TSPMI:** Tumor spitzoide de potencial maligno incierto

**WGBS:** Whole Genome Bisulfite Sequencing



## 2. **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Imagen histológica de nevus de Spitz. ....	15
Figura 2. Imagen histológica de un tumor spitzoide de potencial maligno incierto (TSPMI). ....	15
Figura 3. Imagen histológica de un melanoma de Spitz.....	16
Figura 4. Variables discretas significativamente predictoras del diagnóstico. (A) Edad. (B) Simetría. (C) Ulceración. (D) Patrón pagetoide. (E) Formación de masa expansiva. (F) Densidad celular. (G) Mitosis por mm <sup>2</sup> (ratio). (H) Mitosis atípica. (I) Mitosis profunda. (J) Atipia. (K) Maduración. (L) Consunción de la epidermis. (M) Necrosis. ....	57
Figura 5. Número de mitosis por mm <sup>2</sup> en función del diagnóstico.....	59
Figura 6. Electroferograma de los pools de librería de la RRBS analizados con el Bioanalyzer. .	60
Figura 7. Electroferograma del pool final de librería de la RRBS analizados con el Bioanalyzer.	61
Figura 8. Resultados descriptivos de la primera tanda de RRBS.....	62
Figura 9. Resultados descriptivos de la segunda tanda de RRBS. ....	63
Figura 10. Phred score por base de las muestras (multiqc software).....	64
Figura 11. PCA de todas las muestras agrupadas por grupo experimental (qualimap software). .....	65
Figura 12. Porcentaje de metilación global de CpG por grupo experimental encontrado por multiqc en los archivos de la llamada de metilación. ....	65
Figura 13. Porcentaje de alineamiento contra el genoma de referencia hg19 de todas las muestras visualizado por multiqc software. ....	66
Figura 14. Porcentaje de citosinas metiladas en zonas CpG (azul), CHG (verde) y CHH (rojo) por muestra visualizado por Bismark software. ....	66
Figura 15. Porcentaje de metilación de CpG por grupo biológico. One-way ANOVA no paramétrico no significativo ( $p > 0,05$ ). ....	67
Figura 16. Porcentaje de CpG con un coverage mayor que 10X.....	67
Figura 17. PCA del análisis de metilación de CpG de los tres grupos experimentales.....	68
Figura 18. Porcentaje de metilación por cromosoma.....	69
Figura 19. Heatmap que muestra los 214 sitios con más del 10% de diferencia de metilación respecto al control (Nevus) con q-valor $< 0,05$ en la comparación de los tres grupos biológicos. .....	70
Figura 20. Heatmap que muestra los 224 sitios con más del 10% de diferencia de metilación respecto al control (Nevus) con q-valor $< 0,05$ en la comparación con melanoma. ....	71
Figura 21. Porcentaje de metilación de los sitios diferencialmente metilados en función del diagnóstico. (A) cg 31149610 - CpG ID NO 1. (B) cg 9826086 - CpG ID NO 2. (C) cg 9825862 - CpG	

ID NO 3. (D) cg 9825882 - CpG ID NO 4. (E) cg 9826034 - CpG ID NO 5. (F) cg 31149858 - CpG ID NO 6. (G) cg 156186376 - CpG ID NO 7. ....	74
Figura 22. Curvas ROC individuales para (A) cg 31149610 - CpG ID NO 1. (B) cg 9826086 - CpG ID NO 2. (C) cg 9825862 - CpG ID NO 3. (D) cg 9825882 - CpG ID NO 4. (E) cg 9826034 - CpG ID NO 5. (F) cg 31149858 - CpG ID NO 6. (G) cg 156186376 - CpG ID NO 7. ....	76
Figura 23. Heatmaps de los sitios CpG usados para construir el modelo 1. (A) Todos los grupos. (B) Sólo los grupos nevus y melanoma. ....	79
Figura 24. Curva ROC para el diagnóstico de melanoma utilizando el modelo 2. ....	80
Figura 25. Heatmaps de los sitios CpG usados para construir el modelo 2. (A) Todos los grupos. (B) Sólo los grupos nevus y melanoma. ....	83
Figura 26. Captura del programa LightCycler®480 Software Version 1.5 (Roche). En la opción “Tm Calling” se observan los picos obtenidos. Se generan de forma manual dos picos, Tm1 (no metilación, en color rojo) y Tm2 (metilación, en color verde).....	85
Figura 27. Curvas normalizadas de melting obtenidas para el gen PMF1. ....	86
Figura 28. Picos de melting obtenidos para el gen PMF1. ....	86
Figura 29. Resultados de la técnica MS-HRM para el gen PMF1. Valores de Ct (CP) obtenidos para las muestras controles. ....	87
Figura 30. Resultados de la técnica MS-HRM para el gen MYO1D. Valores de Ct (CP) obtenidos para las muestras controles. ....	88
Figura 31. Curvas normalizadas de melting obtenidas para el gen MYO1D. ....	88
Figura 32. Picos de melting obtenidos para el gen MYO1D. ....	89
Figura 33. Resultados de la técnica MS-HRM para el gen TEKT4P2. Valores de Ct (CP) obtenidos para las muestras controles. ....	89
Figura 34. Curvas normalizadas de melting obtenidas para el gen TEKT4P2.....	90
Figura 35. Picos de melting obtenidos para el gen TEKT4P2. ....	90
Figura 36. Expresión del gen TEKT4P2 en función del diagnóstico.....	93
Figura 37. Expresión de los miRNA diferencialmente expresados en función del diagnóstico. (A) miR-137 (B) miR-182 (C) miR-205 (D) miR-221. ....	96
Figura 38. Valores mínimo y máximo de miR-125b según diagnóstico. ....	97
Figura 39. Valores mínimo y máximo de miR-137 según diagnóstico. ....	97
Figura 40. Valores mínimo y máximo de miR-182 según diagnóstico. ....	97
Figura 41. Valores mínimo y máximo de miR-191 según diagnóstico. ....	98
Figura 42. Valores mínimo y máximo de miR-200c según diagnóstico.....	98
Figura 43. Valores mínimo y máximo de miR-205 según diagnóstico. ....	98
Figura 44. Valores mínimo y máximo de miR-21 según diagnóstico. ....	99

Figura 45. Valores mínimo y máximo de miR-211 según diagnóstico. ....	99
Figura 46. Valores mínimo y máximo de miR-221 según diagnóstico. ....	99
Figura 47. Valores mínimo y máximo de miR-9 según diagnóstico. ....	100
Figura 48. Árbol de clasificación diagnóstica hipotética para las lesiones TSPMI a partir de los miRNAs. ....	104
Figura 49. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg31149610 respecto a la presencia de mitosis profunda en función del diagnóstico. ....	107
Figura 50. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg9826086 respecto a la presencia de (A) mitosis por mm2, (B) mitosis atípica, (C) mitosis profunda, (D) infiltrado linfocitario peritumoral, (E) infiltrado linfocitario intratumoral y (F) esclerosis en función del diagnóstico. ....	107
Figura 51. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg9825862 respecto a la presencia de mitosis atípica en función del diagnóstico. ....	108
Figura 52. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg9825882 respecto a la (A) localización del tumor y (B) la presencia de patrón pagetoide en función del diagnóstico. ....	108
Figura 53. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg9826034 respecto a la presencia de (A) mitosis por mm2, (B) mitosis atípica, (C) mitosis profunda, (D) infiltrado linfocitario peritumoral e (E) infiltrado linfocitario intratumoral en función del diagnóstico. ..	109
Figura 54. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg31149858 respecto al (A) género, (B) mitosis atípica, (C) mitosis profunda, (D) infiltrado linfocitario peritumoral y (E) esclerosis en función del diagnóstico. ....	110
Figura 55. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg156186376 respecto a la (A) localización, (B) mitosis profunda, (C) atípia, (D) infiltrado linfocitario peritumoral e (E) infiltrado linfocitario intratumoral en función del diagnóstico. ....	111
Figura 56. Distribución de las muestras según la expresión de miR-125b respecto a la (A) localización, (B) atipia, (C) infiltrado linfocitario intratumoral y (D) consunción de la epidermis en función del diagnóstico. ....	116
Figura 57. Distribución de las muestras según la expresión de miR-137 respecto a la (A) localización, (B) simetría y (C) esclerosis en función del diagnóstico. ....	117
Figura 58. Distribución de las muestras según la expresión de miR-182 respecto a la (A) dermis profunda, (B) patrón pagetoide, (C) formación de masa expansiva, (D) mitosis profunda y (E) esclerosis en función del diagnóstico. ....	118
Figura 59. Distribución de las muestras según la expresión de miR-191 respecto a la (A) localización y (B) maduración en función del diagnóstico. ....	119

Figura 60. Distribución de las muestras según la expresión de miR-200c respecto a la (A) dermis profunda, (B) patrón pagetoide, (C) formación de masa expansiva, (D) número de mitosis (ratio), (E) mitosis profunda y (F) esclerosis en función del diagnóstico. ....	120
Figura 61. Distribución de las muestras según la expresión de miR-205 respecto a la (A) dermis profunda, (B) patrón pagetoide, (C) formación de masa expansiva, (D) número de mitosis (ratio), (E) mitosis profunda, (F) consunción de la epidermis y (G) esclerosis en función del diagnóstico. ....	121
Figura 62. Distribución de las muestras según la expresión de miR-21 respecto a la (A) localización y (B) densidad celular en función del diagnóstico. ....	122
Figura 63. Distribución de las muestras según la expresión de miR-211 respecto a la (A) localización, (B) dermis profunda, (C) mitosis profunda, (D) infiltrado linfocitario intratumoral, (E) pigmentación y (F) esclerosis en función del diagnóstico. ....	123
Figura 64. Distribución de las muestras según la expresión de miR-221 respecto a la (A) localización, (B) elastosis solar, (C) tipo de célula y (D) necrosis en función del diagnóstico...	124
Figura 65. Distribución de las muestras según la expresión de miR-9 respecto a la (A) infiltración linfocitaria intratumoral, (B) pigmentación y (C) esclerosis en función del diagnóstico. ....	125

### **3. ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Clasificación de las lesiones spitzoides en función de los parámetros clínicos, histopatológicos y citológicos. Adaptado de “Who Classification of Skin Tumours.” <sup>12</sup> .....	19
Tabla 2. Marcadores de diferenciación melanocítica. Adaptado de Hillen et al. <sup>2</sup> .....	20
Tabla 3. Reactivos mix de PCR acorde al protocolo EpiMelt.....	46
Tabla 4. Programa de PCR-HRM para el gen PMF1.....	46
Tabla 5. Programa de PCR-HRM para el gen MYO1D.....	46
Tabla 6. Programa de PCR-HRM para el gen TEKT4P2.....	47
Tabla 7. Componentes de la retrotranscripción de ARN a cDNA.....	47
Tabla 8. Componentes de la PCR a tiempo real.....	48
Tabla 9. Información de los miRNAs estudiados.....	49
Tabla 10. Componentes de la retrotranscripción de ARN a cDNA.....	49
Tabla 11. Componentes de la PCR a tiempo real.....	50
Tabla 12. Descripción de las variables discretas clínicas e histológicas.....	52
Tabla 13. Descripción de las variables continuas histológicas.....	54
Tabla 14. Descripción de las variables discretas clínicas e histológicas en función del diagnóstico. .....	54
Tabla 15. Descripción de las variables continuas histológicas en función del diagnóstico.....	58
Tabla 16. Parámetros de calidad del pool de librerías.....	61
Tabla 17. Parámetros de calidad de los pools de librerías de la segunda tanda de RRBS.....	62
Tabla 18. Información de los 7 CpGs diferencialmente metilados.....	72
Tabla 19. Descripción de los sitios cg en función del diagnóstico y su valor predictivo.....	73
Tabla 20. Especificidad, sensibilidad y área bajo la curva de los 7 sitios CpG individualmente.	75
Tabla 21. Predicción de las muestras spitzoides nevus y melanoma según el modelo 1.....	77
Tabla 22. Predicción de las muestras spitzoides de potencial maligno incierto según el modelo 1. .....	78
Tabla 23. Predicción de las muestras spitzoides nevus y melanoma según el modelo 2. En rojo se muestran las predicciones que no coinciden con el diagnóstico.....	81
Tabla 24. Predicción de las muestras spitzoides de potencial maligno incierto según el modelo 2. .....	82
Tabla 25. Predicción, según los modelos 1 y 2, de las muestras estudiadas (A) nevus y melanoma y (B) TSPMI por RRBS. En rojo se muestran las predicciones que no coinciden.....	84
Tabla 26. Clasificación de las lesiones TSPMI del segundo experimento MS-HRM en función del porcentaje de metilación de TEKT4P2.....	91

Tabla 27. Clasificación de las lesiones TSPMI del cuarto experimento MS-HRM en función del porcentaje de metilación de TEKT4P2. ....	92
Tabla 28. Correlación entre los diferentes miRNAs, expresado como el coeficiente de correlación rho y (p-valor). ....	94
Tabla 29. Descripción de los miRNAs en función del diagnóstico y su valor predictivo. ....	94
Tabla 30. Descripción de los miRNAs en función del diagnóstico y su valor predictivo en las 40 muestras estudiadas por RRBS.....	100
Tabla 31. Correlaciones significativas entre los sitios de metilación y los miRNAs. ....	<b>¡Error!</b>
<b>Marcador no definido.</b>	
Tabla 32. Variables clínicas significativas para los sitios de metilación. <b>¡Error!</b>	<b>Marcador no definido.</b>
Tabla 33. Descripción de los sitios de metilación en función de las variables clínicas e histológicas y su valor predictivo. ....	112

## **4. INTRODUCCIÓN**

### **4.A. Descripción y epidemiología**

Las neoplasias melanocíticas son aquellas en las que se encuentra, por definición, al menos un agregado de tres o más células melanocíticas en contacto directo, localizadas en la epidermis, la dermis u otros tejidos<sup>1</sup>. Este término engloba un grupo heterogéneo de tumores que se clasifican en función de su apariencia histopatológica, sus características clínicas y sus alteraciones genéticas, y cuyo espectro cubre desde lesiones benignas (nevus) hasta malignas (melanoma)<sup>2</sup>.

Las lesiones spitzoides son un tipo de neoplasias melanocíticas con unas significativas diferencias morfológicas y moleculares con el resto de tumores melanocíticos que, al no haber un aproximación algorítmica efectiva para el diagnóstico y manejo de estos casos, provocan una gran confusión entre patólogos, dermatólogos, oncólogos y cirujanos plásticos<sup>3</sup>. Por este motivo, la predicción de su comportamiento biológico y riesgo metastásico es difícil<sup>4</sup>. Se caracterizan por la presencia de grandes melanocitos epitelioides y/o fusiformes<sup>1,5</sup>, pudiéndose clasificar en tres grupos: 1) tumores spitzoides sin anomalías adicionales significativas, que se denominan nevus de Spitz o tumores spitzoides benignos; 2) tumores spitzoides con una o más características atípicas que se han denominado tumores spitzoides atípicos o tumores spitzoides de potencial maligno incierto (TSPMI); y 3) aquellos con criterios histológicos y/o genéticos de malignidad, llamados melanomas spitzoides<sup>4-6</sup>.

La prevalencia de las neoplasias spitzoides no está bien aclarada, pero se estima que anualmente se diagnostican entre 1,4 y 7 casos de nevus de Spitz por 100.000 habitantes<sup>7</sup>, por lo que la incidencia de los nevus es menor al 0,2% en la población global. Sin embargo, su incidencia aumenta cuanto menor es la edad del paciente, y se ha descrito que la incidencia en la población infantil es del 1%<sup>7-10</sup>.

Los nevus de Spitz (Figura 1) pueden aparecer en cualquier parte del cuerpo, aunque lo más habitual es encontrarlos en cabeza y cuello (37%) o en el tronco inferior (28%)<sup>8,9</sup>, generalmente durante la infancia o en adultos jóvenes (50-75% de los pacientes son menores de 20 años), aunque se han encontrado en pacientes adultos de todos los rangos de edad y sin importar el sexo, a pesar de que parece haber una predominancia en las mujeres<sup>5,7,10,11</sup>. La raza caucásica es la más afectada, siendo menos frecuente encontrar este tipo de lesiones en las poblaciones asiática y africana<sup>7,10</sup>. Al aparecer sobre todo en la niñez y la pubertad, se ha sugerido que la activación de los nevus pueda deberse al efecto de las hormonas<sup>12</sup>.



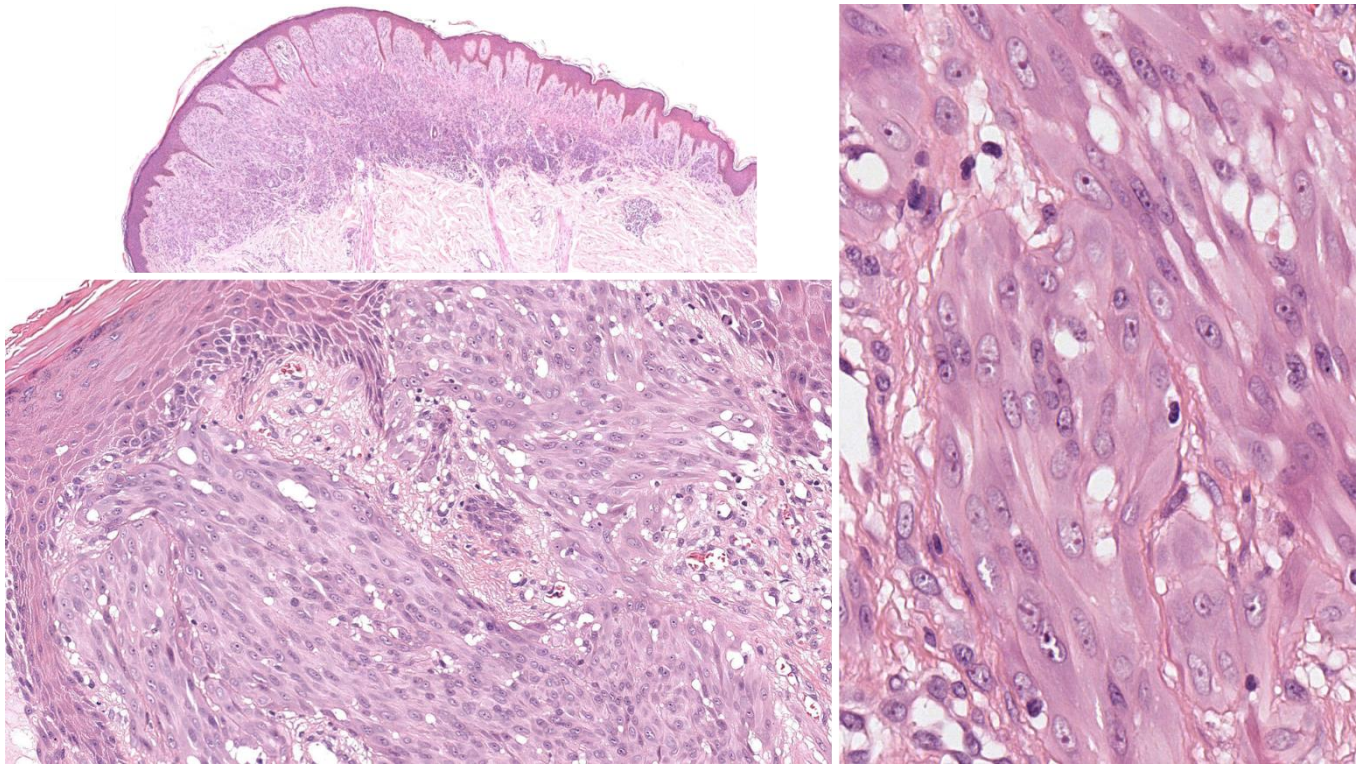


Figura 2. Imagen histológica de nevus de Spitz.

Los tumores spitzoides atípicos (TSPMI) (Figura 2) se encuentran con una frecuencia mucho menor que los nevus, y es más complicados distinguirlos de los melanomas spitzoides<sup>13</sup>. En pacientes comprendidos entre 1 y 18 años, se observó que el 7% de las neoplasias spitzoides estudiadas eran atípicas<sup>8,14</sup>.

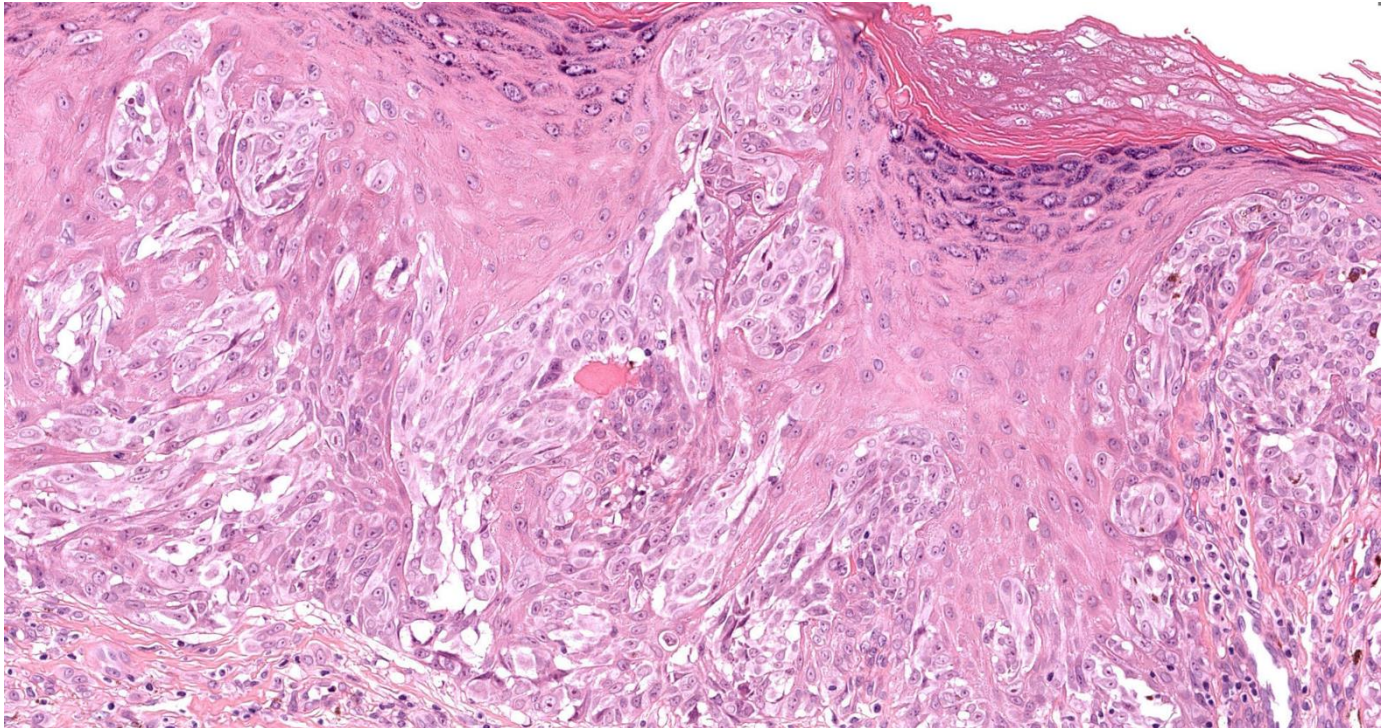


Figura 1. Imagen histológica de un tumor spitzoide de potencial maligno incierto (TSPMI).



El melanoma spitzoide (Figura 3) se presenta sobre todo en la población adulta, con una media de edad en el diagnóstico de 55 años (en una cohorte con rango de 8 a 90 años)<sup>10,11</sup>. Es poco frecuente en la población pediátrica aunque, sin embargo, la mayoría de melanomas diagnosticados en niños son spitzoides<sup>8</sup>. Parece afectar más a los hombres que a las mujeres y, aunque puede aparecer en cualquier parte del cuerpo, comúnmente se encuentra en las extremidades y el tronco<sup>12</sup>.

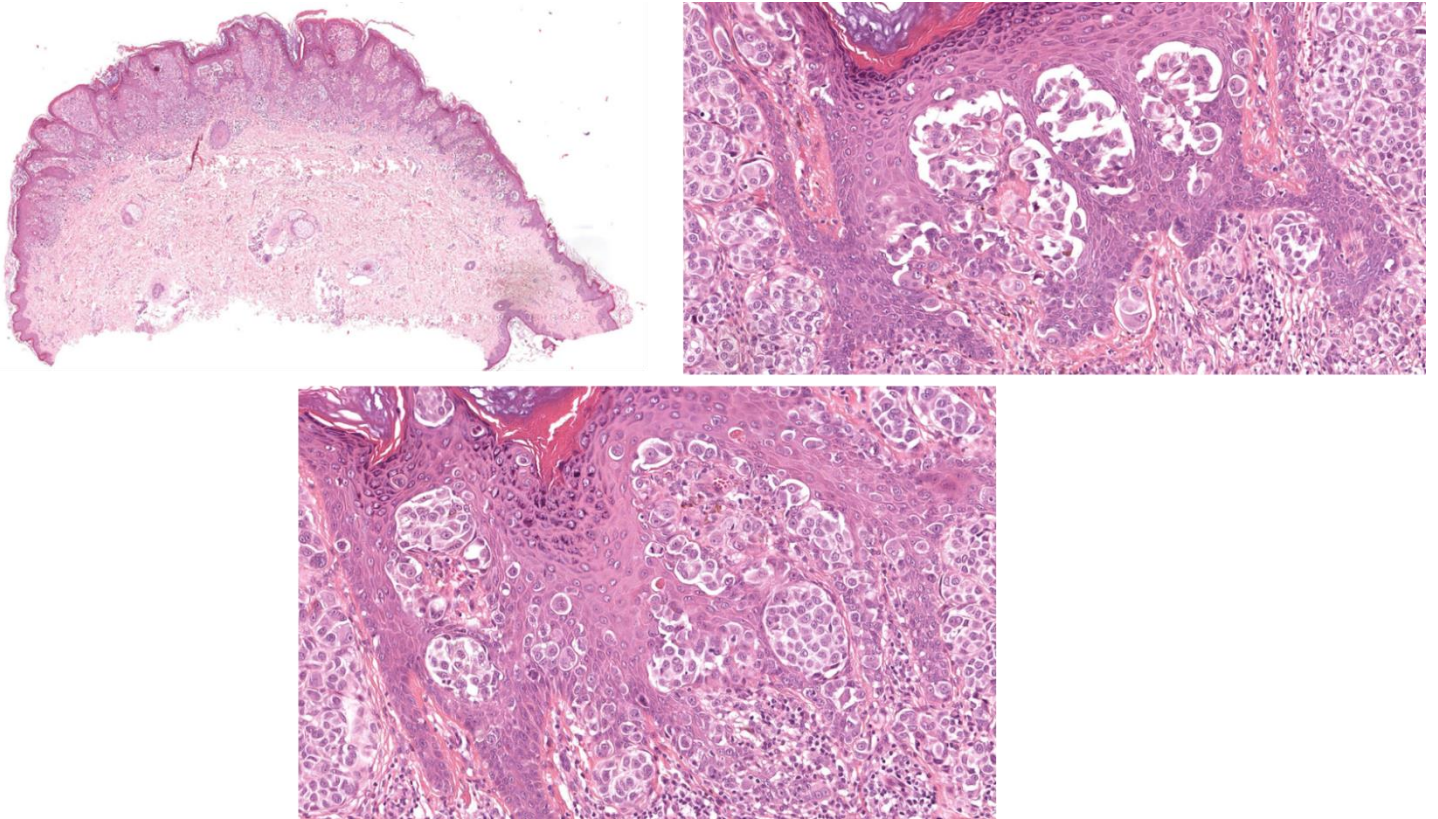


Figura 3. Imagen histológica de un melanoma de Spitz.

#### **4.B. Historia y evolución**

Los dermatopatólogos franceses Darier y Civate<sup>15</sup> fueron los primeros en describir con detalle un tumor melanocítico inusual, que posteriormente se denominaría spitzoide, que crecía rápidamente en la nariz de un niño de 8 meses, aunque no fueron capaces de determinar si se trataba de una lesión benigna o maligna<sup>6,9,16</sup>.

Posteriormente, en 1939, Pack y Anglem identificaron un tipo particular de lesión melanocítica en un niño adolescente, cuyas características eran diferentes de las lesiones en adultos, introduciendo así el término melanoma prepuberal<sup>16,17</sup>.

No fue hasta 1948 cuando la patóloga estadounidense Sophie Spitz publicó el artículo "Melanoma of Childhood"<sup>18</sup> en la revista American Journal of Pathology. En este, describe por

primera vez un tipo de lesiones melanocíticas pediátricas, que histológicamente parecen melanomas pero sin su comportamiento agresivo, y las nombró melanoma juvenil<sup>5</sup>. Así, estas lesiones formarían parte de una categoría distinta a los nevos benignos de la infancia y a los melanomas de adultos, por lo que al cambiar el criterio de la interpretación clínica, el artículo de Spitz es uno de los más citados en la historia de la medicina<sup>5,16</sup>.

La terminología para nombrar las lesiones spitzoides ha ido evolucionando desde que se describieron por primera vez como melanoma juvenil. En 1954 se propuso utilizar el término melanoma juvenil benigno pero en 1967 el Comité de Patología del Proyecto Melanoma de Queensland recomendó utilizar el nombre de nevus de Spitz<sup>16</sup>. A pesar de ser descritas como una entidad benigna, desde el artículo de Sophie Spitz en 1948 han ido apareciendo publicaciones en las que casos diagnosticados como melanoma juvenil o nevus spitzoide metastatizaban<sup>5,16</sup>, por lo que de forma consensuada, pero no sin controversia, las neoplasias spitzoides fueron clasificadas como una entidad biológica distinta, con un espectro desde las benignas (nevus de Spitz) a las malignas (melanoma)<sup>5,19</sup>. En 1975, Reed *et al.*<sup>20</sup> utilizó por primera vez el término tumor de Spitz atípico, un grupo de lesiones que se encontrarían en la parte central de espectro, puesto que tienen características histológicas diferentes a los nevos pero que no son suficientes para considerarlas malignas<sup>6,19</sup>. Este grupo intermedio ha recibido diferentes nombres como nevus de Spitz con atipia, nevus de Spitz atípico, tumor de Spitz atípico, nevus de Spitz maligno, tumor spitzoide de potencial maligno incierto, tumor spitzoide borderline o tumores melanocíticos spitzoides ambiguos o controvertidos<sup>4,5,9</sup>.

Con el paso de las décadas, la clasificación de las lesiones spitzoides más empleada es: 1) Nevus de Spitz, 2) Tumor de Spitz atípico (AST por sus siglas en inglés - Atypical Spitz Tumor) y 3) Melanoma spitzoide<sup>5,16,19</sup>. Los tumores de Spitz atípicos se encontrarían dentro de los tumores melanocíticos de potencial maligno incierto (Melanocytic tumors of uncertain malignant potential, MELTUMPs), por lo que también pueden verse citados como STUMP (Spitzoid Tumor of Unknown/Uncertain Malignant Potential) y que en español se denominan tumores spitzoides de potencial maligno incierto (TSPMI)<sup>5</sup>.

Aquí, los términos lesión, tumor o neoplasia melanocítica spitzoide se usan de forma indistinta e intercambiable al referirnos a las lesiones de todo el espectro, desde las convencionales y benignas nevus de Spitz, pasando por los tumores biológicamente indeterminados (TSPMI) hasta las lesiones malignas<sup>6</sup>.

#### 4.C. Parámetros clínicos e histológicos

Igual que ha ido evolucionando la terminología utilizada para describir a las lesiones spitzoides desde su primera descripción en 1910, también se han modificado los parámetros clínicos, histopatológicos, citológicos y moleculares a tener en cuenta para clasificarlas.

La última clasificación oficial fue publicada el 2018 por la Organización Mundial de la Salud (OMS)<sup>12</sup> (Tabla 1).

Clínicamente, las neoplasias spitzoides se encuentran generalmente de forma solitaria, pero se han descrito lesiones múltiples o eruptivas<sup>7</sup>.

Las características clínicas e histopatológicas de los nevus benignos son un diámetro pequeño (menor de 5 ó 6 mm), sin ulceración, presentadas uniformemente, simétricas y bien circunscritas como placas, pápulas o nódulos con un color que varía desde rosado o rojizo a tostado<sup>7,10,12,21</sup>. Se pueden encontrar en todos los rangos de edad, aunque es más frecuente en la infancia y adolescencia (<20 años). Se suelen presentar en cabeza y cuello y, más frecuentemente, en las extremidades inferiores<sup>10,12,y 22</sup>. Generalmente contienen nidos de células grandes, epitelioides, fusiformes o una mezcla de ambas, orientados verticalmente con forma de cuña<sup>23</sup>. La presencia de un patrón pagetoide en la epidermis, en caso de existir, es focal, escasamente celular y limitada al centro de la lesión y la mitad inferior de la epidermis<sup>24</sup>. Es característico de los nevus la presencia de cuerpos de Kamino grandes y en ocasiones confluentes<sup>22</sup> pero aunque su presencia favorece el diagnóstico de benignidad solo están presentes en una minoría de casos.

A diferencia de los nevus, los melanomas spitzoides normalmente son lesiones más grandes (>6 mm, e incluso >1 cm), algunas veces ulceradas y tienen un continuo crecimiento, presentándose como placas, pápulas o nódulos grandes, asimétricos, con bordes irregulares y coloración heterogénea<sup>12,21,22</sup>. Suele haber un adelgazamiento de la epidermis, ulceración, nidos confluentes, grandes e irregulares y, con frecuencia un componente pagetoide periférico<sup>25,26</sup>. Presentan agregados nodulares o láminas de melanocitos, con maduración disminuida o ausente, localización profunda de la pigmentación melánica, infiltrados linfoides prominentes y necrosis<sup>26</sup>. De forma similar a los nevus, pueden encontrarse a cualquier edad y en cualquier parte del cuerpo, pero en el caso de las lesiones malignas, es más común en población adulta (> 40 años) en las extremidades y tronco<sup>12</sup>.

Los TSPMI pueden verse en pacientes de cualquier edad, pero de forma habitual se encuentran en adolescentes y adultos jóvenes (< 40 años) en extremidades y tronco<sup>12</sup>. Este tipo de tumores son más grandes que los nevus (entre 5 y 10 mm), pueden tener una forma asimétrica, bordes irregulares y una distribución desigual de la coloración; características que les puede hacer

indistinguibles de los melanomas spitzoides<sup>7,10,12,22</sup>. Pueden extenderse en profundidad en la dermis y en la grasa subcutánea, y pueden estar ulcerados. Pueden presentar un patrón pagetoide prominente. Suelen mostrar una elevada densidad celular, con confluencia de melanocitos en agregados o nódulos celulares que remplazan la dermis sin maduración. Los cuerpos de Kamino son menos frecuentes que en las lesiones benignas, más pequeños o ausentes<sup>12</sup>.

Tabla 1. Clasificación de las lesiones spitzoides en función de los parámetros clínicos, histopatológicos y citológicos. Adaptado de "Who Classification of Skin Tumours."<sup>12</sup>

	<b>Nevus</b>	<b>TSPMI</b>	<b>Melanoma</b>
<b>Parámetros clínicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Generalmente presente en la infancia o adolescencia (&lt;20 años)</li> <li>- Normalmente en extremidades</li> <li>- Placa, pápula o nódulo de color rosa o rojizo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Puede ocurrir a cualquier edad, más comúnmente en pacientes jóvenes (&lt;40 años)</li> <li>- Extremidades y tronco</li> <li>- Placa o nódulo</li> <li>- Color heterogéneo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Puede ocurrir a cualquier edad, más comúnmente en pacientes adultos (&gt;40 años)</li> <li>- Extremidades y tronco</li> <li>- Asimetría</li> <li>- Placa o nódulo grandes</li> <li>- Color heterogéneo</li> <li>- Lesión cambiante</li> <li>- Puede sangrar</li> </ul>
<b>Histopatología</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- &lt;5-6 mm</li> <li>- Simetría</li> <li>- Bien circunscrita</li> <li>- Hiperplasia epidérmica</li> <li>- Nidos orientados verticalmente con forma de cuña</li> <li>- Patrón pagetoide focal central (si lo hay)</li> <li>- Grandes cuerpos de Kamino</li> <li>- Maduración del componente dérmico</li> <li>- Pocas o ninguna mitosis (0-2/ mm<sup>2</sup>)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Normalmente entre 5 y 10 mm</li> <li>- Simetría o asimetría</li> <li>- Bien o pobremente circunscrita</li> <li>- Posible ulceración</li> <li>- Anidación irregular</li> <li>- Mayor celularidad</li> <li>- Mayor componente pagetoide que los nevus</li> <li>- Extensión dérmica más profunda que en los nevus</li> <li>- Maduración parcial o ausente</li> <li>- Cuerpos de Kamino pequeños, infrecuentes o ausentes</li> <li>- Mitosis profundas</li> <li>- Posible necrosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- &gt;5mm, a menudo &gt;10 mm</li> <li>- Normalmente con asimetría</li> <li>- Normalmente pobremente circunscrito</li> <li>- Ulceración</li> <li>- Nidos irregulares y confluentes</li> <li>- Patrón pagetoide puede ser extenso</li> <li>- Adelgazamiento de la epidermis</li> <li>- Falta de maduración</li> <li>- Normalmente &gt;6 mitosis/mm<sup>2</sup></li> <li>- Mitosis profundas/marginales o atípicas</li> <li>- Necrosis</li> </ul>
<b>Citología</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Células fusiformes y/o epitelioides grandes</li> <li>- Poco o ausente pleomorfismo nuclear</li> <li>- No atipia citológica de alto grado</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Células fusiformes y/o epitelioides grandes</li> <li>- Aumento de la relación núcleo/citoplasma, pleomorfismo e hiper cromasia nuclear</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Células fusiformes y/o epitelioides grandes</li> <li>- Atipia citológica de alto grado</li> </ul>

Históricamente se han utilizado para facilitar el diagnóstico de las neoplasias spitzoides varios marcadores (Tabla 2) inmunohistoquímicos (reguladores del ciclo celular y apoptosis, marcadores de diferenciación melanocíticos entre otros), con el objetivo de poder

subclasificarlas como nevus, melanoma o TSPMI: HMB45, Ki-67, p16, p21, p53, ciclina D1, SOX10, S100, o BAP1 (aunque actualmente los tumores melanocíticos con inactivación de BAP1 forman un grupo independiente de los spitzoides)<sup>2,22</sup>.

Tabla 2. Marcadores de diferenciación melanocíticas. Adaptado de Hillen et al.<sup>2</sup>

Marcador	Nevus	TSPMI	Melanoma	Utilidad
Ki-67	Expresión nuclear en el componente de unión o en dermis superficial; sin expresión significativa en la base de la lesión (<2% de los melanocitos)	Patrón similar a los nevus, pero con un índice de expresión mayor (2-10%)	Expresión elevada y difusa a lo largo de la lesión (>10%)	Útil
PHH3	Patrón similar a Ki-67	Patrón similar a Ki-67	Patrón similar a Ki-67	Útil
Ciclina D1	Mayor expresión que Ki-67	Datos no concluyentes	Datos no concluyentes	Datos no concluyentes
HMB45	Tinción citoplasmática limitada a la parte superior de la lesión	Datos no concluyentes	La expresión persiste profundamente. Pero el 25% de las metástasis son negativas	Ayuda limitada
S100	Tinción más débil que en melanoma	Datos no concluyentes	Tinción intensa	No útil
p16 o pérdida 9p	Intensa tinción nuclear y citoplasmática, pero también perfiles de tinción heterogéneos	Datos no concluyentes	Negativo La pérdida completa es infrecuente, pero sugiere malignidad	Puede ser útil
p53	Tinción nuclear baja	Datos no concluyentes	Tinción nuclear alta, pérdida en etapa tardía de p53	Datos no concluyentes
p21	Expresión intensa	Expresión intensa	Datos no concluyentes	Datos no concluyentes
BAP1*	No hay pérdida	11% con la inactivación de BAP1	Datos no concluyentes	*Puede tener valor en un subgrupo de lesiones anteriormente consideradas spitzoides con mutaciones BRAF V600E

#### 4.D. Parámetros moleculares

Las lesiones spitzoides, al ser muy heterogéneas, son difíciles de clasificar histopatológicamente. Para ello, junto al estudio inmunohistoquímico, se utilizan diversas técnicas moleculares (hibridación genómica comparada, hibridación *in situ* fluorescente, estudios mutacionales y/o genómicos).

##### 4.D.I. Hibridación genómica comparada e hibridación fluorescente *in situ*

La hibridación genómica comparada o CGH (comparative genomic hybridisation) se emplea desde la década de los años 90 para estudiar lesiones melanocíticas y es una técnica basada en arrays que permite analizar el genoma en busca de alteraciones en el número de copias o CNVs (copy number variations), que pueden ser ganancias o pérdidas de ADN. Estos arrays solo permiten estudiar CNVs, pero no otras alteraciones genómicas como pequeñas inserciones o deleciones (indels), mutaciones puntuales o translocaciones<sup>27</sup>. Sin embargo, esta técnica suele tener un uso restringido porque es muy laboriosa, cara y requiere una optimización y validación cuando la muestra está parafinada, por lo que por este motivo también se estudian ganancias o pérdidas de ADN utilizando la hibridación fluorescente *in situ* o FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)<sup>28</sup>.

La técnica de FISH utiliza sondas fluorescentes marcadas que se hibridan, en cortes de la muestra parafinada en los portaobjetos, con las secuencias de ADN complementarias específicas de un locus cromosómico, observándose posteriormente la señal en el núcleo celular a través de un microscopio de fluorescencia<sup>27</sup>.

El número de aberraciones normalmente se correlaciona con el grado de atipia, por lo que de forma general se pueden clasificar de forma acertada tumores spitzoides histológicamente benignos (con ninguna o solo una CNV) y malignos (múltiples CNVs), pero no es muy útil a la hora de diagnosticar las lesiones spitzoides ambiguas porque pueden tener pocas o muchas alteraciones<sup>2,27,29</sup>. En función de la aberración encontrada, la lesión podría ser clasificada de alto o bajo riesgo de comportamiento tumoral agresivo, aunque los criterios para esta subclasificación siguen siendo controvertidos y no universalmente aceptados.

Los nevus spitzoides pueden no tener ninguna CNV aunque se ha visto que aproximadamente el 20% tienen una ganancia en el cromosoma 11p, relacionada con una activación del gen HRAS. Aunque existía otro subgrupo de lesiones benignas que presentan una pérdida el número de copias en el gen BAP1 (cromosoma 3p21)<sup>2,22,27,30</sup>, actualmente ya se han excluido del grupo de tumores spitzoides.

Más del 95% de los melanomas spitzoides tienen múltiples aberraciones cromosómicas completas o de regiones subcromosómicas, como ganancias en 1q, 3p (MITF), 6p, 7q (BRAF), 7p, 8q, 17q y 20q, y pérdidas en 6q, 8p, 9p (CDKN2), 9q, 10q (PTEN), 10p y 11q<sup>22,27</sup>.

En los TSPMI pueden encontrarse ganancias en el número de copias de 1q, 6p, 7, 8q, 17q y 20q, y pérdidas en 6q, 8p, 9p y 10q<sup>31,32</sup>. Aunque la delección en homocigosis de la región 9p21 (CDKN2A) se ha asociado con una mayor agresividad en los tumores ambiguos<sup>31,32</sup>, otros estudios defienden que el estudio de esta región, tanto por FISH, CGH o MLPA (Multiplex Ligation dependent Probe Amplification), puede ser útil para diferenciar las lesiones TSPMI de los nevus, pero no para poder establecer su agresividad<sup>33,34</sup>.

Tanto la técnica de FISH como la CGH presentan limitaciones. El análisis FISH tiene un alto ratio de falsos negativos, y también pueden mostrar resultados falsos positivos debido a la tetraploidía presente en el 5-10% de los nevus<sup>2</sup>. En el array CGH se pueden obtener falsos negativos cuando el porcentaje de células tumorales en la muestra es menor al 50%<sup>27</sup>.

Actualmente se suele establecer un algoritmo diagnóstico basado en la combinación de estudios inmunohistoquímicos (p16, Ki67/Melan-A y HMB45), FISH (6p25, 8q24, 11q13, CEN9 y 9p21) y un panel CGH para el manejo de los tumores ambiguos<sup>32</sup>.

#### **4.D.II. Estudio mutacional**

Los estudios mutacionales realizados hasta ahora para subclasificar las lesiones spitzoides tienen resultados limitantes e inconsistentes. Los tumores spitzoides muestran una gran variabilidad genética, que difiere de las alteraciones encontradas en nevus convencionales (mutación BRAF V600E), en el melanoma convencional (mutaciones en los genes BRAF, NRAS o NF1) o en otras lesiones, como el nevus azul (mutaciones en los genes GNAQ y GNA11)<sup>2</sup>.

Sin embargo, aunque es poco frecuente, en algunos estudios sí se han encontrado mutaciones en los genes BRAF y NRAS en las lesiones spitzoides, con una frecuencia entre el 5-20% y el 0-5%, respectivamente<sup>5,22</sup>. Algunos autores<sup>35-39</sup> proponen llamar spitzoides a estas lesiones limitando el uso del término "Spitz" para aquellas que, con una morfología similar, carecen de mutaciones BRAF o NRAS y presentan las fusiones génicas típicas o la mutación de HRAS que describimos a continuación. Se debe a que dado que los nevus de Spitz no tienen mutaciones activadoras en los genes BRAF o NRAS, los melanomas spitzoides con estas alteraciones no estarían genéticamente relacionados<sup>35</sup>.

La mayoría de los tumores spitzoides que presentan una ganancia en el número de copias del gen HRAS tienen también una mutación en este gen (comúnmente HRAS G61K), que conlleva una activación en las rutas MAPK y PI3K/AKT/mTOR<sup>2,32</sup>. Las mutaciones de HRAS se han encontrado en el 15-20% de los nevos de Spitz y el 14% de los tumores spitzoides atípicos, pero solo se han descrito en dos casos de melanoma spitzoides<sup>22,32,35,40,41</sup>. Por lo tanto, esta alteración podría ayudar en el diagnóstico diferencial entre nevus y melanoma spitzoide, y acorde con los resultados obtenidos, las mutaciones en el gen HRAS parecen asociarse más frecuentemente a un comportamiento benigno<sup>2,22,32</sup>.

Wiesner y colaboradores<sup>42</sup> describieron una serie de tumores spitzoides con mutaciones germinales que presentan una pérdida de función en BAP1, gen que codifica una enzima encargada de la desubiquitinación y que es un supresor tumoral<sup>43</sup>. Posteriormente, el mismo autor describió TSPMI con mutaciones esporádicas en BAP1, que frecuentemente coexistían solo con mutaciones BRAF V600E<sup>44</sup>. Sin embargo, se identificaron nevus spitzoides con pérdida de BAP1 y una mutación en el gen NRAS<sup>30</sup>. La mutación de BAP1 se asocia a la pérdida por inmunohistoquímica (3p21)<sup>2,32,43</sup>. Sin embargo, como los tumores que tienen una inactivación de BAP1 tienen unas características histológicas peculiares, actualmente se consideran un subgrupo distinto a los spitzoides, el grupo de BAP1 inactivado<sup>22,32</sup>. Aunque se trata de un espectro desde las lesiones benignas a las malignas, la mayoría de las que presenta mutación de BRAF suele comportarse como benigna<sup>22,40</sup>.

En 2015 se reportaron unos tumores spitzoides con una mutación en el promotor del gen TERT<sup>25</sup>. En este estudio, 4 pacientes de una cohorte de 56 (23 TSPMI y 33 melanomas spitzoide) con una mutación en el promotor de TERT desarrollaron metástasis y murieron, mientras que el resto de pacientes sin esta variante sobrevivió, por lo que se asoció a un comportamiento agresivo y a un mal pronóstico<sup>2,25</sup>. Sin embargo, esta afirmación debe ser validada<sup>22</sup>. En un estudio posterior se estudiaron 24 muestras (15 nevus y 9 TSPMI/melanoma spitzoide), observándose que ninguno de los nevus tenía mutado el promotor de TERT, y solo dos tumores ambiguos/melanoma spitzoide presentaban mutaciones<sup>45</sup>. De estas dos lesiones, solo una desarrolló metástasis, pero a diferencia del estudio de Lee et al., ambos pacientes estaban vivos y libres de enfermedad tras un tiempo de seguimiento de 60 y 66 meses respectivamente<sup>45</sup>. Por lo tanto, las alteraciones en el promotor de TERT pueden ayudar a distinguir las lesiones spitzoides benignas de las ambiguas o malignas, pero no se puede garantizar que la mutación de TERT se pueda utilizar como biomarcador pronóstico de malignidad, y se debe confirmar con estudios prospectivos con un tiempo de seguimiento amplio<sup>40,45</sup>.



#### 4.D.III. Fusiones de kinasas

Un estudio realizado el año 2014 describió la existencia de fusiones en varias kinasas en el 51% de 140 pacientes con lesiones spitzoides<sup>46</sup>. El 55% de los nevus, el 56% de los atípicos y el 39% de los melanomas spitzoides presentaban fusiones, por lo que se encuentran en todo el espectro<sup>22,46</sup>. Las fusiones se pueden producir a partir de diversos reordenamientos genómicos, como translocaciones, inversiones, deleciones, duplicaciones o complejos reordenamientos<sup>47</sup>. Los genes de kinasas fusionados en las lesiones melanocíticas spitzoides son principalmente ROS1 (17%), ALK (10%), NTRK1 (16%), BRAF (5%) y RET (3%)<sup>22,40,46</sup>. Las fusiones son mutuamente exclusivas y no se encuentran en casos con mutaciones de HRAS o pérdida de BAP1<sup>46,48</sup>.

Las fusiones de ROS1 se encuentran sobre todo en los nevus y TSPMI, aunque están en el 9% de los melanomas spitzoides<sup>47</sup>. Su identificación es compleja porque no se asocian cambios histológicos o citológicos a las fusiones de ROS1, aunque se han descrito algunos patrones<sup>47,49</sup>. Se pueden detectar mediante inmunohistoquímica o por FISH<sup>49</sup>. Como los reordenamientos de ROS1 son mecanismos oncogénicos conocidos en otro tipo de tumores, y se correlacionan con las rutas de señalización MAPK/ERK y PI3K/AKT/mTOR, puede ser una diana terapéutica potencial en las lesiones melanocíticas spitzoides, aunque se requieren más estudios confirmarlo<sup>32,46</sup>.

Las fusiones de ALK se encuentran entre el 10 y 20% en los nevus y TSPMI, y aproximadamente en el 1% de los melanomas spitzoides<sup>46,50</sup>. Las lesiones con ALK translocado presentan unas características que permite distinguirlos mediante inmunohistoquímica de aquellos tumores con otras fusiones o sin fusiones<sup>48,50</sup>. Estas alteraciones se pueden también detectar por FISH o por RT-PCR<sup>32</sup>. Como ocurre con las fusiones de ROS1, las translocaciones de ALK, pese que no se asocian a un comportamiento biológico agresivo, pueden servir como diana terapéutica<sup>50</sup>.

Las translocaciones en el gen NTRK1 se encuentran entre el 10 y 20% de las lesiones spitzoides, siendo más frecuentes en los tumores ambiguos y en los nevus, que en los melanomas<sup>46,47,51</sup>. Tienen unas características histológicas asociadas, entre las que se incluyen la presencia de cuerpos de Kamino y rosetas<sup>40,46,51</sup>. Puede ser estudiada por inmunohistoquímica o FISH, y al igual que las anteriores fusiones, puede ser una diana terapéutica en aquellos tumores que sean agresivos y malignos<sup>47,51</sup>.

Aunque la presencia de mutaciones en el gen BRAF no es frecuente en las lesiones spitzoides, sí se han descrito translocaciones activantes, normalmente inversiones o deleciones con una frecuencia del 5% en todo el espectro<sup>46,47,51</sup>. Histológicamente forman un grupo heterogéneo, con una tendencia a una menor organización de crecimiento dérmico, y sin cuerpo de Kamino<sup>51</sup>.

Los casos con fusiones en BRAF suelen mostrar también ganancias en el dominio kinasa de la proteína fusionada, hecho que hace sospechar un elevado riesgo a progresar a melanoma<sup>40,51</sup>. Debido a que BRAF está expresado de forma constitutiva en muchos tumores melanocíticos, la inmunohistoquímica no se puede utilizar para detectar específicamente fusiones de BRAF, por lo que se deben utilizar otros métodos como el FISH<sup>32,47,51</sup>.

Los reordenamientos en el gen RET se encuentran en menos del 5% de las neoplasias spitzoides, y debido a esta baja frecuencia, no hay valores predictivos de su comportamiento biológico y clínico<sup>46,47</sup>.

En los últimos años, Yeh y colaboradores han descrito reordenamientos en los genes MET<sup>52</sup> y NTRK3<sup>53</sup>. Las fusiones de MET se encontraron en muestras clasificadas desde benignas hasta malignas, por lo que parece indicar que ocurren en las fases iniciales de progresión<sup>52</sup>. Del mismo modo, las fusiones de NTRK3 estaban presentes en muestras de todo el espectro<sup>53</sup>. Las fusiones de NTRK3 son mucho menos frecuentes en los TSPMI que las fusiones de NTRK1<sup>54</sup>.

#### **4.D.IV. Next-Generation Sequencing (NGS)**

La secuenciación masiva o Next-Generation Sequencing (NGS) permite obtener información molecular de varios genes en paneles dirigidos, el exoma o incluso el genoma completo; incluyendo cambios en el número de copias, mutaciones puntuales, pequeñas deleciones o inserciones y fusiones, ya que en función de la tecnología empleada, se parte de ADN, de ARN o de ambos simultáneamente<sup>27,29</sup>. De esta forma, empleando la NGS se pueden cubrir uno, varios o todos los biomarcadores descritos anteriormente estudiados por FISH, CGH, secuenciación Sanger o PCR a tiempo real. Los principales problemas de esta técnica son que se necesita una infraestructura computacional, un gran almacenamiento de datos, conocimientos bioinformáticos y un especialista a la hora de interpretar los resultados obtenidos, además de tener un elevado coste económico<sup>27</sup>. Sin embargo, el precio se reduce de forma cada vez más acelerada y se está instaurando en muchos centros de investigación y de diagnóstico, como los hospitales. Así, utilizando la NGS de forma rutinaria, se obtiene una gran información genómica que, junto con los datos histopatológicos, puede aportar una información predictiva de las lesiones spitzoides<sup>55,56</sup>.

#### **4.D.V. Otras técnicas**

En la última década se han utilizado otras técnicas moleculares para caracterizar, diagnosticar e intentar predecir el comportamiento de las lesiones spitzoides.

Se han realizado estudios del transcriptoma, es decir, del ARN mensajero (mRNA), a diferencia del FISH o CGH que utilizan ADN, ya que determinan qué genes están expresados de forma activa<sup>29</sup>. Para esto se han utilizado microarrays y PCR a tiempo real para validar los resultados<sup>29</sup>, hasta llegar a tecnologías más avanzadas como la secuenciación masiva del transcriptoma por NGS o técnicas digitales de perfiles de expresión de mRNA (NanoString)<sup>2,29,57,58</sup>.

Otra metodología utilizada ha sido la espectrometría de masas, capaz de analizar firmas proteómicas tanto en muestras congeladas en fresco como parafinadas<sup>2</sup>. Con esta técnica se logró clasificar correctamente nevus spitzoides con una sensibilidad del 97% y una especificidad del 90% en comparación con melanomas spitzoides<sup>59</sup>, y puede ayudar en la clasificación de los tumores atípicos (TSPMI)<sup>60</sup>.

#### **4.E. Epigenética: Metilación y miRNAs**

Debido a que todas las alteraciones moleculares descritas anteriormente no han sido capaces de distinguir con claridad el potencial comportamiento clínico de los tumores spitzoides ambiguos, es necesario recurrir a otras técnicas para encontrar biomarcadores predictivos<sup>2</sup>. Algunos estudios sugieren que los cambios epigenéticos como la metilación genética, la expresión de miRNAs o las modificaciones post-traduccionales, por ejemplo, pueden llegar a ayudarnos a clasificar correctamente las lesiones spitzoides y saber qué mecanismos participan en su progresión<sup>2,27,39</sup>.

Las modificaciones epigenéticas son aquellas que afectan al ADN o las proteínas histonas que cambian la estructura de la cromatina y modulan la legibilidad genómica, pero sin que cambie la secuencia del ADN<sup>61</sup>. Las más frecuentes son la metilación del ADN, las modificaciones de histonas y el ARN interferente (como los miRNAs)<sup>61,62</sup>. Las alteraciones epigenéticas pueden tener impacto sobre la formación del tumor, su progresión y tratamiento; por lo que estos cambios pueden ser biomarcadores para la detección del cáncer, un adecuado diagnóstico o estratificación y para una terapia dirigida<sup>62</sup>.

La metilación del ADN es una modificación epigenética ampliamente encontrada en estudios de melanoma, sugiriéndose su implicación en la formación y progresión tumoral<sup>63-65</sup>. Se debe a la adición enzimática de un grupo metilo (CH<sub>3</sub>-) en el carbono 5 del nucleótido citosina,

generalmente cuando está formando el dinucleótido CpG. Las regiones genómicas con una gran cantidad de dinucleótidos CpGs reciben el nombre de islas CpG y se sitúan en regiones reguladoras, como los promotores del extremo 5' de los genes<sup>61</sup>.

Existen diferentes técnicas para estudiar el grado de metilación del ADN<sup>66</sup>:

Hay técnicas para estudiar genes puntuales que requieren de una conversión previa con bisulfito como la secuenciación por Sanger, la pirosecuenciación, la Methylation-Specific PCR (MS-PCR), la Methylation-Specific High-Resolution Melting (MS-HRM) o EpiTyper (que utiliza espectrometría de masas). La conversión con bisulfito es una reacción mediante la cual las citosinas se convierten, en condiciones de pH bajo y alta temperatura, a citosinas sulfonadas, seguido de una deaminación a uracilos sulfonados, y finalmente convertidas en uracilos en un proceso de desulfonación alcalina. Por lo tanto, en la posterior amplificación por PCR, los uracilos se leen como timinas. Las citosinas que se encuentran metiladas no se ven afectadas por este cambio, por lo que tras la PCR se amplifican como citosinas. Otras técnicas se basan en el uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación (HpaII o MspI), que solo cortarían el ADN no metilado, como la Methylation-specific Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MS-MLPA, una variante de la técnica MLPA) o la inmunoprecipitación del ADN metilado (MeDIP).

Por otra parte, hay técnicas que permiten estudiar el grado de metilación a nivel genómico de forma global, sin analizar secuencias específicas sino el contenido total de citosinas metiladas (como ELISA o la espectrometría de masas), mientras que otras permiten establecer un perfil de metilación determinado, es decir, conocer el estado de todos los sitios CpGs de todo el genoma o gran parte de ellos. De estas últimas destacan los arrays de metilación, basados generalmente en la hibridación de secuencias, que permiten estudiar alrededor de 450.000 o 850.000 CpGs (Illumina Infinium HumanMethylation450K e Illumina MethylationEPIC Bead Chip, respectivamente) y las técnicas de NGS. La ventaja de la NGS es que evita la distorsión que se crea en la tecnología de microarrays al usar sondas específicas, diferencias específicas de alelos y amplificaciones. Las dos opciones más utilizadas son la Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS), donde cada citosina del genoma se analiza por lo que comporta un elevado coste de secuenciación y complejidad a la hora de realizar el análisis bioinformático, y la Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS). La RRBS requiere de una cantidad de ADN menor que la WGBS y tiene un coste económico menor, aunque tiene una menor cobertura. La RRBS realiza un enriquecimiento de las regiones ricas en CpGs (islas y promotores génicos) del genoma

mediante la digestión con la enzima MspI y una posterior selección de los fragmentos de ADN en función de su tamaño, previo a la conversión con bisulfito y secuenciación.

Hasta la fecha, no se ha profundizado en el estudio de cambios de metilación del ADN en las lesiones spitzoides. Takata *et al.* estudiaron, mediante la técnica MS-MLPA, 25 regiones correspondientes a genes supresores tumorales que suelen encontrarse silenciados por metilación (entre ellos, el gen CDKN2A) en una cohorte de 12 nevos spitzoides y 36 melanomas cutáneos primarios, observando que mientras que en los melanomas convencionales sí había metilación en algunos genes, no se detectó ninguna alteración en las muestras spitzoides<sup>67</sup>. Sin embargo, nuestro grupo de investigación describió una cohorte de 8 casos (3 TSPMI y 5 melanomas spitzoides), en las que 3 de ellos presentaban metilación en el gen CDKN2A (también mediante MS-MLPA), aunque la pérdida de expresión de este gen no es un criterio suficiente para predecir la agresividad de las lesiones spitzoides<sup>33</sup>.

Recientemente se ha descrito que existe una clara distinción en los patrones de metilación global entre melanoma, nevos comunes y los nevos spitzoides<sup>68</sup>. Para ello, partieron de una cohorte de 6 nevos spitzoides, y un grupo control compuesto por 8 nevos benignos y 8 melanomas malignos. En este estudio, los patrones de metilación de los nevos de Spitz son homogéneos y están claramente diferenciados de los melanomas convencionales, cuyo patrón es heterogéneo, y puede deberse al carácter benigno de las lesiones nevus.

Los miRNAs o microRNAs son moléculas de ARN no codificante de una longitud entre 19 y 22 nucleótidos, presentes en todas las células<sup>69</sup>. Los miRNAs se unen a regiones complementarias en la región 3' de ARNs mensajeros (mARN) diana y actúan inhibiendo su traducción a proteína. Un único miRNA puede inhibir diversos mARN y, por tanto, su capacidad reguladora es muy extensa, pudiendo influir en muchos aspectos de la progresión tumoral, como pueden ser la proliferación celular, migración, invasión, angiogénesis y resistencia a apoptosis<sup>70</sup>.

Los perfiles de expresión de los miRNAs varían en función del tipo de cáncer, por lo que pueden utilizarse como dianas diagnósticas o terapéuticas dirigidas a tumores<sup>70</sup>.

Hasta ahora solo se han realizado dos estudios de expresión de miRNAs en lesiones spitzoides por el mismo grupo de investigación, utilizando PCR a tiempo real<sup>71</sup> y mediante la plataforma NanoString nCounter<sup>72</sup>.

De los resultados obtenidos del estudio empleando la técnica de PCR a tiempo real podemos extraer que puede haber perfiles de expresión de miRNAs en las lesiones spitzoides, ya que se

observa que la expresión de miR-21 y miR-155 es mayor en melanomas spitzoides en adultos respecto tanto a los nevus como a los TSPMI, mientras que en los niños, miR-21 está infraexpresado en tumores spitzoides benignos y sobreexpresado en melanomas spitzoides al compararse con los TSPMI<sup>71</sup>.

Con la plataforma NanoString se pudo validar que los melanomas spitzoides expresan una mayor cantidad de miR-21 y miR-155 que las lesiones spitzoides benignas<sup>72</sup>. Los TSPMI muestran una reducción en la expresión de miR-155 y un aumento de miR-451 respecto a los melanomas spitzoides, mientras que comparando los TSPMI con los nevus spitzoides se observa un incremento de expresión de miR-21, miR-34a, miR-451, miR-1283 y miR-1260a en los tumores atípicos<sup>72</sup>. Estos resultados sugieren que hay un incremento de expresión de miR-21 desde las lesiones spitzoides benignas hasta las lesiones malignas, aunque es necesario realizar más estudios al respecto<sup>72</sup>.

#### **4.F. Problemas diagnósticos, pronósticos, psicológicos y económicos**

Pese que desde la primera descripción de las lesiones spitzoides hasta ahora se han conseguido avances significativos en el conocimiento genómico de éstas y, aunque las técnicas moleculares son prometedoras para complementar el estudio histológico, aún no se han identificado alteraciones capaces de definir el diagnóstico adecuado y el pronóstico de los tumores spitzoides de potencial maligno incierto<sup>2,32,43</sup>. Este requisito parece necesario para poder asignar a los pacientes con lesiones melanocíticas spitzoides un tratamiento, manejo clínico y seguimiento personalizado y preciso.

Este trabajo dedica gran atención a los tumores melanocíticos spitzoides de potencial maligno incierto (TSPMI), que tienen una baja incidencia, pero cuyo comportamiento clínico no puede predecirse con los criterios diagnósticos actuales. Además, es importante señalar que afectan con frecuencia a niños y adolescentes. Con la firma epigenética que se pretende encontrar queremos ser capaces de subclasificar los tumores melanocíticos spitzoides en función de su grado (alto o bajo) de malignidad y proporcionar a los profesionales clínicos una aproximación para que puedan tomar una decisión de manejo clínico apropiada. De esta forma, se aspira a ofrecer una solución rápida, precisa y segura, para ponerla a disposición de los sistemas nacionales de salud para su aplicación generalizada en la clínica diaria.

Estos biomarcadores epigenéticos podrían evitar la realización, tanto para el diagnóstico como para la terapia, de técnicas invasivas, de precio elevado y/o que exigen mucho tiempo de trabajo de los profesionales de la salud (como el estudio de ganglio centinela, PET u otras técnicas de

imágenes o terapias adyuvantes innecesarias) para aquellas lesiones de bajo grado de malignidad para las que es previsible un bajo riesgo de evolución clínica adversa. Actualmente, la ausencia de alteraciones cromosómicas en tumores spitzoides sugiere una naturaleza benigna, siendo la escisión quirúrgica de las lesiones la única recomendación. Por otra parte, la presencia de una gran cantidad de alteraciones genéticas se considera un criterio a favor de malignidad. Sin embargo, los casos con algunas aberraciones genéticas se interpretan como tumores spitzoides atípicos, ambiguos o de potencial maligno incierto. En estos casos, los médicos aconsejan a los pacientes y a sus familiares sobre los riesgos y beneficios que conllevan los estudios adicionales para clasificarlas, por ejemplo, mediante la biopsia del ganglio centinela. De esta forma, el diagnóstico de este tipo de lesiones ambiguas provoca ansiedad y estrés, no únicamente a los pacientes, sino también a los patólogos y a los clínicos a cargo del paciente (dermatólogos y oncólogos), además del elevado coste económico de este tipo de intervenciones.

En aproximadamente el 30% de los tumores spitzoides ambiguos se encuentran ganglios centinela positivos. Sin embargo, únicamente el 1% de los pacientes con tumores spitzoides desarrollarán metástasis a distancia y morirá por la enfermedad. Esta situación inusual y paradójica es una de las principales dificultades a la hora de estudiar este tipo de lesiones, ya que se requieren instituciones con un gran bagaje y conocimiento de los tumores spitzoides, un tiempo de seguimiento largo, así como la colaboración entre ellas para conseguir grandes cohortes para poder identificar estos individuos<sup>72</sup>. Lamentablemente, en la actualidad, no disponemos de ningún test ni prueba diagnóstica que resuelva de forma efectiva el reconocimiento de qué pacientes van a desarrollar metástasis a distancia, y es por ello por lo que se tiende a sobrediagnosticar como malignos la mayoría de tumores spitzoides atípicos.

El uso de biomarcadores epigenéticos puede reducir drásticamente el coste económico y el impacto emocional del diagnóstico de los tumores spitzoides ambiguos. Se estima que la incidencia de los tumores spitzoides afecta de 1,4 a 7 de cada 100.000 personas por año, en todo el espectro poblacional, aunque más frecuentemente a personas por debajo de los 40-50 años y con elevada presencia en la infancia y adolescencia<sup>8</sup>. Aproximadamente el 49% de los tumores spitzoides son ambiguos o difíciles de clasificar<sup>73</sup>. Si aplicamos estos porcentajes a la población española y europea (47.000.000 y 742.000.000, respectivamente), se pueden esperar alrededor de 1.600 tumores spitzoides ambiguos en España y sobre 25.450 casos en Europa por año. Basándonos en la literatura <sup>74-76</sup>, estimamos que el coste de las técnicas de imagen de vigilancia y la biopsia del ganglio centinela (recomendado para este tipo de pacientes<sup>77</sup>) es de aproximadamente 11.000€ por paciente. Por lo tanto, el coste económico total por año en

España sería de 18 millones de euros y alrededor de 254 millones de euros en Europa. A estos costes médicos directos hay que añadir el coste de la hospitalización en caso de que sea necesaria, los costes médicos indirectos (el tiempo de los profesionales sanitarios), los costes directos no médicos (como los desplazamientos a los centros de salud, gastos imprevistos o la atención recibida por los pacientes) y los costes indirectos no médicos (el tiempo del paciente y familiares tanto laboral como personal o la pérdida de productividad laboral)<sup>78</sup>.

Además, es muy importante reconocer que existe una consistente evidencia de que alrededor del 20 al 30% de los pacientes con diagnóstico de tumores melanocíticos malignos experimentan niveles significativos de estrés y angustia emocional, por lo que este puede aumentar cuando el diagnóstico que reciben es de tumor melanocítico de potencial maligno incierto. En estos últimos casos, además, hay estrés en los profesionales sanitarios que tratan con el paciente<sup>79</sup>. Hay evidencias que sugieren que ofrecer información, soporte emocional y cuidados psicológicos a pacientes con tumores puede ser beneficioso a largo plazo, tanto para el paciente como para el sistema sanitario<sup>78</sup>.



## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.A. Diseño de estudio y selección de pacientes**

El presente trabajo consiste en un estudio de carácter retrospectivo, analítico y observacional basado en 105 muestras tumorales de pacientes con lesiones melanocíticas cutáneas spitzoides clasificadas según su diagnóstico en benignas/nevus (39), malignas/melanoma spitzoide (22) y tumores spitzoides atípicos de potencial maligno incierto o TSPMI (44).

Las muestras tumorales se recibieron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia desde el 1 de enero de 1990 hasta el 31 de diciembre de 2017. Las diferentes técnicas se realizaron a partir de muestras fijadas en formaldehído e incluidas en parafina (FFPE).

Se realizó una revisión de las muestras tumorales valorándose los datos histopatológicos relevantes según la literatura (ver sección de antecedentes y estado actual del tema). Los parámetros clínicos anotados son: el género, la edad en el momento del diagnóstico, localización, recurrencia local, metástasis regional y a distancia, y supervivencia específica por la neoplasia de los pacientes. Los parámetros histológicos valorados son: el tamaño de la lesión, distribución (juntural, compuesto, intradérmico, metástasis), afectación de dermis profunda, simetría, ulceración, componente pagetoide, formación de masa expansiva, densidad celular, mitosis por milímetro cuadrado, mitosis atípica, mitosis profunda/marginal, atipia/pleomorfismo, maduración, presencia de cuerpos de Kamino, infiltrado linfocitario peritumoral e intratumoral, consunción de la epidermis (COE), elastosis solar, pigmentación, esclerosis/desmoplasia, tipo de célula predominante (epiteloide, fusiforme, mixta), pulverocitos y necrosis. En todos los melanomas spitzoides, además, se valorará el índice de Breslow.

Se realizó el seguimiento clínico de los pacientes hasta el mes de julio de 2021.

### **5.B. Extracción de ácidos nucleicos**

A partir de la laminilla teñida con hematoxilina-eosina de cada muestra se seleccionó la zona tumoral óptima y representativa de la lesión del bloque parafinado. Empleando un tissue arrayer manual se obtuvieron cilindros (punch) de estas regiones en los bloques de parafina correspondientes.

La extracción de los ácidos nucleicos, tanto ADN como ARN, se realizó empleando el kit AllPrep DNA/RNA FFPE (Qiagen, nº de catálogo 80234) partiendo de los cilindros de parafina, realizando pequeñas modificaciones respecto al protocolo original. La ventaja principal que ofrece este kit

es la posibilidad de obtener de forma simultánea ADN genómico y ARN de la misma región tumoral, permitiendo así poder realizar distintas técnicas en lesiones pequeñas y poco frecuentes.

Brevemente, este protocolo de extracción consiste primero en retirar la parafina y secar el pellet. Para eliminar la parafina se añadieron 320 µl de la solución de desparafinación (Qiagen, nº de catálogo 19093), se incubaron a 56°C durante tres minutos, se dejan enfriar a temperatura ambiente y se centrifugan las muestras durante dos minutos a máxima velocidad. Cuidadosamente se retira el sobrenadante, que contiene la solución de desparafinación. Para secar el pellet, los tubos con las muestras se incubaron a 37°C durante 10 minutos.

A continuación, el tejido se lisa, ya que el pellet se resuspende con 150 µl del tampón de digestión PKD y se añade proteinasa K. Para la digestión, las muestras se incuban a 56°C durante 15 minutos. Seguidamente, se enfría en hielo y se centrifuga 15 minutos a máxima velocidad para separar un sobrenadante rico en ARN y un pellet con la fracción de ADN. El sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo para la purificación del ARN. La extracción final se realiza de forma secuencial, primero ARN y después ADN.

El sobrenadante, que contiene el ARN, se incuba a 80°C durante 15 minutos, se centrifuga brevemente para eliminar las gotas que se encuentran en el tubo. Este será el material de partida para la extracción automática con el QIAcube nucleic acid purification system (Qiagen, nº de catálogo 9002864). Dentro del robot de extracción, se procede con la adición de 320 µl de tampón RLT para ajustar las condiciones de unión del ARN a la columna y se añaden 1.120 µl de etanol 100%. Se transfiere todo el volumen a la columna RNeasy MinElute, situada en nuevo tubo de 2 ml, se centrifuga durante 15 segundos a 10.000 rpm y se descarta el eluido. Se añaden 350 µl del tampón FRN a las columnas, se centrifuga de nuevo durante 15 segundos a 10.000 rpm y se descarta el eluido. Se añade un mix que contiene DNasa I y tampón RDD para eliminar los posibles restos de ADN que pueda contener la muestra. La muestra se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añaden 500 µl del tampón FRN, se centrifuga durante 15 segundos a 10.000 rpm, y se guarda el eluido. Las columnas se sitúan en un nuevo tubo de 2 ml, se añade el eluido obtenido en el paso anterior y se centrifuga durante 15 segundos a 10.000 rpm, descartándose el eluido. La columna se lava con 450 µl de tampón RPE, se centrifuga, se descarta el eluido. Se vuelve a repetir el paso anterior. Se realiza una centrifugación a máxima velocidad durante 5 minutos, descartándose el tubo de recogida con el eluido. Finalmente, se sitúa la columna, con el ARN retenido, en el tubo de colección final, se añaden 30 µl de agua

libre de nucleasas, se centrifuga durante 1 minuto a máxima velocidad y se guarda el ARN para su uso posterior.

Por otra parte, el pellet obtenido que contiene el ADN es resuspendido con 180 µl de tampón ATL (tampón de lisis), se añaden 40 µl de proteinasa K (para la digestión de proteínas) y se mezcla con el uso del vórtex. Se incuba a 56°C durante toda la noche, en vez de a 1 hora, para mejorar el rendimiento de la extracción de ADN. A continuación, se incuban los tubos a 90°C durante 1 hora para revertir parcialmente las modificaciones de los ácidos nucleicos causados por el formaldehído. Una vez acabada esta incubación, se sitúan los tubos en el QIAcube nucleic acid purification system para la extracción automática del ADN. En él, a cada muestra se añaden 200 µl de tampón AL y 200 µl de etanol al 100%, mezclándose inmediatamente vorteadando. Se transfiere toda la muestra a las columnas QIAmp MinELute, se centrifugan 3 minutos a 13.400 rpm y se descarta el eluido. Las columnas se sitúan en un nuevo tubo de colección, y se lavan con el tampón AW1 (700 µl) y se centrifuga 15 segundos a 10.000 rpm. Se descarta el eluido y se realiza otro lavado, esta vez con el tampón AW2. Se añaden 700 µl de etanol al 100%, se centrifuga durante 15 segundos a 10.000 rpm, se descarta el eluido y la columna se sitúa en un nuevo tubo de colección, que es centrifugado a velocidad máxima durante 5 minutos para eliminar las impurezas y restos de tampones. Las columnas se transfieren a los tubos de elución finales, se añaden 30 µl de tampón TE-Low, se centrifuga a máxima velocidad durante 1 minuto y se guarda el ADN para los futuros estudios.

La ventaja que presenta este protocolo es que no utiliza trizol durante la extracción de los ácidos nucleicos, compuesto que inhibiría la posterior fragmentación enzimática con MspI que se realizará durante la RRBS.

Después de la extracción, se cuantificaron tanto el ADN como el ARN con el espectrofotómetro UV-VIS Nanodrop One (ThermoFisher Scientific).

### **5.C. Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS)**

La tecnología Reduced Representation Bisulfite Sequencing (RRBS) ha sido la metodología empleada para la obtención de los datos epigenómicos de las muestras tumorales de nuestros pacientes. Se basa en que la metilación del ADN en vertebrados ocurre principalmente en dinucleótidos CpG y utiliza la enzima de restricción MspI para generar fragmentos genómicos que empiezan y finalizan con un dinucleótido CpG, independientemente del estado de metilación del ADN. Debido a su versatilidad y su reproducibilidad, la RRBS es la tecnología de elección para realizar un análisis de metilación de forma precisa y a escala genómica.

La RRBS permite mapear la metilación del ADN a nivel genómico con buena resolución y con una cobertura teórica de entre 3,5 y 4 millones de dinucleótidos CpG del genoma humano, lo que supone una cobertura de entre 5 y 10 veces superior a la de los microarrays para metilación de ADN que están disponibles comercialmente.

La metodología RRBS cubre las islas CpG, regiones promotoras y otros elementos funcionales incluyendo enhancers, bordes de las islas CpG y ARNs no codificantes. Se optó por emplear esta metodología atendiendo a varias razones, entre las que se encuentran la viabilidad para ser aplicada a muestras parafinadas, la compatibilidad con muestras que presentan baja cantidad de ADN, el tamaño de la colección de muestras (40), la cobertura genómica y la eliminación de los efectos de tandas (batch effects) relativos al uso de microarrays y que no presentan las metodologías de secuenciación. La Whole Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) se descartó por su elevado coste de secuenciación y por los requerimientos de ADN de las muestras.

Debido a la complejidad del experimento y por no disponer de los equipos necesarios, la secuenciación RRBS la ha llevado a cabo la empresa belga Diagenode, S.A. ([www.diagenode.com](http://www.diagenode.com)) empleando el secuenciador de última generación (o Next Generation Sequencing, NGS) Illumina HiSeq 3000. Se requiere una concentración de ADN mínima de 5 ng/ $\mu$ l, en un volumen mayor de 10  $\mu$ l, siendo necesarios un mínimo de ADN total de 100 ng.

La concentración del ADN se analizó con el sistema de fluorometría Qubit (ThermoFisher Scientific), empleando los kits Qubit dsDNA BR y HS, en función de la muestra, mientras que la calidad del ADN genómico mediante el Fragment Analyzer (Advanced Analytical) con los kits DNF-487 Standard Sensitivity y/o DNF-488 High Sensitivity.

El protocolo de la RRBS consta de los siguientes pasos:

1) Digestión enzimática:

- Se realiza una digestión del ADN genómico de las muestras (entre 100 y 300 ng) con la enzima de restricción MspI con una incubación de 12 horas a 37°C en una placa de 96 pocillos. La enzima MspI reconoce los sitios CCGG, por lo que se enriquece el ADN para representar regiones genómicas ricas en CpG que son particularmente relevantes para la regulación epigenética. Estas regiones incluyen islas CpG (regiones donde existe una gran concentración de pares de citosina y guanina), orillas de islas CpG (CpG island shores) (zonas no asociadas a promotores (aunque cercanas) que se han denominado CpG islands shores (orilla de islas CpG) y que se metilan de forma diferencial en cáncer), potenciadores (enhancers) y otros elementos reguladores del genoma. El

enriquecimiento de las regiones objetivo más interesantes logra una reducción en el coste de la secuenciación de un factor de 10-20 en comparación con la secuenciación de bisulfito del genoma completo.

2) Preparación y reparación del final de la secuencia:

- Se lleva a cabo una única reacción por muestra en la que se rellena el hueco creado en el extremo terminal 3' por la acción de la enzima MspI, añadiendo una base adenina extra que será necesaria para la ligación del adaptador específico, tanto en las hebras positivas como negativas. Para ello, al ADN digerido previamente se le añade un mix que contiene la enzima que realizará la adición de los nucleótidos, un mix de nucleótidos y controles internos adicionales metilados y no metilados para monitorear con precisión las eficiencias de conversión de bisulfito.
- En un termociclador se sigue el siguiente programa: 20 minutos a 30°C, 20 minutos a 37°C, 20 minutos a 75°C y se mantuvo a 8°C hasta el siguiente paso.

3) Ligación de adaptadores y selección por tamaño:

- Se añaden 5 µl de adaptadores por pocillo, mientras se prepara un mix de ligación con la enzima y el tampón necesario y se distribuyen 41 µl de este mix a las muestras. Las muestras junto con los adaptadores y el mix de ligación se ponen en el termociclador y se corre el programa: 20 minutos a 25°C, 10 minutos a 65°C y se mantiene a 8°C.
- A temperatura ambiente se añaden 60 µl de AMPure XP Beads (Beckman Coulter), y se incuban 15 minutos para permitir que el ADN se una a las esferas. La placa se sitúa en una placa magnética durante 5 minutos o hasta que el sobrenadante sea claro. Se elimina el sobrenadante cuidadosamente para no tocar las bolas. Se realizan dos lavados de 5 segundos con 100 µl de etanol al 80%, secándose durante al menos tres minutos entre lavados. Finalmente se añaden 25 µl del tampón de resuspensión a cada pocillo, se vortea para resuspender las esferas y se incuban las muestras durante 5 minutos fuera de la placa magnética para eluir el ADN. Se vuelve a situar las muestras en la placa magnética durante 5 minutos y se posteriormente se transfiere el supernadante a una nueva placa de pocillos para descartar las esferas. Las esferas retienen los fragmentos de biblioteca mientras se elimina de manera eficiente los dímeros del adaptador, lo que da como resultado una mayor cobertura genómica. En

este proceso, no hay etapas de limpieza para minimizar así la pérdida de material durante la preparación.

#### 4) Cuantificación y pools de muestras:

- Para la realización de la librería, primero se cuantifica el ADN de las muestras, por duplicado, mediante una PCR en tiempo real. Se añaden 3  $\mu\text{l}$  de cada muestra en una nueva placa de 96 pocillos y se guarda el resto de muestras a -20°C. Se añaden 6  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas en cada pocillo, y 7  $\mu\text{l}$  de un mix que contiene Master Mix de la qPCR, un mix de primers y agua. La placa se sitúa en un termociclador y se corre el programa:
  - 1 ciclo: 3 minutos a 98°C (Desnaturalización inicial)
  - 25 ciclos: 15 segundos a 95°C (Desnaturalización) + 30 segundos a 60°C (Alineamiento) + 30 segundos a 72°C (Extensión)
  - Mantener a 4°C
- Se realizan pools de 8 muestras para optimizar el proceso, reducir el tiempo de procesamiento manual de las muestras y el consumo de reactivos, en función de los valores Ct obtenidos en la PCR a tiempo real de cuantificación anterior, juntando muestras con concentraciones similares. Se añaden 240  $\mu\text{l}$  de esferas AMPure XP a cada pool, se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente para que el ADN se una a ellas. Se sitúa cada uno de los pools en el rack magnético DiaMag1.5 (ThermoFisher Scientific) durante 5 minutos o hasta que el sobrenadante se aclare, se retira y se descarta el sobrenadante. Se lava dos veces con 500  $\mu\text{l}$  de etanol al 80% durante 5 segundos. Las esferas se secan a temperatura ambiente durante 10 minutos, con la tapa abierta dentro del rack magnético. Se añaden 36  $\mu\text{l}$  de tampón de resuspensión a cada tubo, y se incuban durante 5 minutos fuera de la placa magnética para eluir el ADN. Se vuelve a situar el tubo con el pool en el rack magnético durante 5 minutos o hasta que el sobrenadante se aclare, y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo.

#### 5) Conversión con bisulfito:

- La conversión con bisulfito se realizó bajo condiciones de mínima degradación del ADN y máxima eficiencia de conversión de las citosinas no metiladas. La metilación protege de la conversión, por lo que sólo las citosinas no metiladas son convertidas en uracilos que serán leídos como timinas.

- Antes de empezar, se añaden 10 ml de etanol 100% a 2,5 ml del tampón de lavado.
- Se añaden 790 µl del tampón de solubilización y 300 µl del tampón de dilución a un tubo del reactivo de conversión (que está en estado sólido), se mezcla con el uso del vórtex a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añaden 160 µl del tampón de reacción y se mezcla durante un minuto.
- Se ponen 33 µl de cada pool de librería en una tira de tubos de PCR, y se añaden 117 µl del reactivo de conversión, se mezclan y se incuban en el termociclador con el siguiente programa:
  - 20 ciclos: 1 minuto a 95°C (Desnaturalización) + 10 minutos a 60°C (Conversión)
  - Mantener a 4°C
- Se colocan unas columnas en los tubos de colección. Sobre las columnas se añaden 600 µl del tampón de unión y, a continuación, se añaden los pools de librerías convertidas con bisulfito. Se mezcla mediante inversión del tubo varias veces y se centrifuga a máxima velocidad durante 30 segundos, descartándose el eluido.
- Se añaden 100 µl del tampón de lavado a cada columna, se centrifuga a máxima velocidad durante 30 segundos, y se descarta el eluido.
- Se añaden 200 µl de tampón de desulfonación a cada columna, se incuba a temperatura ambiente durante 30 minutos, se centrifuga a máxima velocidad durante 30 segundos, y se descarta el eluido.
- Se añaden 200 µl de tampón de lavado a cada columna, se centrifuga a máxima velocidad durante 30 segundos, y se descarta el eluido. Se repite este paso una vez.
- La columna se sitúa en un nuevo tubo de 1,5 ml, se añaden 22 µl del tampón de elución directamente en el centro de la matriz de la columna, se espera durante 2 minutos y se centrifuga durante 30 segundos a máxima velocidad para eluir el ADN. El eluido se vuelve a transferir a la membrana, donde se incuba a temperatura ambiente dos minutos y se vuelve a centrifugar 30 segundos a máxima velocidad.
- Como el ADN convertido con el bisulfito es altamente inestable, es recomendable proceder al enriquecimiento de la PCR lo más pronto posible, por lo que se procede a determinar el ciclo óptimo de PCR. Para ello se transfieren

9 µl del mix de cuantificación, que consta de Master Mix de la PCR cuantitativa, un mix de primers y agua, a una nueva placa de PCR de 96 pocillos. Se añade 1 µl de cada librería convertida con bisulfito a la placa, y en el termociclador se corre el siguiente programa:

- 1 ciclo: 3 minutos a 98°C (Desnaturalización inicial)
- 30 ciclos: 15 segundos a 95°C (Desnaturalización) + 30 segundos a 60°C (Alineamiento) + 30 segundos a 72°C (Extensión)
- Mantener a 4°C

Se analizan los valores de Ct. El número de ciclo óptimo para el enriquecimiento por PCR es generalmente Ct – 1.

6) PCR de enriquecimiento, purificación y control de calidad:

- Se prepara el mix de amplificación con el master mix de la enzima *MethylTaq*, un mix de primers y agua. Se determina el número de ciclos para la amplificación que se necesiten en función del Ct obtenido en el paso anterior. En caso de tener Ct distintos para los diversos pools, se necesitarán diferentes placas de PCR de 96 pocillos. En cada pocillo añadimos 31 µl del mix de amplificación y 19 µl de la librería convertida con bisulfito. Se incuban en el termociclador con el programa:
  - 1 ciclo: 5 minutos a 95°C (Desnaturalización inicial)
  - Ct-1 ciclos (Ct obtenido en la qPCR del paso anterior): 20 segundos a 98°C (Desnaturalización) + 15 segundos a 60°C (Alineamiento) + 45 segundos a 72°C (Extensión)
  - 1 ciclo: 7 minutos a 72°C (Extensión final)
  - Mantener a 4°C
- Para la purificación, se añaden 50 µl de las esferas *AMPure XP Beads* y se mezcla pipeteando al menos 10 veces. Se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente para que el ADN se una a las esferas y se coloca en una placa magnética de 96 pocillos durante 5 minutos o hasta que el sobrenadante se aclare. Se elimina y descarta el sobrenadante. Posteriormente se lava dos veces durante 5 segundos con 100 µl de etanol al 80%. Se dejan secar durante 10 minutos antes de resuspender las esferas en 15 µl del tampón de resuspensión y se incuba durante 5 minutos para eluir el ADN de las esferas. Se coloca la placa en un rack magnético durante 5 minutos o hasta que el sobrenadante se aclare, y se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml por cada pool.



- Se realiza el último control de calidad antes de secuenciar la librería, determinando la concentración de los pools mediante el kit Qubit dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher Scientific), basado en la fluorescencia. Además, se corre parte del pool de las librerías en un chip de Agilent High Sensitivity para el BioAnalyzer (Agilent) para comprobar la calidad de la muestra.

Para la secuenciación se empleó la plataforma Illumina HiSeq 3000, de lectura simple (solo se secuencia desde un extremo) y con una longitud de lectura de 50 pares de bases (SR50). Permite conseguir hasta 40 millones de lecturas por muestra cuando se utilizan pools de 8 muestras, y detectar el estado de metilación de entre 3 y 4 millones de CpGs (con una cobertura media de 10-15X).

Como consecuencia de la digestión enzimática con la enzima MspI todas las lecturas de la RRBS empiezan con la misma base, por lo que se puede reducir la eficiencia de la agrupación durante la secuenciación. Para solucionar este problema, se deben aplicar parámetros de secuenciación para bibliotecas de baja diversidad durante la secuenciación. Éstos son el análisis de 8 muestras humanas por pool, un 5% de secuencias control Illumina PhiX, una densidad de cluster por debajo del 30% del rango óptimo para la versión de la química y plataforma, y que la versión del software del secuenciador HiSeq 3000 sea el HCS 3.4.0.38 o más actual.

Las lecturas crudas, o raw data, obtenido tras la secuenciación son archivos fastq que contienen las lecturas de la secuenciación de las muestras. El análisis bioinformático preliminar realizado por Diagenode incluye un control de calidad de estas lecturas utilizando el programa FastQC, que genera archivos de calidad de las bases post-filtrado. Como las lecturas obtenidas en la RRBS tienen elevada duplicidad debido a la baja diversidad en comparación con la secuenciación del genoma completo, y porque mayormente las secuencias tienen un tamaño pequeño, las lecturas pueden incluir sitios MspI reconstituidos artificialmente, artefactos de secuenciación y/o partes de la secuencia de los adaptadores. Por todo esto, las lecturas obtenidas deben ser recortadas antes del alineamiento, utilizando el programa *Trim Galore!* (Versión 0.4.1).

Debido a la conversión con bisulfito, las lecturas no se van a alinear a la secuencia genómica de forma correcta y puede haber versiones diferentes de la misma lectura en función de la eficiencia de la conversión de las bases. Por lo tanto, no se puede utilizar un programa convencional para el alineamiento, tal como el BWA o el Bowtie, para muestras convertidas con bisulfito, sino que se debe utilizar un alineador específico, como el Bismark o el BSMAP (el BSMAP tiene una versión específica diseñada para los datos obtenidos tras RRBS, RRBSMAP). En

este caso, las lecturas se alinean al genoma de referencia hg19 utilizando el software Bismark v0.16.1, obteniendo archivos bam.

Una vez las lecturas están alineadas, se pueden conocer los niveles de metilación de las bases. De los archivos que se extraen del software Bismark anteriormente citado se pueden crear archivos bedGraph o WIG que se pueden ver en un navegador como UCSC Genome Browser para verificar los niveles de metilación visualmente, o se pueden extraer regiones interesantes en los archivos BED basados en criterios de metilación y se pueden anotar, por ejemplo, para ver qué genes se ven afectados por la hipermetilación o la hipometilación en una determinada muestra.

Durante la RRBS se utilizan controles metilados y no metilados spike-in que sirven para monitorizar la eficiencia de la conversión con bisulfito. Como se conoce su nivel de metilación, pueden ser utilizados para evaluar el ratio de conversión, es decir, si se secuencian todos los controles metilado, todas las lecturas deben alinearse solo con la secuencia de referencia metilada si la relación de conversión fue del 100%.

#### **5.D. Estudio bioinformático**

A partir de los datos obtenidos por la secuenciación RRBS de 40 tumores melanocíticos spitzoides (13 nevus, 18 TSPMI y 9 melanomas) se pretende comparar el estado de metilación de las citosinas entre los grupos experimentales para obtener sitios o regiones diferencialmente metiladas y poder diagnosticar la evolución de las muestras del grupo TSPMI. Para ello se precisó de la ayuda bioinformática de la empresa Epidisease, S.L.

Para ello, se estudiaron las siguientes comparaciones:

- 1) Los tres grupos experimentales: Considerando los grupos melanoma y TSPMI como tratamiento; y el grupo nevus como control.
- 2) Comparaciones dos a dos:
  - Melanoma contra nevus (Control)
  - TSPMI contra nevus (Control)
  - TSPMI contra melanoma (Control)

Primero, se reanalizaron los datos empezando por estudiar la calidad de las muestras a partir de los archivos *fastq* y bam suministrados por Diagenode utilizando tres programas independientes: Bismark v0.22.1, MultiQC v1.7 y Qualimap v2.2.1.

Bismark es un programa para mapear lecturas secuenciadas tratadas con bisulfito a un genoma de referencia y realizar llamadas de metilación en un único paso. El resultado puede ser fácilmente importado a un visor genómico. Qualimap es una plataforma que facilita el control de calidad de los datos de secuenciación alineados, examinando los archivos de alineamiento bam, capaz de detectar sesgos en la secuenciación y/o mapeo de los datos. MultiQC permite agregar los resultados de los análisis bioinformáticos de varias muestras en un solo informe.

La normalización de los datos se realizó con la función `normalizeCoverage` del paquete informático `methyKit`, implementado en R para análisis y anotación de metilación del ADN, que normaliza por el coverage entre las distintas muestras. Además, por defecto, se usan solo aquellas bases con al menos 10 de coverage para el análisis, es decir, aquellas bases que se han leído al menos 10 veces.

El análisis completo de los datos se realizó con el paquete `methyKit`, aplicándose el test exacto de Fisher para obtener un p-valor y un q-valor de cada sitio diferencialmente expresado detectado. El q-valor es el p-valor ajustado utilizando el método SLIM (un modelo lineal deslizante para estimar la proporción de hipótesis nulas verdaderas en conjuntos de datos con estructuras de dependencia). Después de calcular el q-valor, se pueden seleccionar las regiones o bases diferencialmente metiladas en función del q-valor y del porcentaje de puntos de corte (cutoffs) de diferencia de metilación.

La construcción del modelo predictivo se modeliza mediante regresión logística binaria en R, con la función `glm` del paquete `stats`, para cada uno de los sitios diferencialmente metilados. La función `glm` se utiliza para ajustar modelos lineales generalizados, especificados dando una descripción simbólica del predictor lineal y una descripción de la distribución de errores.

Se utilizó el paquete de R `glmulti` (programa que permite la selección de modelos e inferencia multimodelo de forma simplificada) para tener una estimación de cuál era la mejor combinación de sitios diferencialmente metilados obtenidos en el modelo 1. Este paquete realiza la selección de modelos de forma automatizada, generando automáticamente todos los modelos posibles bajo las restricciones establecidas por el usuario y encontrando el mejor.

Para evaluar el poder de clasificación de los modelos se construyó la correspondiente curva ROC (Receiver Operating Characteristic – Característica Operativa del Receptor) para el diagnóstico de melanoma, y el análisis de AUC (Area under the ROC Curve – Área bajo la curva ROC), con las funciones `roc` y `auc` dentro del entorno R. La curva ROC representa gráficamente la sensibilidad frente a la especificidad.

### 5.E. Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM)

La Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM) es un método sensible y específico para la detección de metilación del ADN, para lo que previamente se requiere un tratamiento con bisulfito. Esta técnica se basa en las diferencias que adquieren las secuencias de ADN tras la modificación con bisulfito entre el ADN metilado y no metilado, ya que los residuos de citosina no metilados se convierten a uracilo, mientras que el ADN metilado mantiene las citosinas. Mediante PCR se amplifican tanto las secuencias metiladas como las no metiladas, y posteriormente se realiza un protocolo de HRM. De esta manera tras analizar las curvas de melting obtenidas para una muestra se obtienen perfiles distintos en función del grado de metilación, comparándolos con patrones de metilación conocida. Para ello, la empresa danesa MethylDetect, especializada en estudios de metilación del ADN, fue la encargada de diseñar las sondas específicas de los sitios diferencialmente metilados encontrados.

Para realizar la MS-HRM, previamente tenemos que realizar la conversión con bisulfito del ADN. Se empleó el kit EpiTect Bisulfite Kit (48) (Qiagen, número de catálogo 59104) partiendo, idealmente, de 500 ng de ADN en un volumen de 20  $\mu$ l. Considerando las limitaciones del material de partida de este estudio, bien porque el rendimiento de la extracción en parafina muy bajo o porque el volumen total eluido no es suficiente, la cantidad promedio de ADN inicial será aproximadamente de 100 ng medidos por Qubit (en un rango entre 50 y 500 ng).

Para ello, descongelamos el ADN que queremos convertir. Mientras, añadimos 800  $\mu$ l de agua libre de RNAsas a cada alícuota de "Bisulfite Mix" que se necesite (1 alícuota sirve para 8 muestras). Se vortea el mix hasta que esté completamente disuelto, sin poner en hielo.

A continuación, se preparan los tubos de PCR de 200  $\mu$ l como se requieran (1 tubo por muestra): Hasta 20  $\mu$ l de ADN y agua, 85  $\mu$ l del Bisulfite Mix disuelto y 35  $\mu$ l de tampón DNA Protect, formando un volumen final de 140  $\mu$ l.

Se cierran los tubos de PCR y se homogeniza su contenido a temperatura ambiente, notando que cuando se añade el tampón DNA Protect a la mezcla de ADN, agua y Bisulfite Mix, el color cambia a azul. Esto indica que la mezcla es suficiente y que el pH de la mezcla es correcto para la reacción.

Configuramos el termociclador para hacer la reacción de conversión por bisulfito (con una duración aproximada de 5 horas):

- Desnaturalización: 5 minutos a 95°C
- Incubación: 25 minutos a 60°C

- Desnaturalización: 5 minutos a 95°C
- Incubación: 85 minutos a 60°C
- Desnaturalización: 5 minutos a 95°C
- Incubación: 175 minutos a 60°C.
- Mantener a 20°C

Se colocan los tubos de PCR en el termociclador y se empieza la reacción. Cabe destacar que solo se pueden utilizar termocicladores con tapa calentadora. El ADN resultante se puede quedar en el termociclador toda la noche.

Seguidamente, realizamos una serie de pasos con el fin de limpiar el ADN resultante de la reacción anterior.

Se centrifugan los tubos de PCR para bajar todo el contenido al fondo del tubo y se transfiere el contenido completo, incluyendo algún posible precipitado, a nuevos tubos de 1,5 ml.

Como trabajamos con muestras parafinadas, añadimos 310 µl de tampón BL con Carrier RNA. Se mezclan las muestras con vórtex y se centrifuga brevemente. A continuación, se añaden 250 µl de etanol (96-100%) a cada muestra, se vortea y se centrifuga brevemente.

Preparamos el número necesario de columnas EpiTect y tubos colectores, y transferimos todo el contenido del paso anterior a cada spin column situada dentro de los tubos colectores. Se centrifugan a máxima velocidad durante un minuto. Eliminamos el residuo situado en los tubos colectores y volvemos a poner las columnas dentro de los tubos colectores.

Añadimos 500 µl del tampón de lavado BW a cada columna situada dentro de los tubos colectores y centrifugamos a velocidad máxima durante un minuto. Eliminamos el residuo situado en los tubos colectores y situamos de nuevo las columnas en los tubos colectores.

Añadimos 500 µl de tampón BD (tampón de desulfonación) a cada columna, incubamos 15 minutos a temperatura ambiente con las tapas de las columnas cerradas.

Durante la incubación, preparamos el termobloque a 56°C y preparamos 2 tubos de 1,5 ml por muestra.

Una vez terminada la incubación, centrifugamos las columnas que están dentro de los tubos colectores a máxima velocidad durante un minuto. Eliminamos el residuo y volvemos a poner las columnas en los tubos.

Realizamos un nuevo lavado con el tampón BW (500 µl) a cada columna, centrifugamos 1 minuto a velocidad máxima, quitamos el residuo, ponemos de nuevo las columnas y repetimos el lavado una vez más.

Pasamos las columnas en nuevos tubos colectores de 2 ml, centrifugamos los tubos a máxima velocidad durante un minuto para eliminar cualquier líquido residual.

Colocamos las columnas, con las tapas abiertas, en uno de los tubos de 1,5 ml preparados anteriormente, y se realiza una incubación de 5 minutos a 56°C en el termobloque para que se evapore el líquido que quede.

Colocamos las columnas en los otros tubos de 1,5 ml que teníamos preparados y ponemos 25 µl de tampón EB en el centro de cada membrana. Dejamos incubar 1 minuto a temperatura ambiente. Eluimos el ADN centrifugando durante 1 minuto a 15.000g (aprox. 12.000rpm).

Para aumentar el rendimiento de obtención de ADN, volvemos a pasar los 25 µl de Tampón EB por la columna correspondiente. Se incuba de nuevo durante 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifuga durante un minuto a 15.000g.

Si el ADN purificado se va a usar en las siguientes 24 horas se guarda a 2-8°C, mientras que, si se va a almacenar durante más de 24 horas, se conserva de -30°C a -15°C, donde pueden estar hasta 3 años.

Como la concentración de ADN puede directamente influir en los resultados de la técnica MS-HRM, la cantidad de ADN utilizada en la modificación por bisulfito se tiene en cuenta en el análisis de resultados.

Los experimentos de la técnica MS-HRM se realizan en el equipo LightCycler (Roche) según el protocolo de MethylDetect específico para cada uno de los genes a estudiar (EpiMelt kit for DNA Methylation assessment of PMF1, EpiMelt kit for DNA Methylation assessment of MYO1D y EpiMelt kit for DNA Methylation assessment of TEKT4P2) y el kit LightCycler® 480 High Resolution Melting Master (Roche, número de catálogo 04909631001).

Según el protocolo EpiMelt para las 3 sondas, se prepara un mix de PCR con un volumen final de 14 µl para cada muestra según se indica en la Tabla 3 y se añaden 6 µl de ADN tratado con bisulfito, cuya concentración es de 30 – 50 ng.

Tabla 3. Reactivos mix de PCR acorde al protocolo EpiMelt.

Reactivo	Volumen
HRM Master 2x	10 $\mu$ l
EpiMelt Primer mix específico	1 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,4 $\mu$ l
Agua	0,6 $\mu$ l

Los 20  $\mu$ l preparados para cada muestra y sonda se traspasan a una placa de 96 pocillos, se sella, se centrifuga durante dos minutos a 1.000 x g. Finalmente, se sitúa la placa en el instrumento y se inicia el programa de PCR-HRM.

Los programas de PCR-HRM son diferentes entre los tres protocolos (EpiMelt kit for DNA Methylation assessment of PMF1 (Tabla 4), EpiMelt kit for DNA Methylation assessment of MYO1D (Tabla 5) y EpiMelt kit for DNA Methylation assessment of TEKT4P2 (Tabla 6)), ya que las sondas tienen una temperatura de amplificación diferente.

Tabla 4. Programa de PCR-HRM para el gen PMF1.

Programa PMF1	Ciclos	Temperatura (°C)	Mantener (seg)
Pre-incubación	1	95	600
Amplificación	50	95	15
		57	10
		72	15
High Resolution Melting		95	15
		60	60
		95	-

Tabla 5. Programa de PCR-HRM para el gen MYO1D.

Programa MYO1D	Ciclos	Temperatura (°C)	Mantener (seg)
Pre-incubación	1	95	600
Amplificación	50	95	15
		53	10
		72	15
High Resolution Melting		95	15
		60	60
		95	-

Tabla 6. Programa de PCR-HRM para el gen TEKT4P2.

Programa TEKT4P2	Ciclos	Temperatura (°C)	Mantener (seg)
Pre-incubación	1	95	600
Amplificación	50	95	15
		57	10
		72	15
High Resolution Melting		95	15
		60	60
		95	-

Para cada una de las sondas diseñadas, se analizan por triplicado controles de calibración, así como controles positivo y negativo de metilación. El control de calibración se incluye para garantizar la sensibilidad del ensayo para detectar la metilación del 1% en cada experimento.

#### 5.F PCR a tiempo real

El ARN extraído de las zonas tumorales representativas de las lesiones melanocíticas cutáneas se empleó tanto para analizar la expresión de los genes diferencialmente metilados y de una batería de miRNAs mediante PCR cuantitativa a tiempo real (Quantitative Real Time PCR, qPCR o qRT-PCR) utilizando la tecnología de las sondas TaqMan (Applied Biosystems). Esta es una de las técnicas de biología molecular más poderosa y sensible para el análisis génico y epigenético.

Para el estudio de los genes diferencialmente metilados, el primer paso fue convertir el ARN en cDNA. Partimos de 75 ng de ARN por muestra, y se prepara un mix con los reactivos del kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) en un volumen final de 25  $\mu$ l (Tabla 7):

Tabla 7. Componentes de la retrotranscripción de ARN a cDNA.

Reactivo	Volumen
Agua	4 $\mu$ l
Tampón 10X RT	2,5 $\mu$ l
dNTPs 100mM	1 $\mu$ l
Random Primers	2,5 $\mu$ l
Inhibidor de RNasas	1,25 $\mu$ l
Enzima transcriptasa reversa	1,25 $\mu$ l
Muestra (ARN + Agua)	12,5 $\mu$ l



Por tanto, la concentración final de la reacción por muestra era de 3 ng/ $\mu$ l.

Las condiciones del termociclador para realizar la retrotranscripción eran:

- 10 minutos a 25°C
- 120 minutos a 37°C
- 5 minutos a 85°C
- Mantener a 4°C

A continuación, se realizó la PCR a tiempo real para cada una de las muestras y cada uno de los genes a estudiar, utilizando 1  $\mu$ l del cDNA obtenido en el paso anterior en una reacción de 10  $\mu$ l de volumen final según se indica a continuación (Tabla 8):

*Tabla 8. Componentes de la PCR a tiempo real.*

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
cDNA	1 $\mu$ l
Agua	3,5 $\mu$ l
Sondas 20x TaqMan	0,5 $\mu$ l
Tampón TaqMan	5 $\mu$ l

Se incluyeron controles negativos de la qPCR y se añadieron los controles negativos de la RT.

Las reacciones se realizaron por triplicado en placas de 384 pocillos en el sistema de Real Time PCR QuantStudio 5 (Applied Biosystems) con el programa:

- 1 ciclo: 2 minutos a 50°C
- 1 ciclo: 10 minutos a 95°C
- 40 ciclos: 15 segundos a 95°C + 1 minuto a 60°C

Por otra parte, se cuantificaron los niveles de expresión de los miRNAs miR-125b, miR-137, miR-182, miR-191, miR-200c, miR-205, miR-21, miR-211, miR-221 y miR9 de forma individual en todas las muestras. Los niveles del gen RNU6B se utilizaron como referencia control endógeno. La información de los miRNAs se detalla en la Tabla 9. La selección de estos miRNAs se debe a que previamente, en nuestro grupo de investigación, se han estudiado en melanomas primarios criopreservados, observando que la expresión de varios de estos miRNAs se puede relacionar con una mayor malignidad, e incluso son capaces de predecir la supervivencia de los pacientes.

Tabla 9. Información de los miRNAs estudiados.

Assay ID	miRNA	Nombre miRBase	Identificador miRBase	Secuencia
001129	mmu-miR-137	hsa-miR-137	MIMAT0000429	UUUUGCUUAAGAAUACGCGUAG
002334	hsa-miR-182	hsa-miR-182-5p	MIMAT0000259	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU
002299	hsa-miR-191	hsa-miR-191-5p	MIMAT0000440	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG
000514	hsa-miR-211	hsa-miR-211-5p	MIMAT0000268	UUCCCUUUGUCAUCCUUCGCCU
000524	hsa-miR-221	hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC
002300	hsa-miR-200	hsa-miR-200c-3p	MIMAT0000617	UAAUACUGCCGGGUAUGAUGGA
000509	hsa-miR-205	hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266	UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG
000449	hsa-miR-125b	hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	UCCUGAGACCCUAAUUGUGA
000397	hsa-miR-21	hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
000583	hsa-miR-9	hsa-miR-9-5p	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
001093	RNU6B	568915		CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCATATTTT

Para realizar la PCR a tiempo real primero se realiza una retrotranscripción reversa (RT). La RT de miRNAs precisa de iniciadores o primers específicos de cada uno de los miRNAs previamente citados, que se combinan en una misma RT (por lo tanto, es una retrotranscripción multiplex). De esta forma, utilizamos un pool de primers para sintetizar el cDNA. La RT se realizó con el kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Lifetechnologies), y se sustituyó el volumen correspondiente de agua por BSA para revertir la inhibición que provoca la presencia de melanina. Para cada muestra se preparó una reacción con un volumen final de 40  $\mu$ l para convertir 160 ng de RNA total en cDNA según se indica a continuación (Tabla 10):

Tabla 10. Componentes de la retrotranscripción de ARN a cDNA.

Reactivo	Volumen
BSA	2,69 $\mu$ l
Tampón 10X RT	4 $\mu$ l
dNTPs 100mM	0,8 $\mu$ l
Primer Pool	16 $\mu$ l
Inhibidor de RNasas	0,51 $\mu$ l
Enzima transcriptasa reversa	8 $\mu$ l
Muestra (ARN + Agua)	8 $\mu$ l

La reacción se lleva a cabo en el termociclador con el siguiente programa:

- 30 minutos a 16°C
- 30 minutos a 42°C
- 5 minutos a 85°C
- Mantener a 4°C

A continuación, se realizó la PCR a tiempo real para cada una de las muestras y cada uno de los miRNAs a estudiar, utilizando 1 µl del cDNA obtenido en el paso anterior en una reacción de 10 µl de volumen final según se indica a continuación (Tabla 11):

*Tabla 11. Componentes de la PCR a tiempo real.*

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
cDNA	1 µl
Agua	3,5 µl
Sondas 20x TaqMan	0,5 µl
Tampón TaqMan	5 µl

Se incluyeron controles negativos en la qPCR y se añadieron los controles negativos de la RT.

Las reacciones se realizaron por triplicado en placas de 384 pocillos en el sistema de Real Time PCR QuantStudio 5 (Applied Biosystems) con el programa:

- 1 ciclo: 10 minutos a 95°C
- 40 ciclos: 15 segundos a 95°C + 1 minuto a 60°C

### **5.G. Estudio estadístico**

Los resultados de las variables asociadas al análisis y experimentación llevados a cabo a lo largo del proyecto que aquí se propone, se examinaron con la versión del software estadístico R 4.2.0 y el software GraphPad Prism 9.0.0. Para las variables discretas se utilizó la prueba exacta de Fisher y para las variables continuas la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, considerando un nivel de significación del 5% ( $p\text{-valor} \leq 0,05$ ). Las lesiones melanocíticas spitzoides se distribuyeron en tres grupos: nevus, tumor spitzoide de potencial maligno incierto (TSPMI) o melanoma en función de sus parámetros clinicopatológicos y su evolución clínica. Para todos los estudios estadísticos, los niveles de significación son \* = ( $p\text{-valor} < 0,05$ ), \*\* = ( $p\text{-valor} < 0,01$ ) y \*\*\* = ( $p\text{-valor} < 0,0001$ ).

#### **5.H. Limitaciones del estudio**

Las lesiones melanocíticas spitzoides a estudiar, por lo general, son pequeñas por lo que la cantidad de ADN que se obtiene de ellas puede ser un factor parcialmente limitante. Además, ya que las muestras están parafinadas, el ADN extraído se espera que esté fragmentado. Estas limitaciones se han tenido en cuenta para el diseño y la elección de las técnicas que nos planteamos realizar en este proyecto ya que la secuenciación por RRBS es una técnica validada en muestras clínicas parafinadas sin que ello afecte al rendimiento y la calidad de los resultados.

## 6. RESULTADOS

### 6.A. Estudio clínico e histológico

Se parte de una colección de 105 muestras de tumores melanocíticos spitzoides con una edad media de 26,31 años y una desviación estándar de 21,25. Debido a que una gran cantidad de estos casos han sido casos consulta enviados al Hospital Clínico Universitario de Valencia, no ha sido posible realizar el seguimiento clínico de todos los casos y hay algunas variables para las que no disponemos de información.

Se realizó un estudio descriptivo para cada variable individual, tanto clínica como histológica. Para las variables discretas (Tabla 12) se muestra la frecuencia absoluta y relativa; mientras que para las continuas (Tabla 13) el número de observaciones válidas, la media, mediana, desviación típica, mínimo y máximo.

Tabla 12. Descripción de las variables discretas clínicas e histológicas.

Variable	Tipo	n	Porcentaje (%)
Diagnóstico	Nevus	39	37,14
	TSPMI	44	41,90
	Melanoma	22	20,95
Género	Mujer	52	68,42
	Hombre	24	31,58
Localización de la lesión	Cabeza/Cuello	12	11,43
	Tronco	13	12,38
	Extremidades superiores y hombros	25	23,81
	Extremidades inferiores y cadera	21	20
	No especificado	34	32,38
Edad	0-10 años	26	27,96
	10-20 años	24	25,81
	20-50 años	33	35,48
	> 50 años	10	10,75
Recurrencia local	No	60	100
	Sí	0	0
Metástasis regional	No	57	96,6
	Metástasis en tránsito	0	0
	Metástasis ganglionar	1	1,7
	Metástasis en tránsito y ganglionar	1	1,7
Metástasis a distancia (MD)	No	58	98,3
	MD a piel, partes blandas y/o ganglio linfático no regional	1	1,7
	MD pulmonar	0	0
	MD a sistema nervioso periférico	0	0

	MD a sistema nervioso central	0	0
<b>Seguimiento</b>	Vivo sano	59	98,33
	Vivo con recurrencia local	0	0
	Vivo con metástasis regional	0	0
	Vivo con MD	0	0
	Muerte por enfermedad	1	1,67
<b>Distribución</b>	De unión	6	5,71
	Compuesto	83	79,05
	Intradérmico	15	14,29
	Metástasis	1	0,95
<b>Dermis profunda</b>	Sí	27	26,21
	No	76	73,79
<b>Simetría</b>	Sí	96	92,31
	No	8	7,69
<b>Ulceración</b>	Sí	5	4,81
	No	99	95,19
<b>Patrón pagetoide</b>	Sí	38	36,54
	No	66	63,46
<b>Formación de masa expansiva</b>	Sí	20	19,23
	No	84	80,77
<b>Densidad celular</b>	Baja	13	17,57
	Medio/baja	11	14,86
	Medio/alta	26	35,14
	Alta	24	32,43
<b>Mitosis/mm<sup>2</sup></b>	0-2	84	80,77
	3-6	17	16,35
	>6	3	2,88
<b>Mitosis atípica</b>	Sí	21	20,19
	No	83	79,81
<b>Mitosis profunda/marginal</b>	Sí	13	12,5
	No	91	87,5
<b>Atipia /Pleomorfismo</b>	Sí	62	59,62
	No	42	40,38
<b>Maduración</b>	Sí	59	56,73
	No	45	43,27
<b>Cuerpos de Kamino</b>	Sí	13	12,5
	No	91	87,5
<b>Infiltrado linfocitario peritumoral</b>	Sí	22	24,18
	No	69	75,82
<b>Infiltrado linfocitario intratumoral</b>	Sí	27	29,35
	No	65	70,65

Consumición epidérmica	Sí	39	37,5
	No	65	62,5
Elastosis solar	Sí	2	1,92
	No	102	98,08
Pigmentación	Sí	31	29,81
	No	73	70,17
Esclerosis/desmoplasia	Sí	16	15,38
	No	88	84,62
Tipo de célula	Epiteloide	80	76,92
	Fusiforme	12	11,54
	Mixta	12	11,54
Pulverocitos	Sí	2	1,92
	No	102	98,08
Necrosis	Sí	2	1,94
	No	101	98,06

Tabla 13. Descripción de las variables continuas histológicas.

Variable	n	media	Desviación típica (sd)	Mediana	Mínimo	Máximo
Tamaño (mm)	74	4,63	2,09	4,3	1,7	12,8
Índice Breslow	18	2,91	2,54	1,6	0,16	7,2
Mitosis/mm <sup>2</sup>	104	1,24	1,82	0	0	10

Posteriormente se realizó un estudio descriptivo para cada variable según el diagnóstico (nevus, TSPMI y melanoma), tanto discretas (Tabla 14) como continuas (Tabla 15). Para las variables discretas se utilizó la prueba exacta de Fisher y para las variables continuas, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, para analizar el valor predictivo de éstas.

Tabla 14. Descripción de las variables discretas clínicas e histológicas en función del diagnóstico. Prueba exacta de Fisher. \* = (p-valor < 0,05); \*\* = (p-valor < 0,01); \*\*\* = (p-valor < 0,0001)

Variable	Tipo variable	Melanoma (n , %)		Nevus (n , %)		TSPMI (n , %)		Obs.	p-valor
Género	Mujer	8	10,53%	24	31,58%	20	26,32%	76	0,2047
	Hombre	8	10,53%	8	10,53%	8	10,53%		
Localización de la lesión	Cabeza/ Cuello	0	0,00%	4	3,81%	8	7,62%	105	0,1824
	Tronco	1	0,95%	6	5,71%	6	5,71%		
	Extremidades superiores y hombros	8	7,62%	10	9,52%	7	6,67%		
	Extremidades inferiores y cadera	6	5,71%	9	8,57%	6	5,71%		

	<b>No especificado</b>	7	6,67%	10	9,52%	17	16,19%		
<b>Edad</b>	<b>0-10 años</b>	0	0,00%	14	15,05%	12	12,90%	93	<b>0,0102*</b>
	<b>10-20 años</b>	9	9,68%	7	7,53%	8	8,60%		
	<b>20-50 años</b>	9	9,68%	13	13,98%	11	11,83%		
	<b>&gt;50 años</b>	4	4,30%	2	2,15%	4	4,30%		
<b>Recurrencia local</b>	<b>No</b>	12	20,34%	25	42,37%	23	38,98%	59	-
	<b>Sí</b>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%		
<b>Metástasis regional</b>	<b>No</b>	10	16,95%	24	40,68%	23	38,98%	59	<b>0,0386*</b>
	<b>Metástasis en tránsito</b>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%		
	<b>Metástasis ganglionar</b>	1	1,69%	0	0,00%	0	0,00%		
	<b>Metástasis en tránsito y ganglionar</b>	1	1,69%	0	0,00%	0	0,00%		
<b>Metástasis a distancia (MD)</b>	<b>No</b>	11	18,64%	25	42,37%	22	37,29%	59	0,2034
	<b>MD a piel, partes blandas y/o ganglio linfático no regional</b>	1	1,69%	0	0,00%	0	0,00%		
	<b>MD pulmonar</b>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%		
	<b>MD vísceras distintas de SNC</b>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%		
	<b>MD a sistema nervioso central</b>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%		
<b>Seguimiento</b>	<b>Vivo sano</b>	11	12,79%	25	29,07%	23	26,74%	86	0,4835
	<b>Vivo con recurrencia local</b>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%		
	<b>Vivo con metástasis regional</b>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%		
	<b>Vivo con MD</b>	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%		
	<b>Muerte por enfermedad</b>	1	1,16%	0	0,00%	0	0,00%		
<b>Distribución</b>	<b>De la unión</b>	1	0,95%	1	0,95%	4	3,81%	105	0,4024
	<b>Compuesto</b>	18	17,14%	30	28,57%	35	33,33%		
	<b>Intradérmico</b>	2	1,90%	8	7,62%	5	4,76%		
	<b>Metástasis</b>	1	0,95%	0	0,00%	0	0,00%		
<b>Dermis profunda</b>	<b>Sí</b>	9	8,65%	8	7,69%	10	9,62%	104	0,2174
	<b>No</b>	12	11,54%	31	29,81%	33	31,73%		
<b>Simetría</b>	<b>Sí</b>	16	15,38%	39	37,50%	41	39,42%	104	<b>0,0035**</b>
	<b>No</b>	5	4,81%	0	0,00%	3	2,88%		
<b>Ulceración</b>	<b>Sí</b>	3	2,88%	2	2,63%	0	0,00%	104	<b>0,0226*</b>
	<b>No</b>	18	17,31%	37	48,68%	44	57,89%		
<b>Patrón pagetoide</b>	<b>Sí</b>	13	12,50%	8	7,69%	17	16,35%	104	<b>0,006**</b>
	<b>No</b>	8	7,69%	31	29,81%	27	25,96%		
<b>Formación de masa expansiva</b>	<b>Sí</b>	9	8,65%	2	1,92%	9	8,65%	104	<b>0,0016**</b>
	<b>No</b>	12	11,54%	37	35,58%	35	33,65%		
<b>Densidad celular</b>	<b>Baja</b>	5	6,76%	7	9,46%	1	1,35%	74	<b>0,0007**</b>
	<b>Medio/baja</b>	0	0,00%	6	8,11%	5	6,76%		
	<b>Medio/alta</b>	3	4,05%	10	13,51%	13	17,57%		
	<b>Alta</b>	8	10,81%	2	2,70%	14	18,92%		
<b>Mitosis/mm<sup>2</sup></b>	<b>0-2</b>	11	10,58%	39	37,50%	34	32,69%	104	<b>0,0000***</b>



	2-6	7	6,73%	0	0,00%	10	9,62%		
	>6	3	2,88%	0	0,00%	0	0,00%		
Mitosis atípica	Sí	8	7,69%	0	0,00%	5	4,81%	104	0,000***
	No	13	12,50%	39	37,50%	39	37,50%		
Mitosis profunda/marginal	Sí	8	7,69%	0	0,00%	5	4,81%	104	0,000***
	No	13	12,50%	39	37,50%	39	37,50%		
Atipia/Pleomorfismo	Sí	20	19,23%	7	6,73%	35	33,65%	104	0,000***
	No	1	0,96%	32	30,77%	9	8,65%		
Maduración	Sí	2	1,92%	35	33,65%	22	21,15%	104	0,000***
	No	19	18,27%	4	3,85%	22	21,15%		
Cuerpos de Kamino	Sí	1	0,96%	7	6,73%	5	4,81%	104	0,3712
	No	20	19,23%	32	30,77%	39	37,50%		
Infiltrado linfocitario peritumoral	Sí	4	3,85%	10	9,62%	8	7,69%	104	0,9324
	No	14	13,46%	25	24,04%	30	28,85%		
Infiltrado linfocitario intratumoral	Sí	6	5,77%	11	10,58%	10	9,62%	104	0,9485
	No	12	11,54%	24	23,08%	29	27,88%		
Consunción epidérmica	Sí	12	11,54%	8	7,69%	19	18,27%	104	0,0127*
	No	9	8,65%	31	29,81%	25	24,04%		
Elastosis solar	Sí	0	0,00%	1	0,96%	1	0,96%	104	1
	No	21	20,19%	38	36,54%	43	41,35%		
Pigmentación	Sí	7	6,73%	14	13,46%	10	9,62%	104	0,397
	No	14	13,46%	25	24,04%	34	32,69%		
Esclerosis/desmoplasia	Sí	2	1,92%	10	9,62%	4	3,85%	104	0,1107
	No	19	18,27%	29	27,88%	40	38,46%		
Tipo de célula	Epitelioide	20	19,23%	25	24,04%	35	33,65%	104	0,0868
	Fusiforme	0	0,00%	7	6,73%	5	4,81%		
	Mixta	1	0,96%	7	6,73%	4	3,85%		
Pulverocitos	Sí	1	0,96%	0	0,00%	1	0,96%	104	0,503
	No	20	19,23%	39	37,50%	43	41,35%		
Necrosis	Sí	2	1,92%	0	0,00%	0	0,00%	104	0,0392*
	No	19	18,27%	39	37,50%	43	41,35%		

Mediante la agrupación de los casos en función de su diagnóstico, se estudió individualmente qué variable clínica e histológica podría considerarse como predictora de forma significativa. Las variables discretas predictoras del diagnóstico con un valor de p menor que 0,05 (nivel de significación del 5%) se pueden observar en la Figura 4 y fueron la edad, la recurrencia local, la simetría, la ulceración, el patrón pagetoide, la formación de masa expansiva, la densidad celular, el ratio de mitosis, la presencia de mitosis atípicas, la presencia de mitosis profundas, la atipia, la maduración, la consunción de la epidermis y la necrosis.

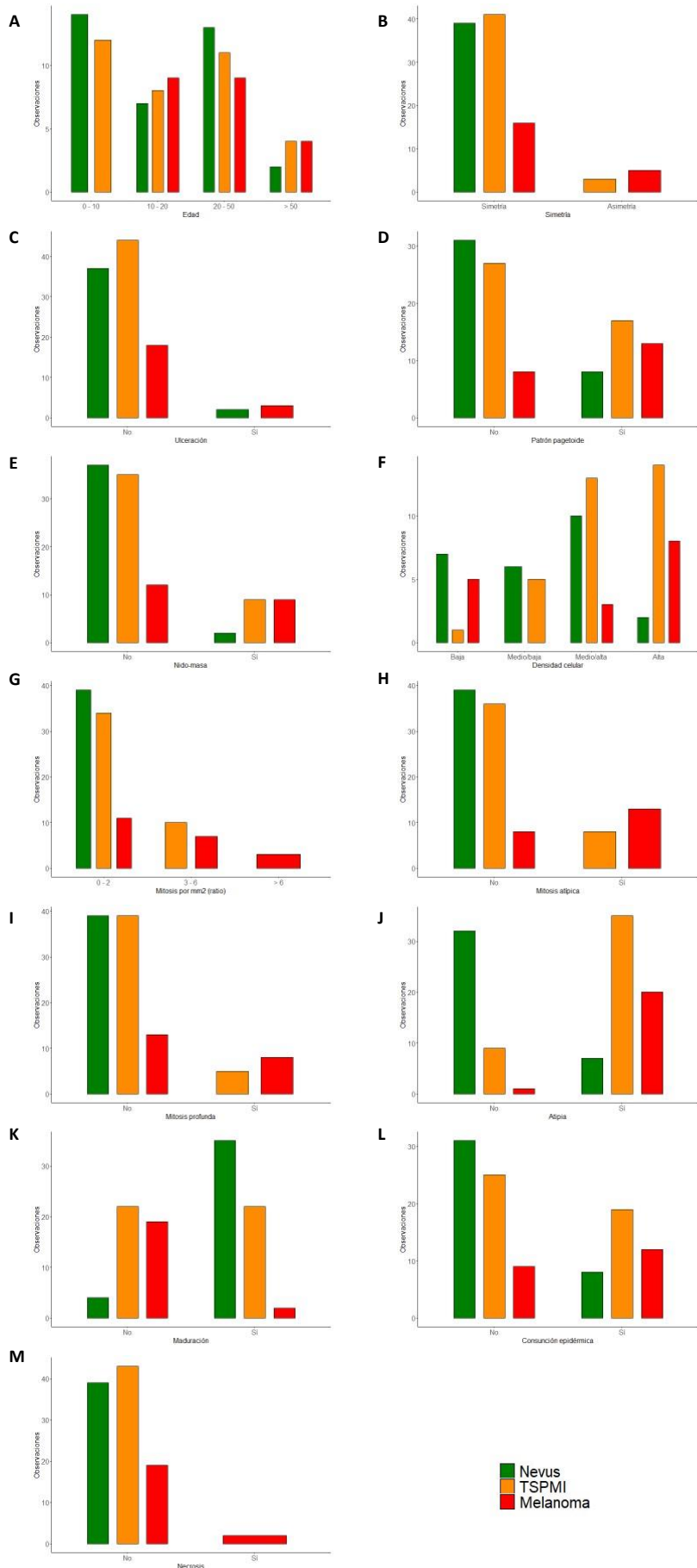


Figura 4. Variables discretas significativamente predictoras del diagnóstico. (A) Edad. (B) Simetría. (C) Ulceración. (D) Patrón pagetoide. (E) Formación de masa expansiva. (F) Densidad celular. (G) Mitosis por mm<sup>2</sup> (ratio). (H) Mitosis atípica. (I) Mitosis profunda. (J) Atipia. (K) Maduración. (L) Consunción de la epidermis. (M) Necrosis.

Tras comparar las diferentes características de las lesiones spitzoides de tipo nevus, ambiguas y melanoma obtenidas con lo establecido por la Organización Mundial de la Salud podemos ver que aunque todas estas lesiones pueden ocurrir a cualquier edad, los pacientes con melanoma tienen una edad significativamente mayor que el resto de pacientes, mientras que en el rango de 0 a 10 años solo aparecen casos de nevus y TSPMI. Las edades de los pacientes eran  $21,11 \pm 15,92$ ,  $24,04 \pm 20,93$  y  $37,25 \pm 25,23$  (media  $\pm$  desviación estándar) para nevus, TSPMI y melanoma, respectivamente.

Además, no se observan diferencias en el número de casos registrados por sexo entre las lesiones malignas, mientras que en los nevus y tumores ambiguos vemos que son más comunes en mujeres que en hombres. Los nevus y los melanomas spitzoides se localizan sobre todo en las extremidades, tanto superiores como inferiores, mientras que los tumores TSPMI se distribuyen con una frecuencia similar entre la cabeza/cuello, el tronco y las extremidades superiores e inferiores. También se puede ver que el tamaño de estas lesiones es mayor en melanoma (4,85 mm) que en los TSPMI (4,2 mm) y nevus (3,7 mm).

Cabe destacar que de 105 lesiones solo 2 pacientes con melanoma spitzoide tuvieron metástasis: uno de ellos desarrolló metástasis ganglionares, en tránsito y a distancia y falleció debido a la enfermedad, mientras que el otro paciente presentó metástasis ganglionares regionales, y tras el último seguimiento se comprobó que seguía vivo y sin recurrencia. Este número de eventos tan bajo impidió realizar estudios de supervivencia.

Los nevus spitzoides tienen 0-1 mitosis por  $\text{mm}^2$ , mientras que los melanomas spitzoides muestran un número más alto (3 casos tienen más de 6), presentando además mitosis atípicas y mitosis profundas.

Tabla 15. Descripción de las variables continuas histológicas en función del diagnóstico.  
Prueba de Kruskal-Wallis. \*\*\* = (p-valor < 0,0001)

Variable	Diagnóstico	n	media	Desviación típica (sd)	Mediana	Mínimo	Máximo	Obs.	p-valor
Tamaño (mm)	Melanoma	16	4,9	1,49	4,85	1,9	7,5	74	0,3021
	Nevus	25	4,4	2,15	3,7	2	12,8		
	TSPMI	33	4,68	2,32	4,2	1,7	12		
Índice Breslow	Melanoma	18	2,91	2,54	1,6	0,16	7,2	18	-
	Nevus	0							
	TSPMI	0							
Mítosis/ $\text{mm}^2$	Melanoma	21	2,905	2,897	2	0	10	104	0,000***
	Nevus	39	0,154	0,432	0	0	2		
	TSPMI	44	1,409	1,187	1	0	4		



Se prepararon las librerías de forma individualizada de las 8 muestras, partiendo de un mínimo de 100 ng y un máximo de 300 ng de ADN total. Las muestras se juntaron en dos pools formado por grupos de 4 cada uno en función de los valores de Ct obtenidos. Tras la conversión con bisulfito y la amplificación por PCR cuantitativa en tiempo real de los pools, se midió la concentración de las librerías (Qubit dsDNA HS Assay Kit) y se analizó la calidad (Bioanalyzer), y se observó que ninguno de los dos pools pasaba el control de calidad, ya que en los perfiles de los electroferogramas mostraban demasiados dimers de adaptadores (Figura 6).

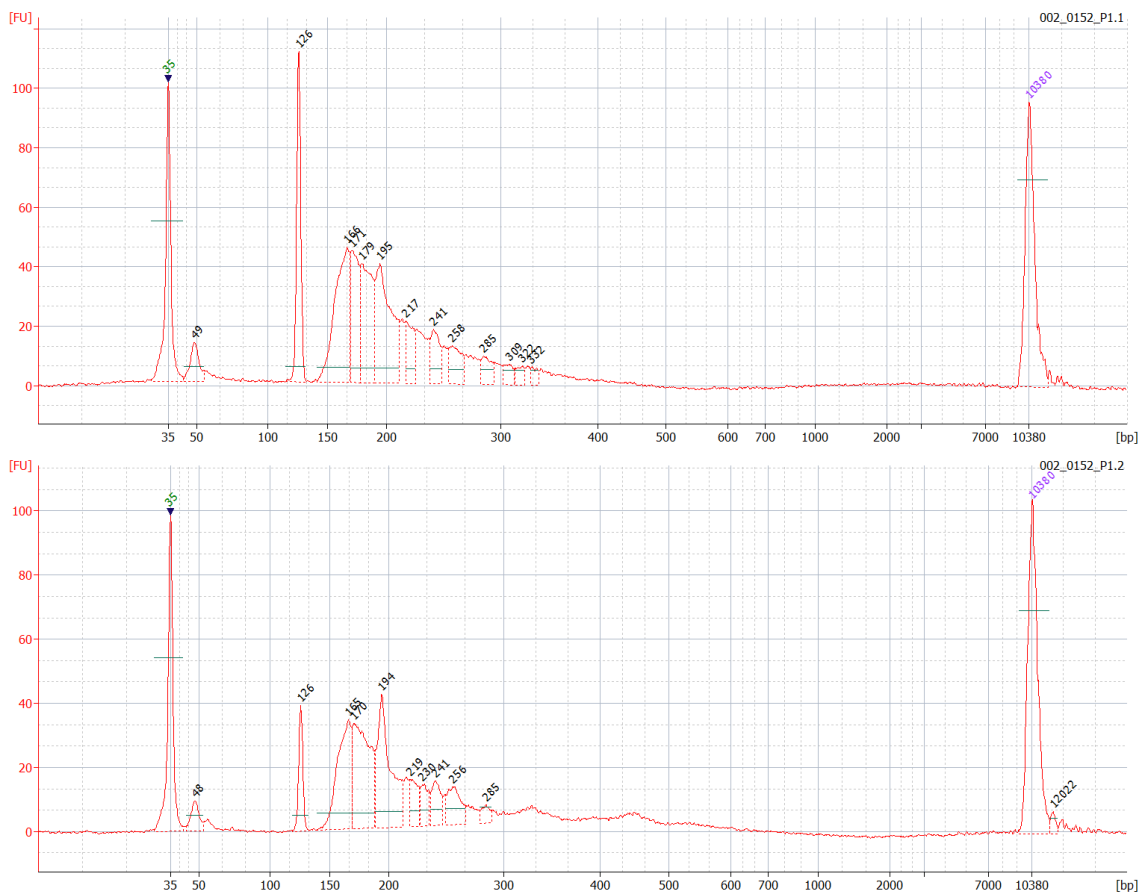


Figura 6. Electroferograma de los pools de librería de la RRBS analizados con el Bioanalyzer.

Como la concentración obtenida de los dos pools era demasiado baja, primero fueron purificadas con el sistema AMPure XP (Beckman Coulter), un sistema basado en esferas magnéticas (utilizando una ratio de esferas-muestra de 1,45x). A continuación, fueron amplificadas de nuevo con 2 ciclos de PCR adicionales, y un paso de limpieza final con las esferas AMPure XP (ratio de esferas-muestra de 1,45x). Se volvió a cuantificar con el kit Qubit dsDNA HS Assay y analizar la calidad con el Bioanalyzer, obteniendo de nuevo unos perfiles de las librerías con demasiados dimers de adaptadores, por lo que se requeriría una tercera purificación.

Como las librerías deberían secuenciarse en una única línea, se unieron en un pool de forma equimolar y posteriormente fueron limpiadas por duplicado con las esferas Ampure XP, en las mismas condiciones que las anteriores. Tras el estudio de calidad y cantidad (Tabla 16 y Figura 7, respectivamente), se observó que el pool de las librerías cumplía con los criterios oportunos para que se pudieran secuenciar.

Tabla 16. Parámetros de calidad del pool de librerías.

Pool	Concentración final (ng / $\mu$ l)	Pico más alto (pares de bases)	Concentración molar (nM)
1	2,82	194	22,36

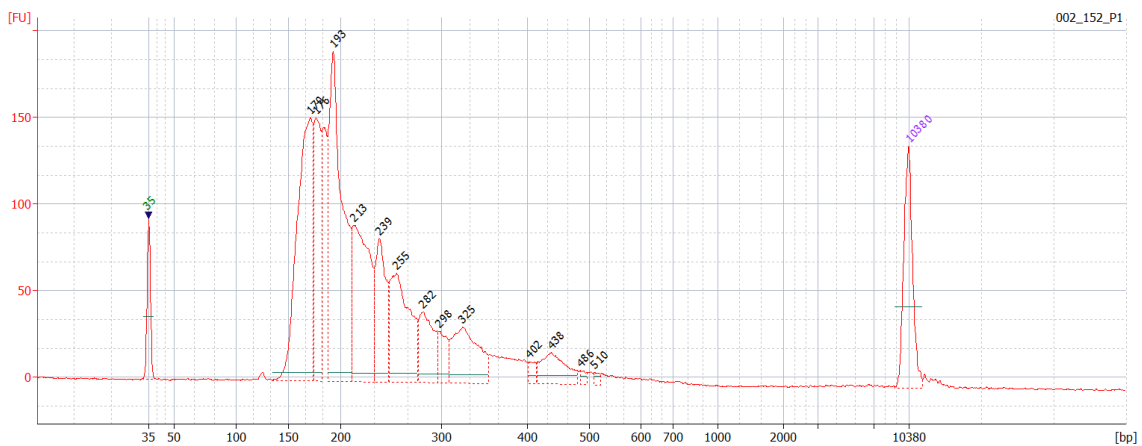


Figura 7. Electroferograma del pool final de librería de la RRBS analizados con el Bioanalyzer.

Tras la secuenciación con el equipo Illumina HiSeq 3000 y el estudio bioinformático, que incluía el control de calidad de las lecturas con el programa FastQC, la eliminación de los adaptadores con el programa Trim Galore! y el alineamiento con el genoma de referencia hg19 con el programa Bismark, se observó que las secuencias alineadas correctamente variaban entre 20 y 55 millones de lecturas, con una eficiencia del mapeo de entre 58 y 80 por ciento. El mínimo de islas CpGs detectadas en una muestra era 812.480, mientras que el máximo fue de 1.761.376 islas, con una cobertura promedio de éstas de entre 45,14 y 139,59 lecturas (Figura 8).

SampleName	Total reads	Uniquely aligned	Mapping efficiency (%)	CpGs Detected	CpGs cov>10	Average Coverage	Conv. Rate Meth. spike-in [%]	Conv. Rate Unm. spike-in [%]
18B16343_Met	35,528,467	20,709,091	58.29	1,324,156	1,106,522	45.14	1.78	99.68
17B25620	41,772,311	26,911,052	64.42	1,562,192	1,381,388	56.92	1.67	99.71
16B5879	33,958,332	20,675,378	60.88	1,292,768	1,081,667	47.11	1.71	99.78
18B13584	54,381,255	41,663,884	76.61	1,085,838	889,842	135.58	1.52	99.76
18B13387	37,313,510	27,205,795	72.91	812,480	540,854	96.74	1.78	99.76
09B1931_reextr	68,960,979	55,658,226	80.71	1,925,348	1,761,376	125.64	1.71	99.71
14B9803	48,750,373	35,485,059	72.79	946,530	751,496	139.59	1.51	99.73
16B34519	28,629,557	20,490,184	71.57	710,277	490,287	90.96	1.87	99.72

Figura 8. Resultados descriptivos de la primera tanda de RRBS.

Debido a que los resultados de la preparación de las librerías y su posterior secuenciación fue óptima, se procedió a seguir el experimento con las 32 muestras restantes. Se siguió el mismo protocolo que el utilizado para el estudio de las 8 primeras muestras. La concentración de ADN de las muestras variaba entre 90,42 ng y 350 ng, habiendo solo dos muestras con una concentración total a 100 ng.

Se prepararon 4 pools de 8 muestras cada uno que, al igual que en el primer pool, mostraban electroferogramas con demasiados dimers de adaptadores. Tras una segunda purificación con el kit AMPure XP, los 4 pools cumplían los criterios para ser secuenciados con el Illumina HiSeq 3000 (Tabla 17).

Tabla 17. Parámetros de calidad de los pools de librerías de la segunda tanda de RRBS.

Pool	Concentración final (ng/ $\mu$ l)	Pico más alto (pares de bases)	Concentración molar (nM)
2	0,606	193	4,83
3	0,898	193	7,16
4	1,126	193	8,98
5	1,208	195	9,53

Una vez realizado el análisis bioinformático preliminar, se pudo observar que en estas 32 muestras había entre 12 y 66 millones de lecturas alineadas correctamente, siendo la eficiencia de mapeo de entre 54 y 77 por ciento. Se detectaron un mínimo de 204.748 y un máximo de 2.018.392 de islas CpGs, con una cobertura media de entre 44,24 y 470,27 lecturas (Figura 9).

SampleName	Total reads	Uniquely aligned	Mapping efficiency (%)	CpGs Detected	CpGs cov>10	Average Coverage	Conv. Rate Meth. spike-in (%)	Conv. Rate Unm. spike-in (%)
15B0021968	30,645,085	20,988,709	68.49	1,121,469	937,733	67.31	1.54	99.64
B334721	39,569,352	20,765,143	52.48	212,379	96,481	239.47	1.54	99.59
16B0032143_MM	30,305,057	18,896,127	62.35	993,940	767,234	55.77	1.77	99.62
16B0032143_Nevus	31,646,152	19,572,983	61.85	1,007,109	739,296	54.38	1.89	99.63
15B12535	57,528,435	35,704,429	62.06	1,948,172	1,619,824	51.65	1.75	99.69
16B0014290	31,904,427	21,110,626	66.17	1,543,594	1,297,325	45.79	1.86	99.71
16B63522	28,962,256	18,062,337	62.37	531,093	268,109	90.10	1.83	99.68
12B27444	57,432,337	38,424,514	66.90	997,832	586,492	106.78	1.73	99.70
115315_Nevus	37,183,117	20,440,209	54.97	263,828	89,847	205.59	2.01	99.61
17B1080	23,545,633	17,977,647	76.35	1,423,949	1,153,743	44.24	2.07	99.70
17B3166	46,625,567	28,827,007	61.83	1,581,368	1,199,425	44.82	1.82	99.65
18B7048	45,067,141	28,404,620	63.03	1,733,239	1,365,552	44.79	1.73	99.71
18B6358	29,169,394	22,081,249	75.70	166,014	100,891	470.27	1.97	99.57
18B3608	26,682,943	19,017,944	71.27	648,999	376,130	96.92	1.78	99.66
18B2795	39,415,157	25,822,522	65.51	1,634,263	1,383,220	48.06	1.89	99.64
18B598	42,944,056	30,442,152	70.89	1,819,446	1,591,214	56.79	1.67	99.69
17B26186	38,995,270	27,178,793	69.70	1,174,437	957,721	75.05	1.77	99.71
17B21192	39,791,610	25,414,740	63.87	1,222,180	949,441	60.41	2.08	99.75
11B8865_reextr	41,727,994	27,548,113	66.02	304,101	58,806	121.27	2.14	99.54
18B13319	68,527,114	41,970,259	61.25	1,978,308	1,691,530	58.68	1.66	99.74
18B10575	17,919,452	12,377,314	69.07	518,541	282,049	79.55	1.58	99.66
18B15130	49,136,052	32,136,773	65.40	846,644	524,570	107.91	1.95	99.67
18B16343_1	49,670,414	34,050,443	68.55	1,413,102	1,162,374	83.70	1.49	99.66
15B744	36,973,712	26,748,612	72.34	216,051	136,858	432.48	2.11	99.49
02B4513	45,494,329	27,837,697	61.19	163,696	39,526	148.08	1.63	99.72
18B11396	50,053,377	34,734,538	69.39	901,921	686,054	139.58	1.85	99.76
13B29948_reextr	51,348,688	38,412,332	74.81	985,308	747,725	144.85	2.04	99.62
10B8110	33,858,396	23,331,580	68.91	204,748	121,767	387.68	1.84	99.69
13B27110	64,997,108	50,135,263	77.13	1,150,757	746,277	145.04	1.45	99.58
14B13206	96,316,913	66,589,024	69.14	2,018,392	1,662,880	115.23	1.73	99.67
00B9136	73,554,166	44,790,170	60.89	332,840	189,449	440.93	1.37	99.38
18B19075	29,281,299	21,574,307	73.68	1,111,845	867,811	68.23	1.74	99.68

Figura 9. Resultados descriptivos de la segunda tanda de RRBS.

### 6.C. Estudio bioinformático

En el reanálisis bioinformático de las secuencias obtenidas tras la secuenciación RRBS con los programas Bismark v0.22.1, MultiQC v1.7 y Qualimap v2.2.1 se observó que las lecturas tenían de media entre 15 y 50 pb y que la calidad de todas en general era válida para continuar con el análisis.

El valor de Phred score (parámetro de calidad en la identificación de las bases generadas por la secuenciación) era mayor de 30 en todas las muestras, siendo la media mayor a 35. Los valores de Phred score suelen variar entre 2 y 40, siendo los scores más elevados aquellos que tienen una mayor probabilidad de que la base que la secuenciación ha otorgado sea correcta. El score de calidad Phred (Q) está relacionado logarítmicamente con la probabilidad de error de las llamadas de base (E), representado con la siguiente ecuación:

$$Q = -10 \log E$$

Por lo tanto, se puede interpretar esta puntuación como una estimación del error, donde éste es, por ejemplo, la probabilidad de que el secuenciador llame incorrectamente a la base, pero también puede interpretarse como una estimación de la precisión, como la probabilidad de que



el secuenciador haya identificado correctamente la base. Por eso, con el valor de calidad Phred se puede definir la probabilidad de error:

$$E = 10^{-\left(\frac{Q}{10}\right)}$$

En nuestro caso, un valor de Phred score de 30 o superior significa que la precisión a la hora de calificar cualquier base es mayor o igual a 99,9%, siendo la probabilidad de error menor o igual a 0,1% (Figura 10).

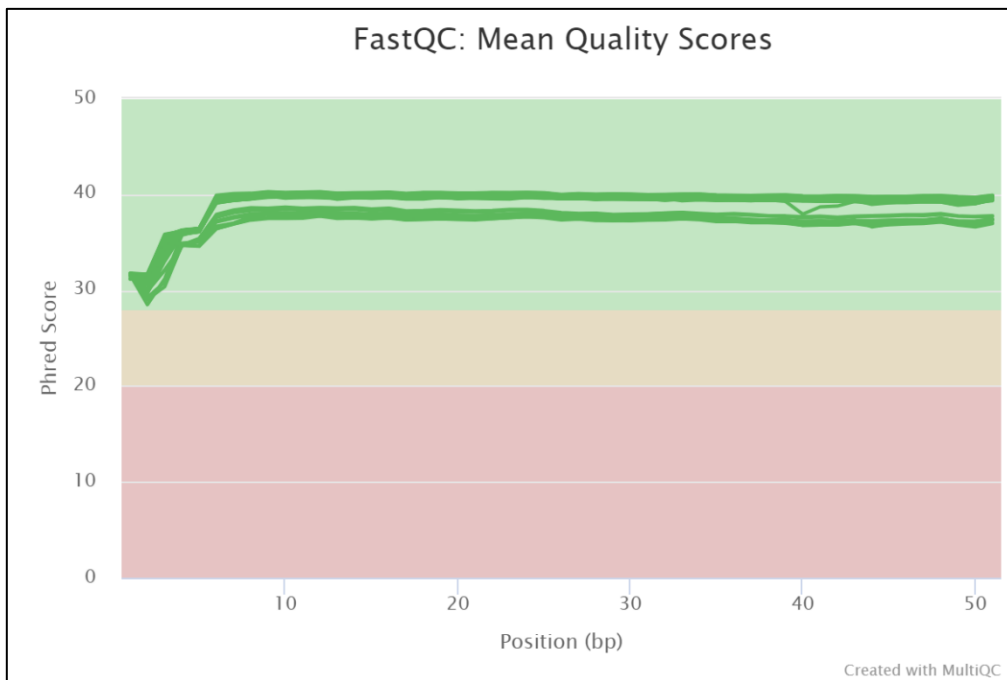


Figura 10. Phred score por base de las muestras (multiqc software).

El análisis de componentes principales o PCA no muestra diferencias entre los distintos grupos con los datos completos de la secuenciación (Figura 11) indicando que no hay un sesgo en las muestras intrínseco por la secuenciación, aunque sí aparecen valores extremos (outliers).

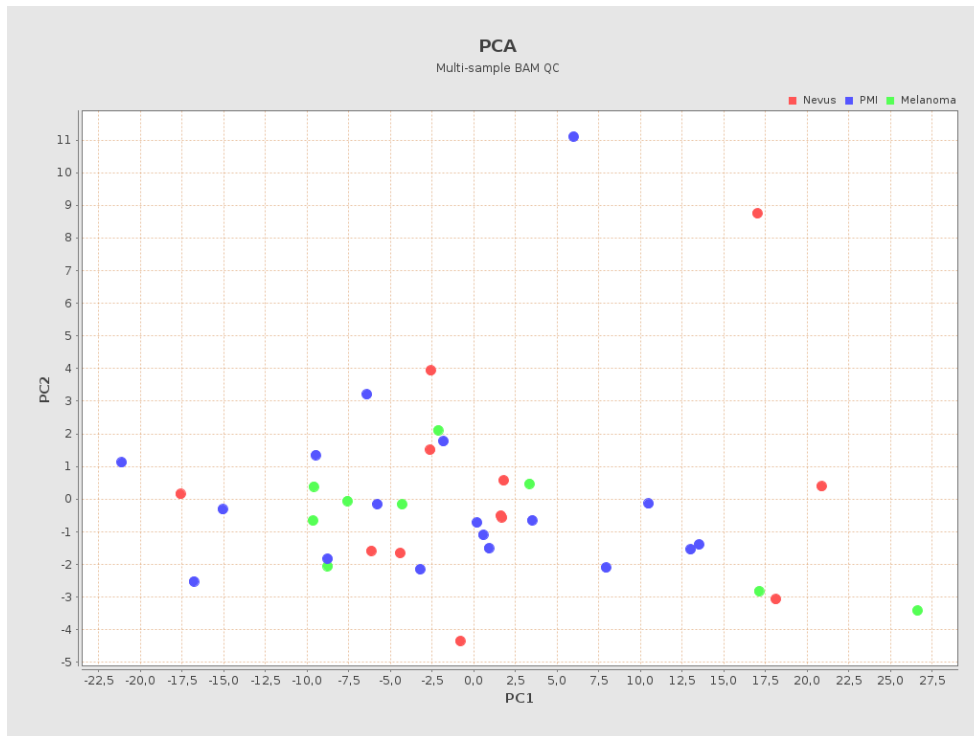


Figura 11. PCA de todas las muestras agrupadas por grupo experimental (qualimap software).

Si se analiza cada muestra de forma individual se observa que en los análisis de los archivos *fastqc* todas las muestras pasan los criterios de calidad (Figura 12).

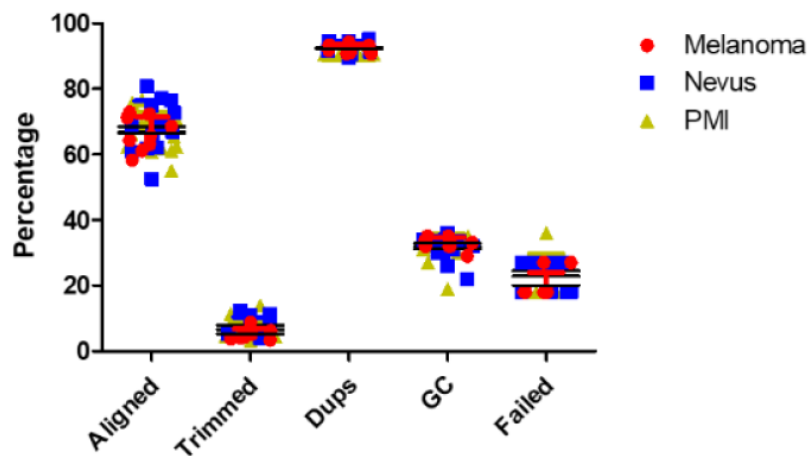


Figura 12. Porcentaje de metilación global de CpG por grupo experimental encontrado por multiqc en los archivos de la llamada de metilación.

Al inspeccionar los ficheros BAM (alineamiento contra el genoma de referencia hg19) observamos que las muestras alinean entre el 50% y el 80%, siendo el 70% signo de calidad (Figura 13).

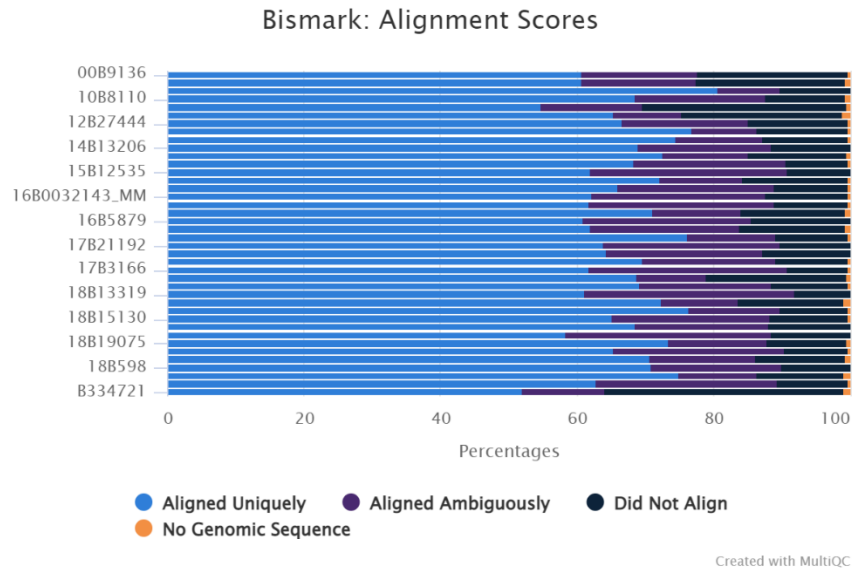
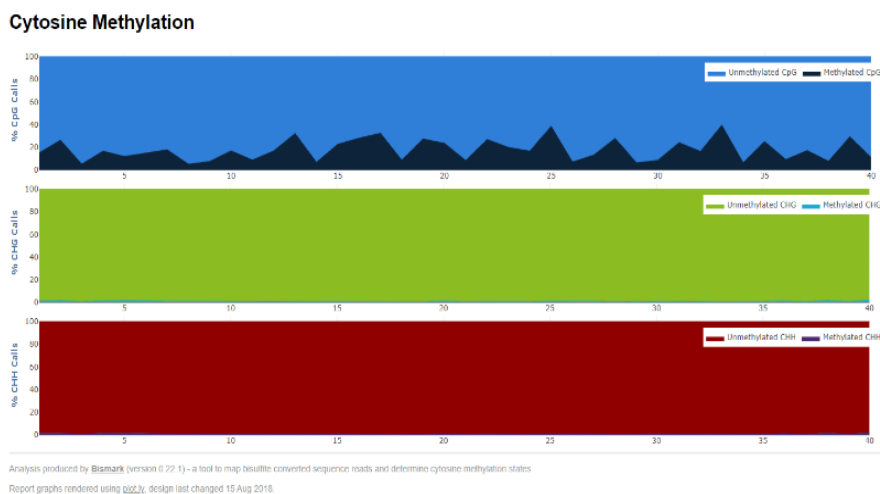


Figura 13. Porcentaje de alineamiento contra el genoma de referencia hg19 de todas las muestras visualizado por multiqc software.

El nivel de metilación de las islas CpG en las muestras estudiadas era de entre un 5% y un 40%, y la metilación de sitios no-CpG (CHG y CHH, donde H es cualquier nucleótido excepto guanina) era inferior al 2%, criterio que nos indica que la conversión de bisulfito en la técnica RRBS había funcionado correctamente<sup>80</sup> (Figura 14).



Analysis produced by Bismark (version 0.22.1) - a tool to map bisulfite converted sequence reads and determine cytosine methylation states. Report graphs rendered using g22.0, design last changed 15 Aug 2018.

Figura 14. Porcentaje de citosinas metiladas en zonas CpG (azul), CHG (verde) y CHH (rojo) por muestra visualizado por Bismark software.

Las muestras agrupadas en función de su diagnóstico mostraban de media un porcentaje de metilación de CpG muy parecido, por lo que las posibles diferencias se debían buscar en cada posición concreta (Figura 15).

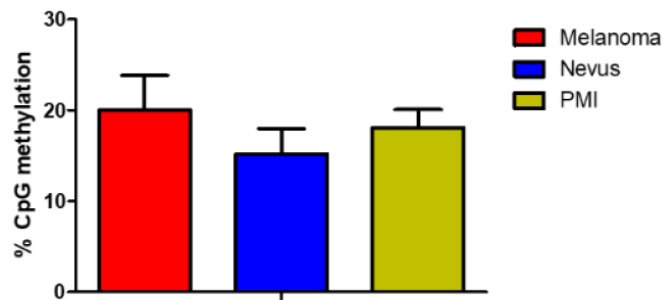


Figura 15. Porcentaje de metilación de CpG por grupo biológico. One-way ANOVA no paramétrico no significativo ( $p > 0,05$ ).

Las CpG identificadas en la llamada de metilación con un coverage mayor de 10 no eran uniformes en todas las muestras. Si se considerara un punto de corte del 20%, hay tres muestras que no entrarían en el análisis (Figura 16).

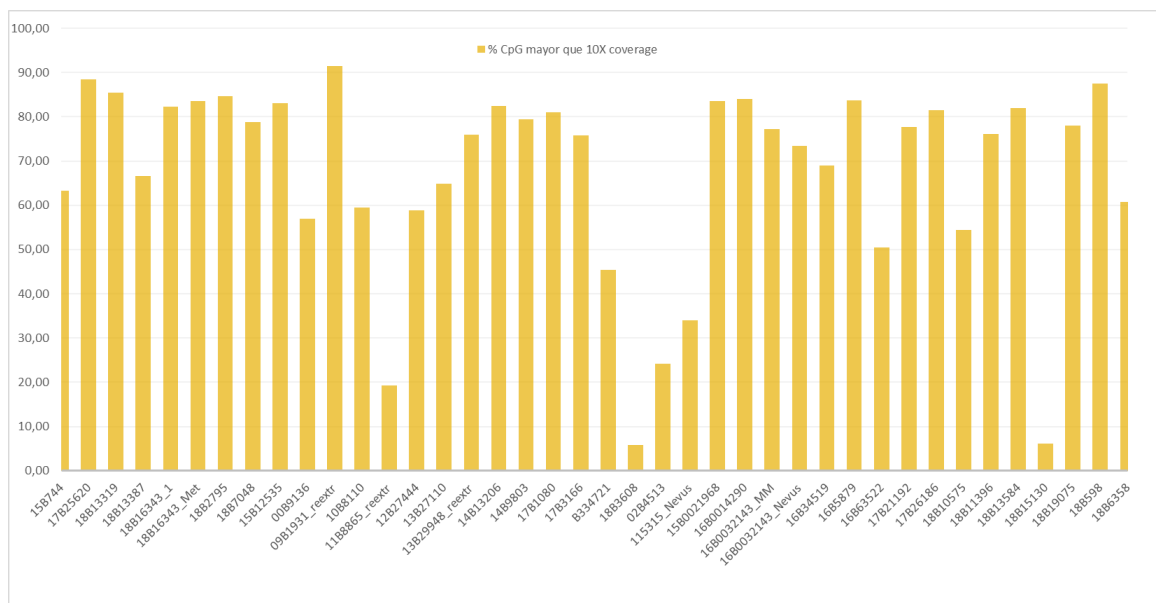


Figura 16. Porcentaje de CpG con un coverage mayor que 10X.

La normalización se realizó con la función `normalizeCoverage` del paquete `methylKit` implementado en R, que normaliza el coverage entre las distintas muestras. Por defecto, para el análisis se usan solo las bases con un coverage de al menos 10.



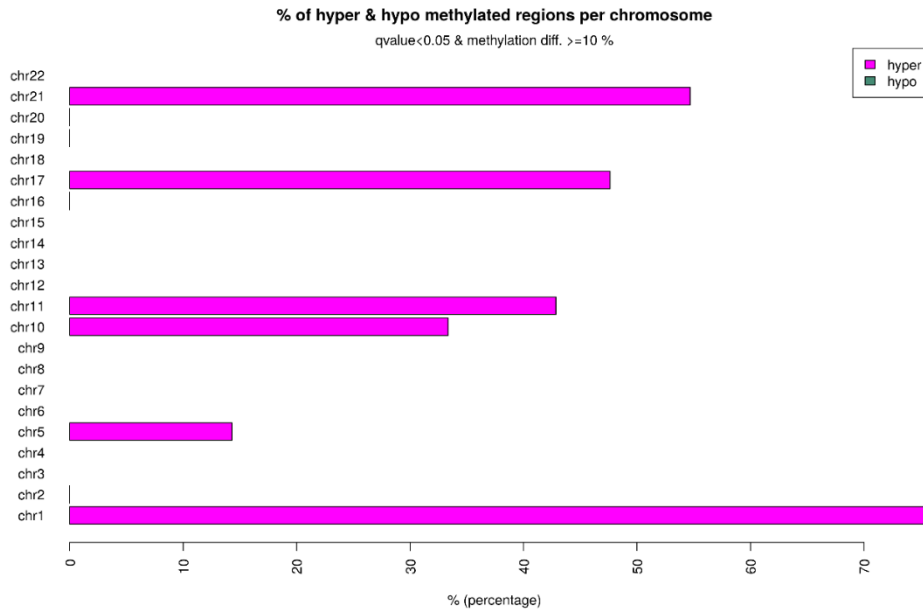


Figura 18. Porcentaje de metilación por cromosoma.

El mapa de calor o heatmap realizado con los sitios significativos mostró que no había una clara separación entre los grupos de nevus, TSPMI y melanoma. Este hecho puede deberse a que los tumores melanocíticos spitzoides ambiguos son un grupo heterógeno, que presenta algunas características similares a los nevus y otras parecidas a melanoma (Figura 19).

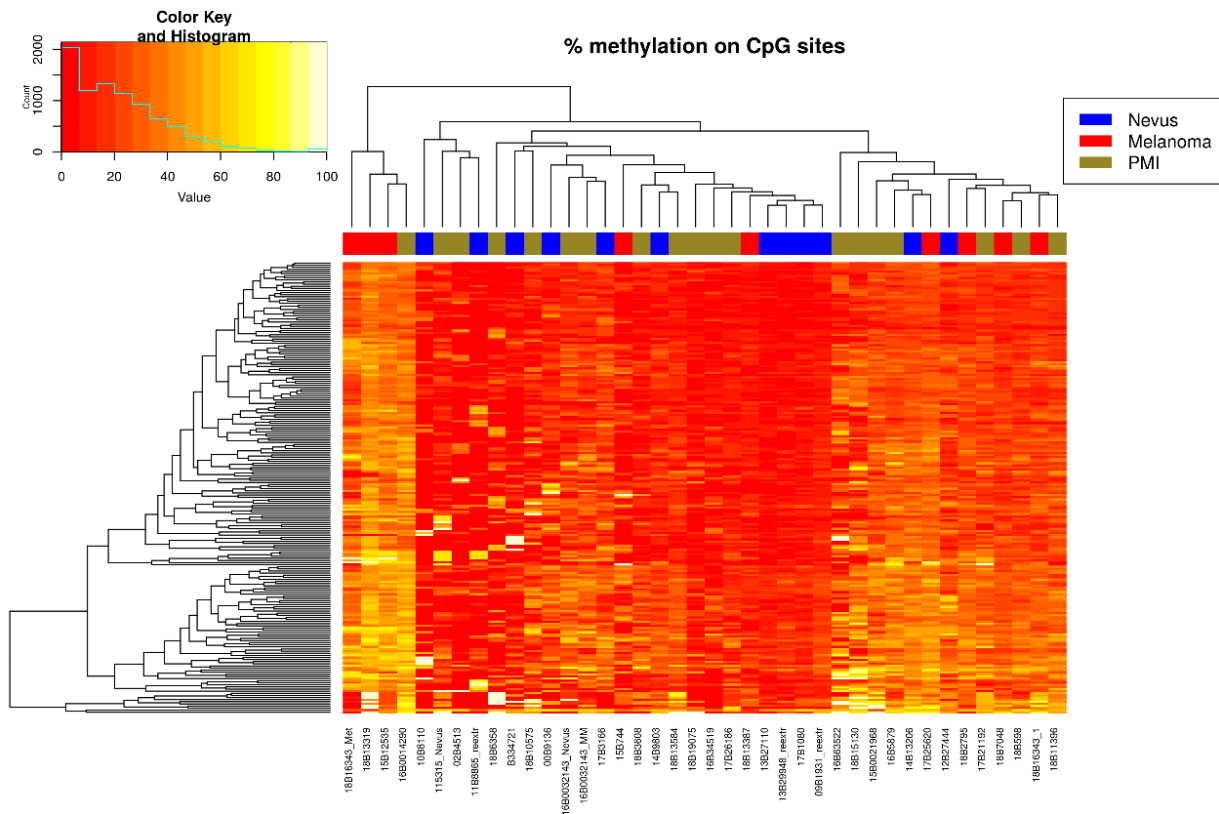


Figura 19. Heatmap que muestra los 214 sitios con más del 10% de diferencia de metilación respecto al control (Nevus) con  $q$ -valor  $< 0,05$  en la comparación de los tres grupos biológicos.

Sin embargo, si únicamente realizáramos el estudio de contraste partiendo de los grupos nevus y melanoma, se observó que las diferencias entre los grupos estaban más definidas (Figura 20) y se detectaron 224 sitios, tanto hipometilados como. Se repitieron estos análisis con todos los grupos juntos y por separado, eliminando las tres muestras que no llegaban al 20% de diferencia de metilación y con un 10X de coverage, obteniéndose similares resultados, por lo que se prosiguió con el estudio incluyendo todas las muestras.

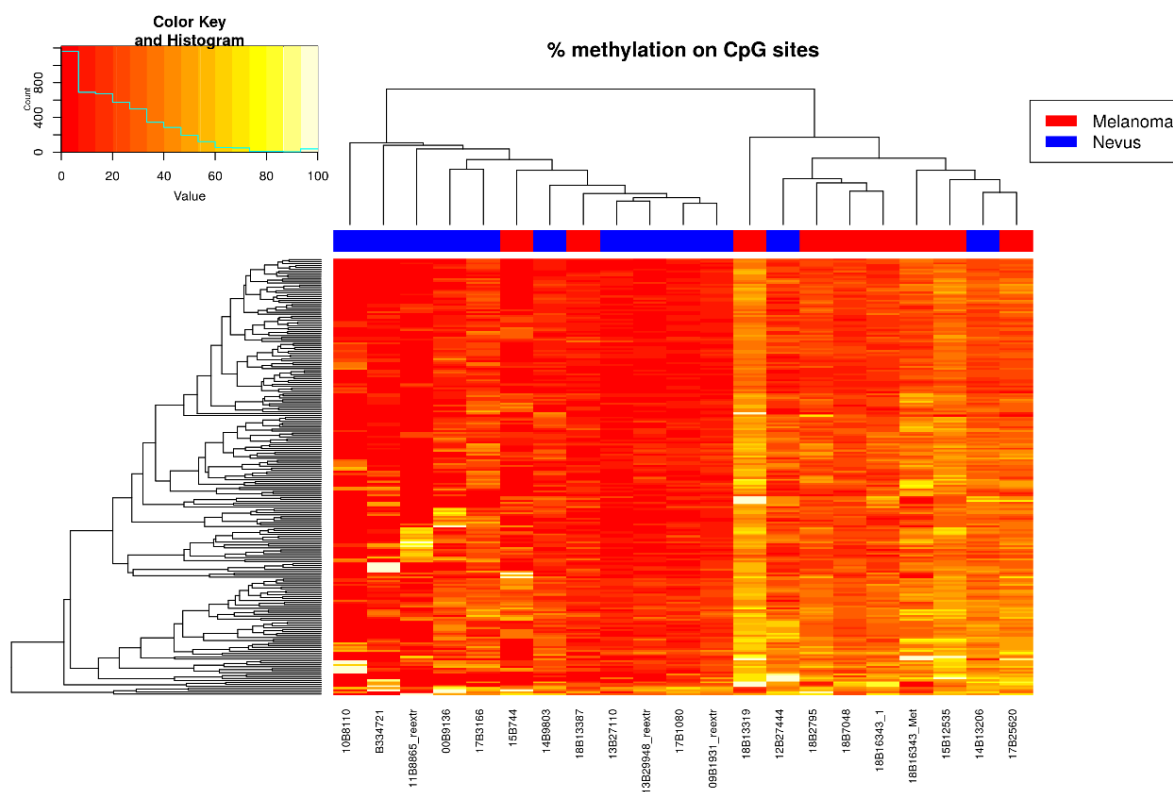


Figura 20. Heatmap que muestra los 224 sitios con más del 10% de diferencia de metilación respecto al control (Nevus) con  $q$ -valor  $< 0,05$  en la comparación con melanoma.

Puesto que la finalidad del estudio es predecir cómo van a evolucionar los tumores spitzoides diagnosticados como TSPMI en función de sus similitudes respecto a los grupos nevus y/o melanoma, se utilizó la comparación diferencial entre estos dos grupos para construir los modelos predictivos.

Partiendo del estudio bioinformático, de los 224 sitios CpG diferencialmente metilados, se seleccionaron 7 CpGs que eran significativos con un  $p$ -valor menor o igual que 0,02 (Tabla 18).



Tabla 18. Información de los 7 CpGs diferencialmente metilados.

Cromosoma	Posición (cg)	Gen	Transcrito	CpG ID NO.
17	31149610	MYO1D	NM_015194	1
21	9826086	TEKT4P2	NR_038327	2
21	9825862	TEKT4P2	NR_038327	3
21	9825882	TEKT4P2	NR_038327	4
21	9826034	TEKT4P2	NR_038327	5
17	31149858	MYO1D	NM_015194	6
1	156186376	PMF1-BGLAP	NM_001199662	7

Cuatro de los siete sitios cg se encuentran en el gen TEKT4P2, dos sitios están en el gen MYO1D y el restante está en PMF1-BGLAP.

MYO1D (Myosin ID) es un gen que codifica una proteína con el mismo nombre y se sitúa en el exosoma extracelular. Se trata de una miosina no convencional que funciona como una proteína motora basada en actina con actividad ATPasa. Participa en el tráfico de proteínas endosómicas.

TEKT4P2 no es un gen sino un pseudogen (Tektin 4 Pseudogene 2), es decir, no es capaz de codificar una proteína.

PMF1-BGLAP es un *locus* que se transcribe entre los genes PMF1 (Polyamin-modulated factor 1) y BGLAP (Bone gamma-carboxyglutamate Gla protein). Participa en la mitosis celular y PMF1 es un importante parólogo de este gen.

Con el estudio estadístico descriptivo y predictivo de los 40 casos pudimos ver que los siete sitios de metilación efectivamente son significativos como buenos predictores del diagnóstico, observando que valores elevados de metilación son predictores de melanoma (Tabla 19):

Tabla 19. Descripción de los sitios cg en función del diagnóstico y su valor predictivo.  
Prueba exacta de Fisher. \* = (p-valor < 0,05); \*\* = (p-valor < 0,01)

CpG ID NO.	Diagnóstico	n	Media	Desviación típica (sd)	Mediana	Mínimo	Máximo	p-valor
1	Melanoma	9	36,03	15,92	37,45	6,54	64,03	0,0060**
	Nevus	12	10,23	15,22	0,51	0	43,22	
	TSPMI	19	38,07	33,46	35,74	0	100	
2	Melanoma	9	36,394	15,643	37,278	7,904	54,93	0,0126*
	Nevus	12	14,637	10,973	14,783	0,195	33,487	
	TSPMI	19	23,764	15,969	24,082	0,352	63,861	
3	Melanoma	9	20,326	12,478	20,883	0,291	41,998	0,0247*
	Nevus	12	5,35	7,096	1,404	0	22,063	
	TSPMI	19	10,191	10,256	9,405	0	32,002	
4	Melanoma	9	28,74	13,46	28,62	11,76	54,17	0,0292*
	Nevus	12	9,01	12,28	2,37	0	32,29	
	TSPMI	19	26,02	26,60	20,93	0	96	
5	Melanoma	9	29,384	12,949	31,052	5,725	44,024	0,0058**
	Nevus	12	12,151	9,319	14,089	0	30,764	
	TSPMI	19	17,305	11,036	20,154	0,133	43,539	
6	Melanoma	9	20,01	8,09	20,86	5,77	31,25	0,0117*
	Nevus	12	7,61	6,81	6,74	0	21,69	
	TSPMI	19	11,49	8,05	12,46	0	28,75	
7	Melanoma	9	25,029	9,107	22,168	9,261	39,041	0,0376*
	Nevus	12	12,296	7,968	10,018	4,122	27,348	
	TSPMI	19	19,464	12,048	20,274	0,103	40,735	

Adicionalmente, se observó una mayor metilación en las lesiones diagnosticadas como melanoma en comparación con las lesiones nevus (Figura 21).

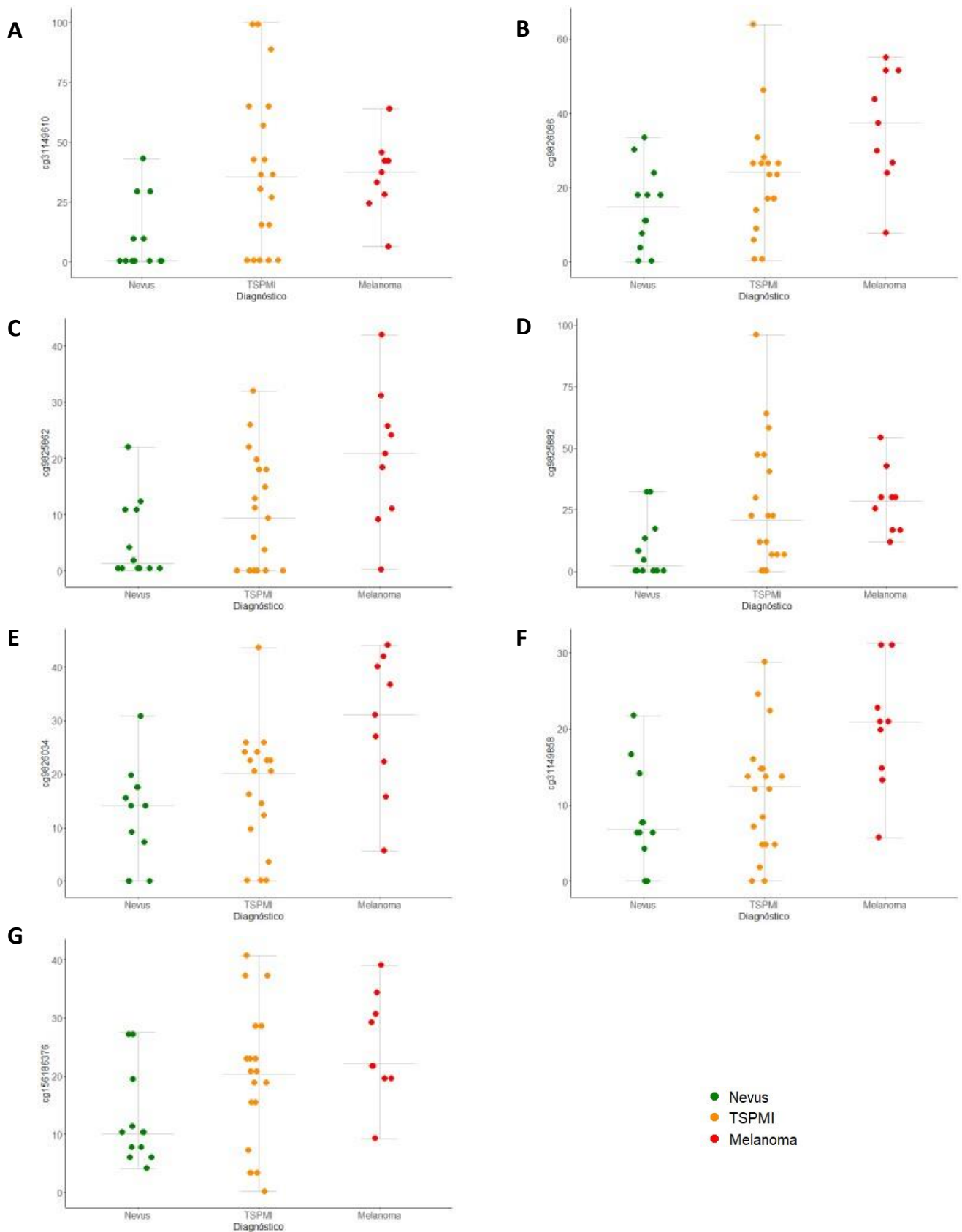


Figura 21. Porcentaje de metilación de los sitios diferencialmente metilados en función del diagnóstico. (A) cg31149610 - CpG ID NO 1. (B) cg9826086 - CpG ID NO 2. (C) cg9825862 - CpG ID NO 3. (D) cg9825882 - CpG ID NO 4. (E) cg9826034 - CpG ID NO 5. (F) cg31149858 - CpG ID NO 6. (G) cg156186376 - CpG ID NO 7.

Se realizó el análisis de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic curve) (Figura 22) de cada uno de los sitios individuales para determinar su capacidad predictiva, así como para determinar el punto de corte de una escala continua en el que se consigue la sensibilidad y especificidad más alta y evaluar la capacidad discriminativa de los sitios cg (Tabla 20).

*Tabla 20. Especificidad, sensibilidad y área bajo la curva de los 7 sitios CpG individualmente.*

<b>CpG ID NO.</b>	<b>cg</b>	<b>Gen</b>	<b>Especificidad</b>	<b>Sensibilidad</b>	<b>AUC</b>	<b>Cut-off</b>
<b>1</b>	31149610	MYO1D	0,75	0,889	0,861	17,163
<b>2</b>	9826086	TEKT4P2	0,75	0,889	0,861	21,219
<b>3</b>	9825862	TEKT4P2	0,833	0,778	0,852	11,014
<b>4</b>	9825882	TEKT4P2	0,667	1	0,833	10,007
<b>5</b>	9826034	TEKT4P2	0,917	0,778	0,861	21,041
<b>6</b>	31149858	MYO1D	0,75	0,889	0,852	10,554
<b>7</b>	156186376	PMF1-BGLAP	0,75	0,889	0,852	15,235

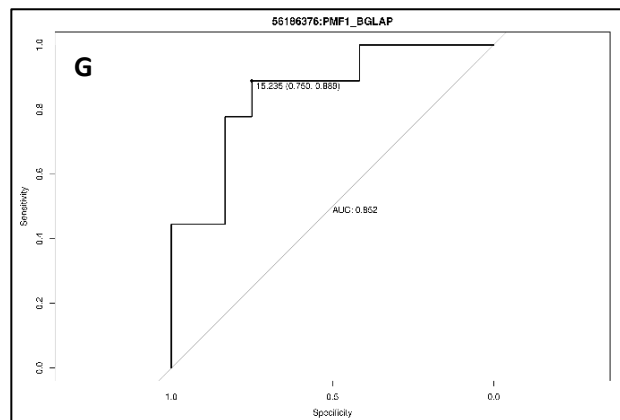
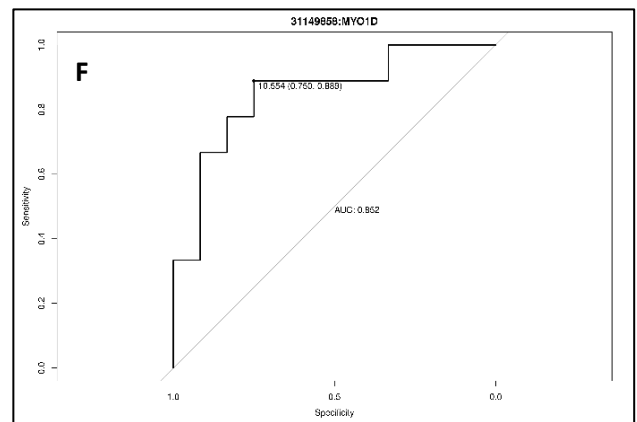
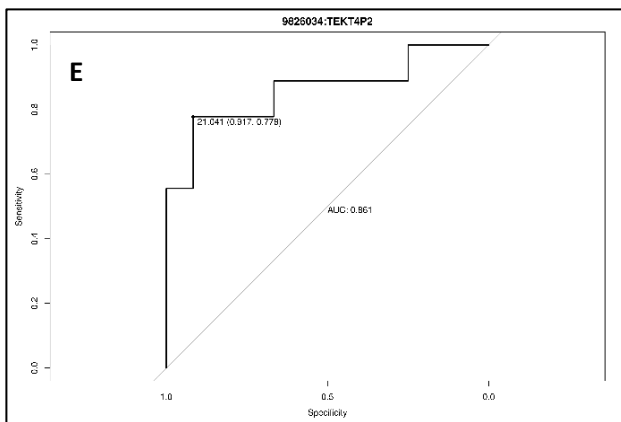
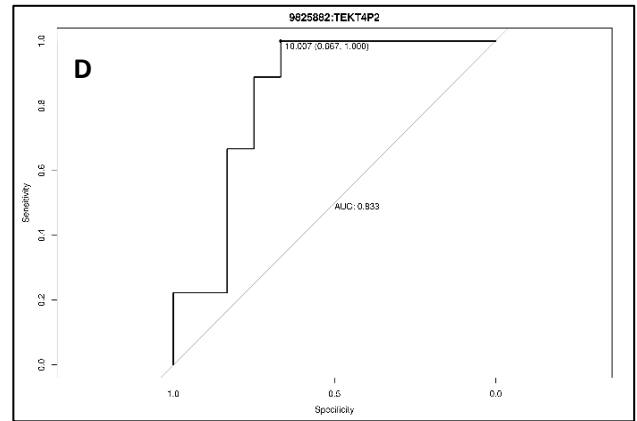
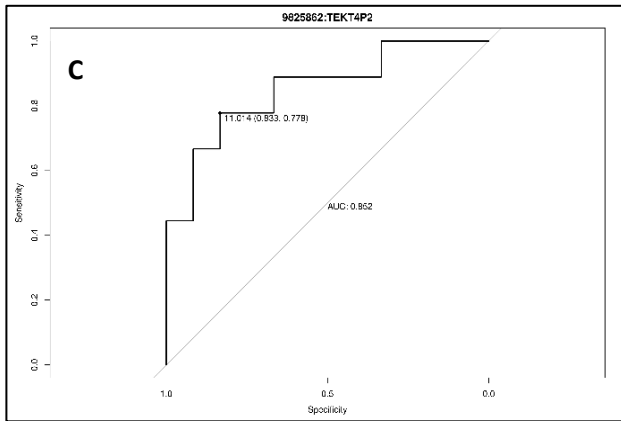
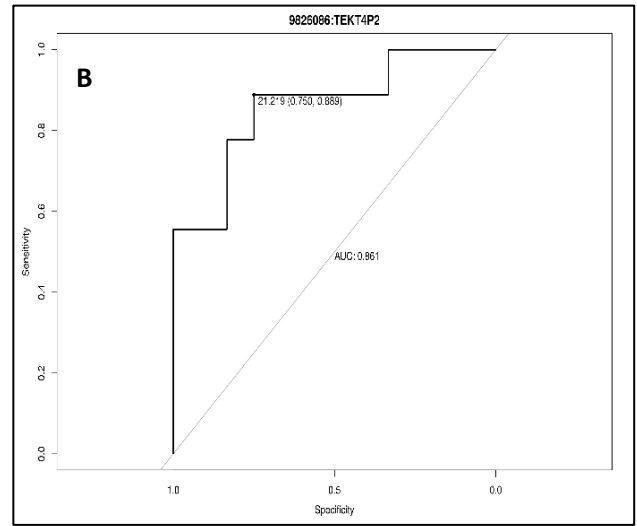
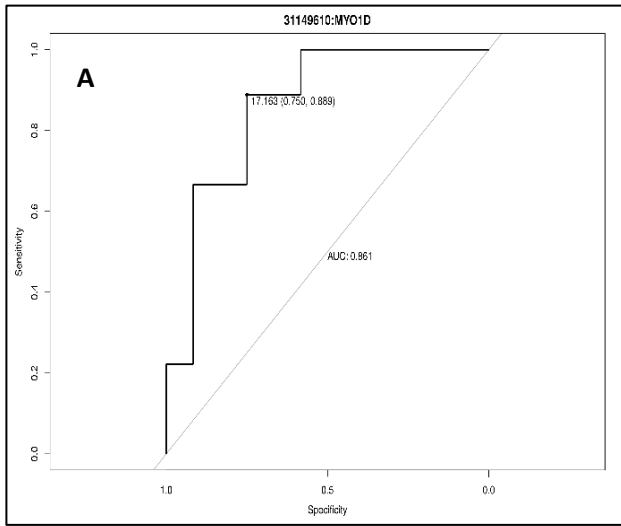


Figura 22. Curvas ROC individuales para (A) cg 31149610 - CpG ID NO 1. (B) cg 9826086 - CpG ID NO 2. (C) cg 9825862 - CpG ID NO 3. (D) cg 9825882 - CpG ID NO 4. (E) cg 9826034 - CpG ID NO 5. (F) cg 31149858 - CpG ID NO 6. (G) cg 156186376 - CpG ID NO 7.

El punto de corte o cut-off define el valor de metilación para el que se consigue la máxima especificidad y sensibilidad para cada CpG. La sensibilidad nos indica la capacidad de cada uno de los CpGs para dar clasificar los melanomas, mientras que la especificidad nos marca la capacidad de éstos para detectar los nevus. El área bajo la curva (AUC) refleja que todos los cg fueron efectivos a la hora de discriminar el diagnóstico ya que los valores están contenidos entre 0,75 y 0,9, considerando que un AUC igual a 1 significa la discriminación perfecta y que un AUC igual a 0,5 es la no discriminación.

A partir de los 7 sitios CpG con un p-valor  $\leq 0,02$ , se construyeron dos modelos predictivos en R, con la función glm del paquete stats, a partir de aproximaciones distintas:

1. **Modelo 1:** Se escogieron los 7 sitios CpG con un p-valor  $\leq 0,02$  en los modelos independientes para construir el modelo final predictivo. La ecuación que calcula la probabilidad de ser clasificado como modelo en el modelo 1 sigue la fórmula:

$$P(\text{Melanoma}) = \frac{1}{(1 + \exp^{-(-342,3+3,4A-10,3B+3,4C+8,9D+8,0E+11,0F-8,7G)})}$$

Donde los índices de A a G se corresponden con el porcentaje de metilación encontrado en cada uno de los 7 sitios incluidos en la ecuación (A: CpG ID NO 3, B: CpG ID NO 4, C: CpG ID NO 5, D: CpG ID NO 2, E: CpG ID NO 1, F: CpG ID NO 6, G: CpG ID NO 7).

Cuando se clasificaron las muestras de nevus y melanomas spitzoides utilizadas para la construcción del modelo 1 creado, se pudo observar que era capaz de clasificar el 100% de las muestras en el grupo correcto con un p-valor de  $2e-4$ . Es decir, la firma epigenética identificada permitía clasificar con una sensibilidad del 100% los casos de melanoma y con una especificidad del 100% los casos de nevus, mejorando así la clasificación individual de cada uno de los siete sitios (Tabla 21).

Tabla 21. Predicción de las muestras spitzoides nevus y melanoma según el modelo 1.

Muestra	Grupo	Predicción
1	Melanoma	Melanoma
2	Melanoma	Melanoma
3	Melanoma	Melanoma
4	Melanoma	Melanoma
5	Melanoma	Melanoma
6	Melanoma	Melanoma
7	Melanoma	Melanoma
8	Melanoma	Melanoma
9	Nevus	Nevus
10	Nevus	Nevus
11	Nevus	Nevus

<b>12</b>	Nevus	Nevus
<b>13</b>	Nevus	Nevus
<b>14</b>	Nevus	Nevus
<b>15</b>	Nevus	Nevus
<b>16</b>	Nevus	Nevus
<b>17</b>	Nevus	Nevus
<b>18</b>	Melanoma	Melanoma
<b>19</b>	Nevus	Nevus
<b>20</b>	Nevus	Nevus
<b>21</b>	Nevus	Nevus

En cuanto a la clasificación de los tumores de potencial maligno incierto, de las que se desconoce su estatus real, el modelo 1 las clasificó en función de nevus o melanoma según la siguiente tabla (Tabla 22):

*Tabla 22. Predicción de las muestras spitzoides de potencial maligno incierto según el modelo 1.*

<b>Muestra</b>	<b>Grupo</b>	<b>Predicción</b>
<b>22</b>	TSPMI	Nevus
<b>23</b>	TSPMI	Nevus
<b>24</b>	TSPMI	Nevus
<b>25</b>	TSPMI	Melanoma
<b>26</b>	TSPMI	Nevus
<b>27</b>	TSPMI	Melanoma
<b>28</b>	TSPMI	Nevus
<b>29</b>	TSPMI	Melanoma
<b>30</b>	TSPMI	Melanoma
<b>31</b>	TSPMI	Melanoma
<b>32</b>	TSPMI	Nevus
<b>33</b>	TSPMI	Melanoma
<b>34</b>	TSPMI	Melanoma
<b>35</b>	TSPMI	Melanoma
<b>36</b>	TSPMI	Melanoma
<b>37</b>	TSPMI	Nevus
<b>38</b>	TSPMI	Nevus
<b>39</b>	TSPMI	Nevus
<b>40</b>	TSPMI	Nevus

Si obtenemos valores de  $P(\text{Melanoma}) < 0,4$ , el modelo 1 clasifica los tumores spitzoides de TSPMI como muestras que se comportan como lesiones benignas y, por tanto, con un grado bajo de malignidad. Por otro lado, se predice que las muestras TSPMI se comportarán como muestras de melanoma spitzoide, con un grado alto de malignidad, cuando los valores de  $P(\text{Melanoma})$  son  $\geq 0,4$ .

Mediante gráficos heatmap del porcentaje de metilación de los sitios CpGs utilizados para el modelo 1 se pudo observar que las muestras nevus y melanoma spitzoide se agrupaban (cluster) mejor cuando se separaban de los tumores de potencial maligno incierto (Figura 23).

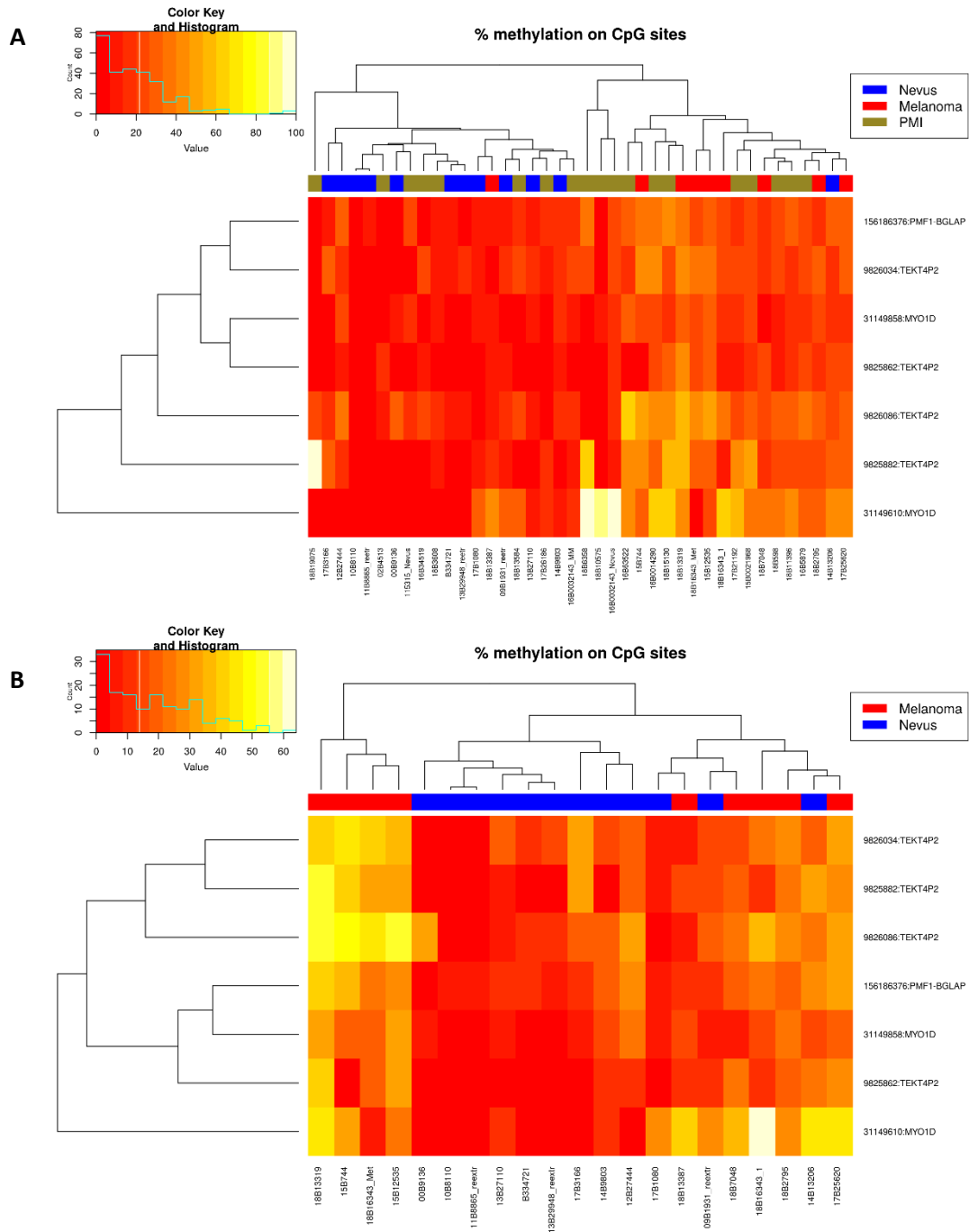


Figura 23. Heatmaps de los sitios CpG usados para construir el modelo 1. (A) Todos los grupos. (B) Sólo los grupos nevus y melanoma.

- Modelo 2:** Utilizando el paquete de R glmulti se obtuvo una estimación de cuál era la mejor combinación de los siete sitios CpG significativos empleados en el modelo 1.



Como resultado, se observó que la mejor combinación predictiva eran los sitios cg31149610 (CpG ID NO 1) y cg9826086 (CpG ID NO 2).

La ecuación que calcular la probabilidad de ser clasificado como melanoma en este modelo sigue la siguiente fórmula:

$$P(\text{Melanoma}) = \frac{1}{(1 + \exp^{-(-0,16-0,012A+0,014B)})}$$

Donde los índices de A y B se corresponden con el porcentaje de metilación encontrado en sitios incluidos en la ecuación (A: CpG ID NO 1, B: CpG ID NO 2).

Para evaluar el poder de clasificación de este modelo se construyó la correspondiente curva ROC para el diagnóstico de melanoma (Figura 24):

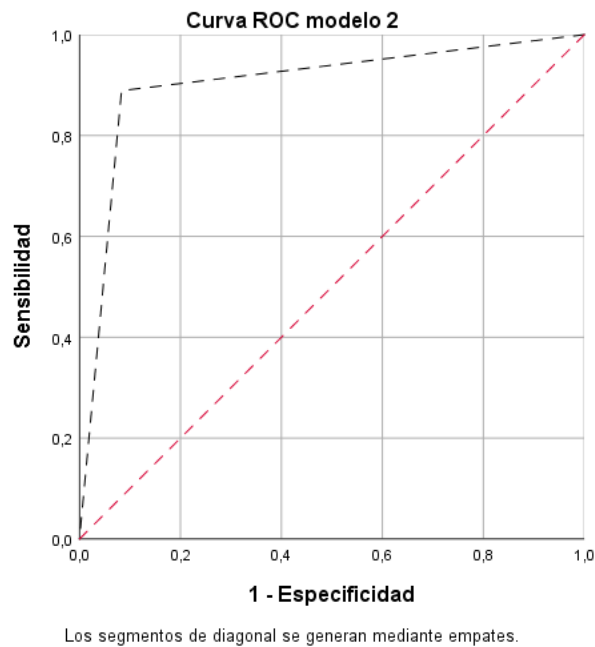


Figura 24. Curva ROC para el diagnóstico de melanoma utilizando el modelo 2.

El análisis de la curva ROC mostró un AUC de 0,903 (IC 95% 0,75-1,00), con un p-valor de 0,002, y estableció un valor de corte para prueba positiva en una probabilidad calculada a partir del modelo en 0,5, la sensibilidad sería del 88,9% y la especificidad del 91,7%, mejorando así la clasificación de cada uno de los siete sitios individuales, pero sin llegar a las características del modelo 1.

Las predicciones para las muestras nevus y melanoma utilizadas en la construcción del modelo 2 son (Tabla 23):

Tabla 23. Predicción de las muestras spitzoides nevus y melanoma según el modelo 2. En rojo se muestran las predicciones que no coinciden con el diagnóstico.

Muestra	Grupo	Predicción
1	Melanoma	Melanoma
2	Melanoma	Melanoma
3	Melanoma	Nevus
4	Melanoma	Melanoma
5	Melanoma	Melanoma
6	Melanoma	Melanoma
7	Melanoma	Melanoma
8	Melanoma	Melanoma
9	Nevus	Nevus
10	Nevus	Nevus
11	Nevus	Nevus
12	Nevus	Nevus
13	Nevus	Nevus
14	Nevus	Nevus
15	Nevus	Nevus
16	Nevus	Melanoma
17	Nevus	Nevus
18	Melanoma	Melanoma
19	Nevus	Nevus
20	Nevus	Nevus
21	Nevus	Nevus

Las muestras TSPMI, de las que se desconoce su estatus real, este modelo las clasificó en nevus o melanoma, tal y como se indicaba en el modelo 1. Es decir, a valores  $P(\text{Melanoma}) < 0,4$  fueron clasificadas como nevus, mientras que a valores de  $P(\text{Melanoma}) \geq 0,4$  se clasificaron como melanoma (Tabla 24).

Tabla 24. Predicción de las muestras spitzoides de potencial maligno incierto según el modelo 2.

<b>Muestra</b>	<b>Grupo</b>	<b>Predicción</b>
<b>22</b>	TSPMI	Nevus
<b>23</b>	TSPMI	Nevus
<b>24</b>	TSPMI	Melanoma
<b>25</b>	TSPMI	Melanoma
<b>26</b>	TSPMI	Nevus
<b>27</b>	TSPMI	Melanoma
<b>28</b>	TSPMI	Nevus
<b>29</b>	TSPMI	Melanoma
<b>30</b>	TSPMI	Melanoma
<b>31</b>	TSPMI	Melanoma
<b>32</b>	TSPMI	Nevus
<b>33</b>	TSPMI	Melanoma
<b>34</b>	TSPMI	Melanoma
<b>35</b>	TSPMI	Melanoma
<b>36</b>	TSPMI	Melanoma
<b>37</b>	TSPMI	Nevus
<b>38</b>	TSPMI	Melanoma
<b>39</b>	TSPMI	Melanoma
<b>40</b>	TSPMI	Nevus

Los heatmaps de metilación de los dos sitios CpG para todas las muestras (Figura 25.A) y para los grupos nevus y melanoma son (Figura 25.B):



Por lo tanto, al comparar los dos modelos se observó que el modelo 1 predecía las muestras según el diagnóstico realizado por un patólogo, mientras que en el modelo 2 hay dos muestras que categorizaba de forma distinta, por lo que ambos modelos predicen de forma idéntica el 90,48% de las muestras (Tabla 25.A). De los 19 tumores de potencial maligno incierto (Tabla 25.B), solo 3 reciben una predicción diferente entre los dos modelos predictivos, por lo que la similitud de los modelos a la hora de predecir el comportamiento de los tumores ambiguos es del 84,21%.

Tabla 25. Predicción, según los modelos 1 y 2, de las muestras estudiadas (A) nevus y melanoma y (B) TSPMI por RRBS. En rojo se muestran las predicciones que no coinciden.

A				B			
Muestra	Grupo	Predicción 1	Predicción 2	Muestra	Grupo	Predicción 1	Predicción 2
1	Melanoma	Melanoma	Melanoma	22	TSPMI	Nevus	Nevus
2	Melanoma	Melanoma	Melanoma	23	TSPMI	Nevus	Nevus
3	Melanoma	Melanoma	Nevus	24	TSPMI	Nevus	Melanoma
4	Melanoma	Melanoma	Melanoma	25	TSPMI	Melanoma	Melanoma
5	Melanoma	Melanoma	Melanoma	26	TSPMI	Nevus	Nevus
6	Melanoma	Melanoma	Melanoma	27	TSPMI	Melanoma	Melanoma
7	Melanoma	Melanoma	Melanoma	28	TSPMI	Nevus	Nevus
8	Melanoma	Melanoma	Melanoma	29	TSPMI	Melanoma	Melanoma
9	Nevus	Nevus	Nevus	30	TSPMI	Melanoma	Melanoma
10	Nevus	Nevus	Nevus	31	TSPMI	Melanoma	Melanoma
11	Nevus	Nevus	Nevus	32	TSPMI	Nevus	Nevus
12	Nevus	Nevus	Nevus	33	TSPMI	Melanoma	Melanoma
13	Nevus	Nevus	Nevus	34	TSPMI	Melanoma	Melanoma
14	Nevus	Nevus	Nevus	35	TSPMI	Melanoma	Melanoma
15	Nevus	Nevus	Nevus	36	TSPMI	Melanoma	Melanoma
16	Nevus	Nevus	Melanoma	37	TSPMI	Nevus	Nevus
17	Nevus	Nevus	Nevus	38	TSPMI	Nevus	Melanoma
18	Melanoma	Melanoma	Melanoma	39	TSPMI	Nevus	Melanoma
19	Nevus	Nevus	Nevus	40	TSPMI	Nevus	Nevus
20	Nevus	Nevus	Nevus				
21	Nevus	Nevus	Nevus				

#### 6.D. Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM)

Para validar los resultados obtenidos del estudio RRBS, se optó por estudiar los siete sitios de metilación con una técnica independiente. La empresa danesa MethylDetect, especializada en estudios de metilación del ADN, se encargó del diseño de las sondas.

Los siete sitios CpG se encuentran en tres genes (1 y 6 en el gen MYO1D; 2, 3, 4 y 5 en el gen TEKT4P2; y 7 en el gen PMF1-BGLAP). Durante el estudio de las regiones para diseñar las sondas específicas, se observó que los sitios CpG del gen MYO1D, al igual que en el gen TEKT4P2, se

encuentran muy cerca unos de otros. Por lo tanto, finalmente se diseñaron únicamente tres sondas distintas, cubriendo cada una de ellas un gen de los anteriormente citados.

El análisis e interpretación de los resultados se realizó mediante el LightCycler® 480 Software Version 1.5 (Roche). Los resultados de los Ct se obtuvieron a partir de la opción “Abs Quant/2nd Derivative Max”, mientras que las curvas de metilación se estudiaron con los softwares “Tm Calling” y “Gene Scanning”. Así, se consiguieron los valores de Ct y se pudo observar los diferentes niveles de metilación. Para tratar los datos con objetividad, se utilizó el valor de la altura de los picos obtenidos en las “Tm Calling”. Se generaron de forma manual dos picos: Tm1 (pico de no-metilación) y Tm2 (pico de metilación) (Figura 26). En base a los valores obtenidos para la altura de los picos y, utilizando los controles positivos de cada kit como recta patrón, se pudo interpolar los valores y obtener el porcentaje de metilación de las muestras.

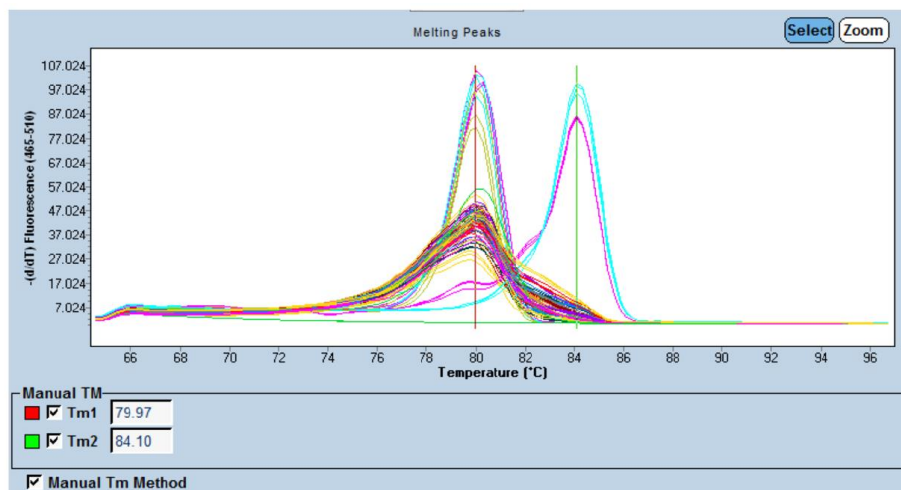


Figura 26. Captura del programa LightCycler®480 Software Version 1.5 (Roche). En la opción “Tm Calling” se observan los picos obtenidos. Se generan de forma manual dos picos, Tm1 (no metilación, en color rojo) y Tm2 (metilación, en color verde).

Se llevó a cabo una primera fase para poner a punto la metodología MS-HRM y comprobar la eficiencia de las sondas diseñadas para los genes PMF1, MYO1D y TEKT4P2. Se realizaron un total de 6 experimentos diferentes para observar la eficiencia de las sondas, utilizando únicamente los ADN control incluidos en el kit de MS-HRM de cada uno de los tres genes estudiados.

De los resultados obtenidos para el gen PMF1 se pudieron observar diferentes niveles de metilación que correspondían a cada uno de los controles, en los que las curvas más inferiores se deben a niveles de metilación menores o nulos, mientras que las curvas superiores corresponden a niveles de metilación elevados (Figura 27).

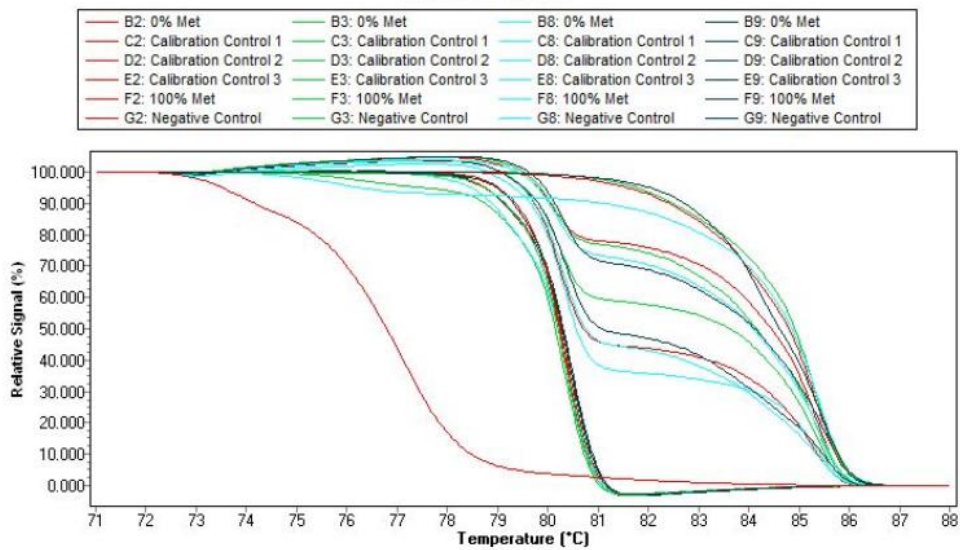


Figura 27. Curvas normalizadas de melting obtenidas para el gen PMF1.

Si tenemos en cuenta los picos de metilación (Figura 28), los situados a la izquierda del gráfico corresponden a niveles de metilación menores o nulos, y los de la derecha a niveles de metilación elevados.

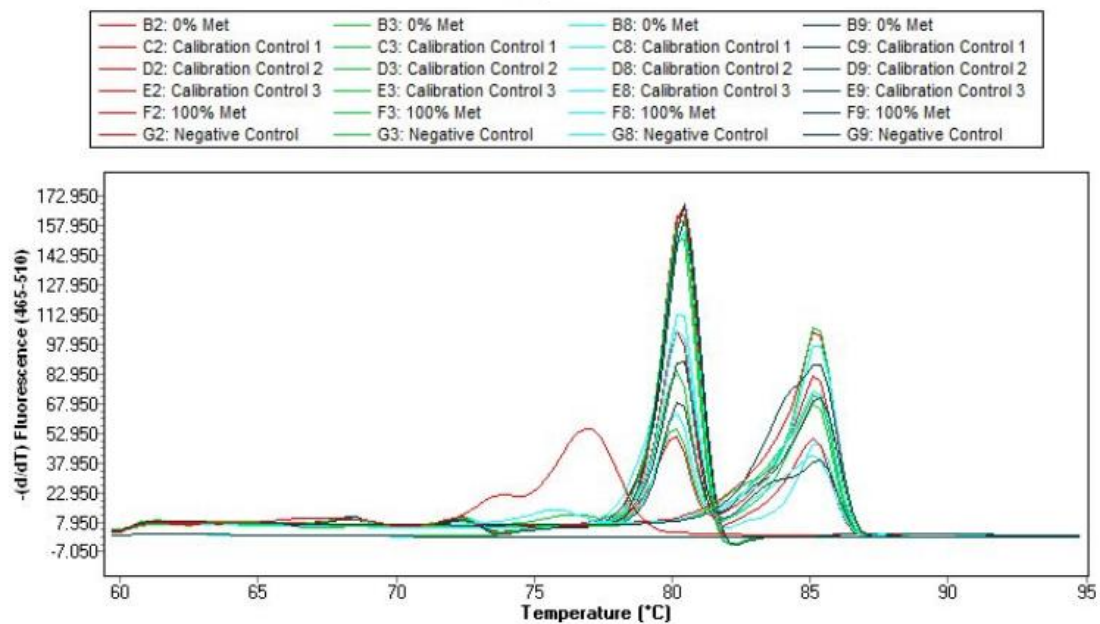


Figura 28. Picos de melting obtenidos para el gen PMF1.

Se observó que los valores Ct obtenidos del gen PMF1 estaban comprendidos entre 32 y 37, siendo más elevados de lo estimado, ya que se considera que los valores de Ct deberían ser inferiores a 30 (Figura 29).

Results					
Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration
<input checked="" type="checkbox"/>	B2	0% Met	Unknown	33.82	
<input checked="" type="checkbox"/>	B3	0% Met	Unknown	33.23	
<input checked="" type="checkbox"/>	B8	0% Met	Unknown	33.45	
<input checked="" type="checkbox"/>	B9	0% Met	Unknown	33.60	
<input checked="" type="checkbox"/>	C2	Calibration Control 1	Unknown	37.32	
<input checked="" type="checkbox"/>	C3	Calibration Control 1	Unknown	36.22	
<input checked="" type="checkbox"/>	C8	Calibration Control 1	Unknown	36.01	
<input checked="" type="checkbox"/>	C9	Calibration Control 1	Unknown	36.76	
<input checked="" type="checkbox"/>	D2	Calibration Control 2	Unknown	33.35	
<input checked="" type="checkbox"/>	D3	Calibration Control 2	Unknown	32.83	
<input checked="" type="checkbox"/>	D8	Calibration Control 2	Unknown	32.53	
<input checked="" type="checkbox"/>	D9	Calibration Control 2	Unknown	32.89	
<input checked="" type="checkbox"/>	E2	Calibration Control 3	Unknown	32.76	
<input checked="" type="checkbox"/>	E3	Calibration Control 3	Unknown	32.94	
<input checked="" type="checkbox"/>	E8	Calibration Control 3	Unknown	33.01	
<input checked="" type="checkbox"/>	E9	Calibration Control 3	Unknown	33.50	
<input checked="" type="checkbox"/>	F2	100% Met	Unknown	34.73	
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	100% Met	Unknown	36.39	
<input checked="" type="checkbox"/>	F8	100% Met	Unknown	35.19	
<input checked="" type="checkbox"/>	F9	100% Met	Unknown	38.14	

Figura 29. Resultados de la técnica MS-HRM para el gen PMF1. Valores de Ct (CP) obtenidos para las muestras controles.

Dado que los valores de Ct eran muy elevados para un análisis óptimo del porcentaje de la metilación y que la cantidad de ADN por muestra era muy limitada, se priorizaron los otros dos genes y se descartó el estudio del gen PMF1.

Los valores de Ct que se obtuvieron para el gen MYO1D oscilaban entre 27 y 32, considerándose aceptables para su posterior análisis (Figura 30).



**Results**

Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration
<input checked="" type="checkbox"/>	B4	0% Met	Unknown	31.37	
<input checked="" type="checkbox"/>	B5	0% Met	Unknown	32.10	
<input checked="" type="checkbox"/>	B10	0% Met	Unknown	30.78	
<input checked="" type="checkbox"/>	B11	0% Met	Unknown	31.49	
<input checked="" type="checkbox"/>	C4	Calibration Control 1	Unknown	32.40	
<input checked="" type="checkbox"/>	C5	Calibration Control 1	Unknown	31.76	
<input checked="" type="checkbox"/>	C10	Calibration Control 1	Unknown	32.53	
<input checked="" type="checkbox"/>	C11	Calibration Control 1	Unknown	33.10	
<input checked="" type="checkbox"/>	D4	Calibration Control 2	Unknown	32.06	
<input checked="" type="checkbox"/>	D5	Calibration Control 2	Unknown	32.04	
<input checked="" type="checkbox"/>	D10	Calibration Control 2	Unknown	33.20	
<input checked="" type="checkbox"/>	D11	Calibration Control 2	Unknown	31.91	
<input checked="" type="checkbox"/>	E4	Calibration Control 3	Unknown	29.89	
<input checked="" type="checkbox"/>	E5	Calibration Control 3	Unknown	30.30	
<input checked="" type="checkbox"/>	E10	Calibration Control 3	Unknown	30.32	
<input checked="" type="checkbox"/>	E11	Calibration Control 3	Unknown	29.49	
<input checked="" type="checkbox"/>	F4	100% Met	Unknown	27.97	
<input checked="" type="checkbox"/>	F5	100% Met	Unknown	27.78	
<input checked="" type="checkbox"/>	F10	100% Met	Unknown	27.81	
<input checked="" type="checkbox"/>	F11	100% Met	Unknown	27.13	

Figura 30. Resultados de la técnica MS-HRM para el gen MYO1D. Valores de Ct (CP) obtenidos para las muestras controles.

Al igual que en el gen PMF1, se obtuvieron las gráficas con las curvas (Figura 31) y los picos (Figura 32) de melting para el gen MYO1D.

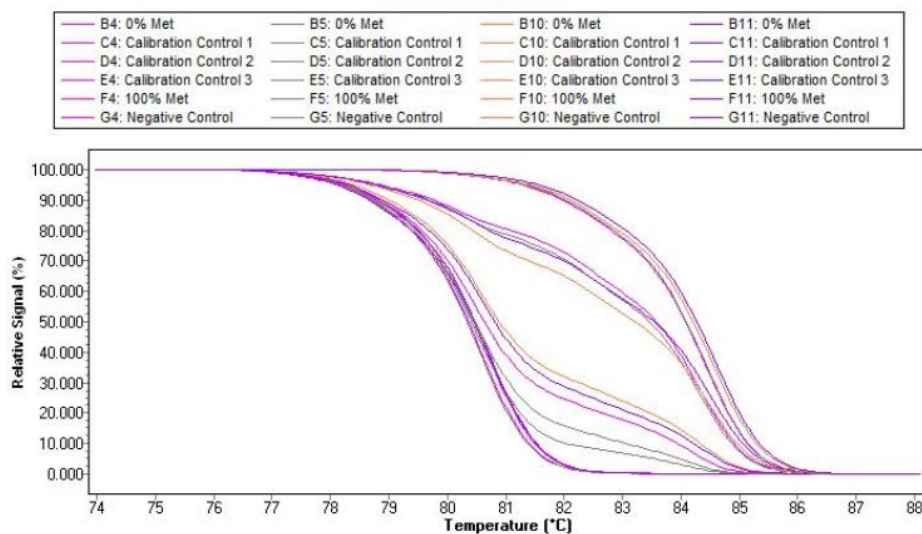


Figura 31. Curvas normalizadas de melting obtenidas para el gen MYO1D.

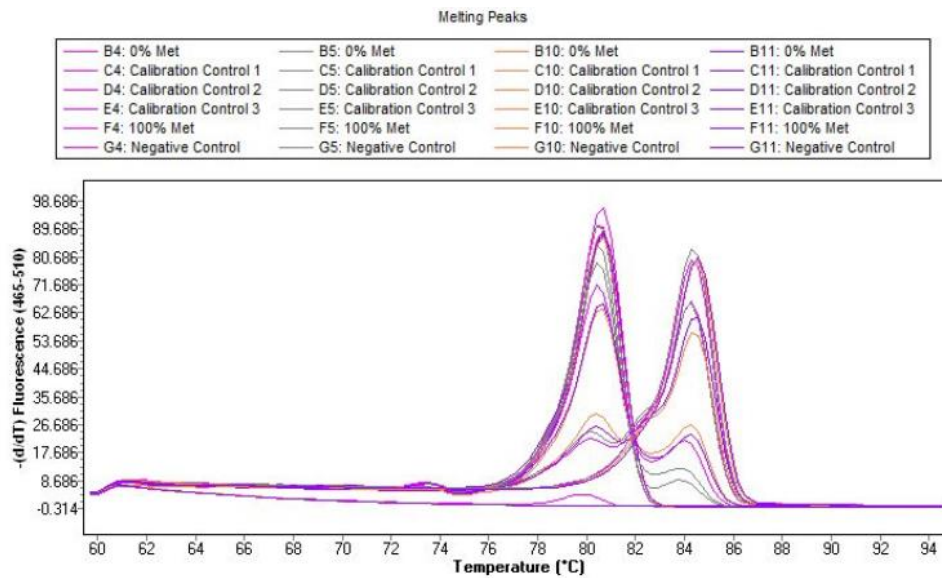


Figura 32. Picos de melting obtenidos para el gen MYO1D.

Los resultados obtenidos para el gen TEKT4P2 en esta fase del estudio mostraron que era el gen con mejores valores de Ct, entre 26 y 28 (Figura 33).

Results					
Inc	Pos	Name	Type	CP	Concentration
<input checked="" type="checkbox"/>	F2	Control 1	Unknown	28.38	
<input checked="" type="checkbox"/>	F3	Control 2	Unknown	27.71	
<input checked="" type="checkbox"/>	F4	Control 3	Unknown	26.27	
<input checked="" type="checkbox"/>	F5	100% Met	Unknown	26.39	
<input checked="" type="checkbox"/>	F6	Negative Control	Unknown		
<input checked="" type="checkbox"/>	G1	0% Met	Unknown	25.96	
<input checked="" type="checkbox"/>	G2	Control 1	Unknown	28.76	
<input checked="" type="checkbox"/>	G3	Control 2	Unknown	27.54	
<input checked="" type="checkbox"/>	G4	Control 3	Unknown	26.00	
<input checked="" type="checkbox"/>	G5	100% Met	Unknown	26.38	
<input checked="" type="checkbox"/>	G6	Negative Control	Unknown		
<input checked="" type="checkbox"/>	H1	0% Met	Unknown	26.47	
<input checked="" type="checkbox"/>	H2	Control 1	Unknown	28.58	
<input checked="" type="checkbox"/>	H3	Control 2	Unknown	27.96	
<input checked="" type="checkbox"/>	H4	Control 3	Unknown	25.89	
<input checked="" type="checkbox"/>	H5	100% Met	Unknown	26.71	
<input checked="" type="checkbox"/>	H6	Negative Control	Unknown		

Figura 33. Resultados de la técnica MS-HRM para el gen TEKT4P2. Valores de Ct (CP) obtenidos para las muestras controles.

Se obtuvieron las curvas (Figura 34) y los picos (Figura 35) de melting para el gen TEKT4P2.

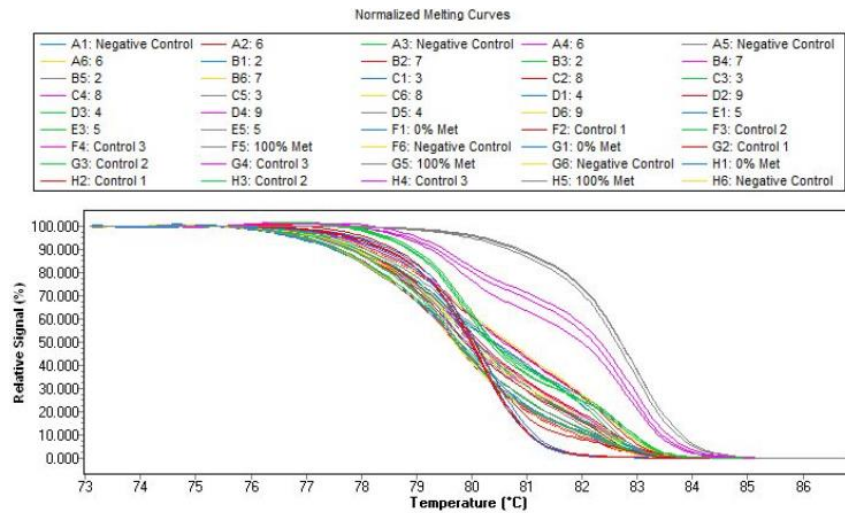


Figura 34. Curvas normalizadas de melting obtenidas para el gen TEKT4P2.

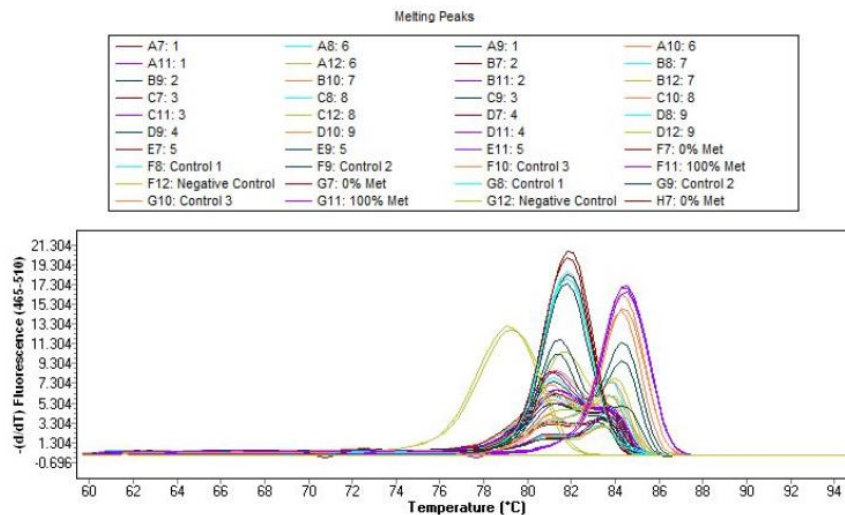


Figura 35. Picos de melting obtenidos para el gen TEKT4P2.

La segunda fase fue validar las muestras de parafina de pacientes con lesiones melanocíticas (nevus, TSPMI y melanoma). Se realizaron 4 experimentos de validación.

En el primer experimento se quería comprobar que la técnica funcionaba con las muestras parafinadas y éstas habían sido convertidas con bisulfito correctamente. Para ello partimos de un total de 9 muestras, utilizando tres muestras de cada uno de los grupos biológicos, y utilizando únicamente las sondas del gen TEKT4P2, ya que era el gen que mejores resultados brindó en la primera fase. Los resultados obtenidos fueron correctos, y mostraban una mayor metilación en las muestras de melanoma spitzoide (24,3%) respecto a los nevus (11,3%). El porcentaje de metilación de las lesiones TSPMI era de 18,76%.

Visto que los resultados fueron correctos, se realizó el segundo experimento con 24 muestras (8 nevus, 8 TSPMI y 8 melanomas) para los genes TEKT4P2 y MYO1D. Para el gen TEKT4P2, se observó una mayor metilación en las muestras de melanomas spitzoides (28,8%) que en las muestras de lesiones spitzoides benignas (16,9%), siendo una diferencia estadísticamente significativa con un p-valor < 0,0001. Las muestras del grupo de lesiones spitzoides ambiguas se podrían distribuir según tuvieran un comportamiento similar a nevus o a melanoma en función del porcentaje de metilación, siendo necesario establecer un punto de corte para poder clasificarlas con seguridad (Tabla 26).

*Tabla 26. Clasificación de las lesiones TSPMI del segundo experimento MS-HRM en función del porcentaje de metilación de TEKT4P2.*

<b>TSPMI</b>	<b>% promedio de metilación</b>	<b>Clasificación</b>
<b>1</b>	18,51	Nevus
<b>2</b>	23,77	Posible melanoma
<b>3</b>	22,14	Posible melanoma
<b>4</b>	14,27	Nevus
<b>5</b>	7,41	Nevus
<b>6</b>	16,73	Nevus
<b>7</b>	41,64	Melanoma
<b>8</b>	30,81	Melanoma

Por otro lado, los resultados obtenidos para el gen MYO1D mostraron que no había diferencias en los niveles de metilación entre las muestras de nevus (9,2%), TSPMI (9,2%) y melanoma (11,3%) spitzoides. El análisis estadístico para el valor de Tm1, correspondiente a los niveles no metilados, no mostró diferencias significativas (p-valor = 0,4071).

Realizamos un tercer experimento, para aumentar el número de casos estudiados. Se analizaron 7 nuevas muestras de cada grupo biológico (21 muestras en total). En esta prueba no se obtuvieron resultados satisfactorios ya que todos los valores obtenidos parecían como no metilados. Posiblemente, el proceso de tratamiento con bisulfito de las muestras falló, y como se utilizó todo el volumen de la muestra disponible, no se pudo repetir el experimento.

Por ese motivo, se seleccionaron nuevas muestras para realizar un cuarto experimento. Se escogió una nueva cohorte de 8 nevus, 6 TSPMI y 6 melanomas (22 muestras en total), para estudiar los niveles de metilación de TEKT4P2 y MYO1D. Se confirmó la existencia de una mayor metilación en los tumores spitzoides malignos (9,4%) que en los benignos (1,6%), con una

diferencia estadísticamente significativa ( $p$ -valor  $< 0,0006$ ) cuando se estudió el gen PMF1. Las lesiones TSPMI se podrían clasificar en función del porcentaje de metilación en comportamiento similar a nevus o a melanoma, siendo necesario establecer un punto de corte para poder clasificarlas con seguridad (Tabla 27).

*Tabla 27. Clasificación de las lesiones TSPMI del cuarto experimento MS-HRM en función del porcentaje de metilación de TEKT4P2.*

<b>TSPMI</b>	<b>% promedio de metilación</b>	<b>Clasificación</b>
<b>9</b>	2,7	Nevus
<b>10</b>	0,95	Nevus
<b>11</b>	8,77	Melanoma
<b>12</b>	5,48	Posible melanoma
<b>13</b>	2,44	Posible nevus
<b>14</b>	-0,27	Nevus
<b>15</b>	3,06	Posible nevus
<b>16</b>	8,55	Melanoma

En este nuevo estudio se observó que, al igual que en el segundo experimento, no existían diferencias significativas en los niveles de metilación entre las muestras nevus, TSPMI y melanoma para el gen MYO1D ( $p$ -valor = 0,975).

#### **6.E. PCR a tiempo real de genes**

Dado que tanto el gen PMF1 como el gen MYO1D no pudieron ser validados mediante la técnica MS-HRM, no fueron seleccionados para ser estudiados por PCR a tiempo real.

Los datos obtenidos tras la PCR cuantitativa del gen TEKT4P2 procedentes de las réplicas técnicas se analizaron con el software “Design and Analysis”, dentro de la aplicación ThermoFisher Connect. Los datos se exportaron y se analizaron con el programa estadístico GraphPad Prism 9, utilizando el gen 18S y GAPDH como controles endógenos.

Se descartó el uso del gen GAPDH como control endógeno porque no se amplificaba en muchas de las muestras, y en aquellas en las que sí presentaban una curva de amplificación, el Ct era muy elevado y no era uniforme.

Se establecieron entonces unos valores umbral para los genes TEKT4P2 y 18S, y posteriormente se realizó la cuantificación relativa mediante el método  $2^{-\Delta Ct}$  (foldchange), utilizando el promedio de Ct los valores obtenidos para ambos genes en cada una de las muestras.

Todas las muestras presentaron amplificación para el gen control 18S y el Ct promedio era 19,77. Tres muestras no se amplificaron cuando se estudió el gen TEKT4P2 (dos muestras nevus y una muestra TSPMI), y el Ct promedio para este gen fue 35,55. Se analizaron los datos mediante un test Kruskal-Wallis para comparar el foldchange entre las muestras nevus, TSPMI y melanoma, obteniendo que el estudio no es significativo ( $p$ -valor = 0,3749), por lo que no hay diferencias en la expresión de ARN mensajero del gen TEKT4P2 entre los diferentes tipos de lesiones spitzoides (Figura 36).

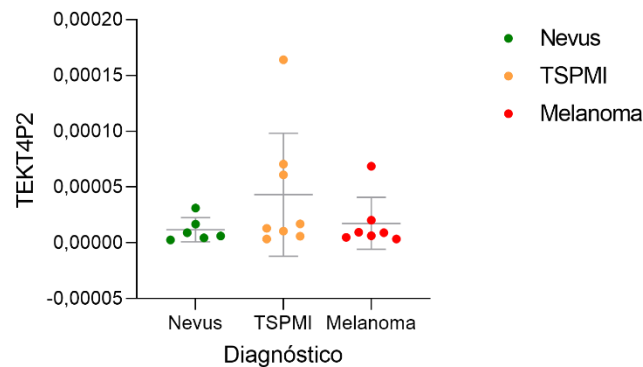


Figura 36. Expresión del gen TEKT4P2 en función del diagnóstico.

#### 6.F. PCR a tiempo real de miRNAs

Los datos obtenidos tras la PCR cuantitativa de los miRNAs estudiados procedentes de las réplicas técnicas se analizaron con el software “Design and Analysis”, dentro de la aplicación ThermoFisher Connect, utilizando el gen RNU6B como control endógeno. Se establecieron unos valores umbral para cada uno de los miRNAs y posteriormente se realizó la cuantificación relativa mediante el método  $2^{-\Delta Ct}$ , utilizando el promedio de los valores obtenidos para cada uno de los miRNAs respecto con el promedio de expresión del gen endógeno RNU6B en cada una de las muestras.

Se realizó un estudio de correlación entre los valores de foldchange de cada miRNA (Tabla 28), observando que excepto en 2 casos, todas las correlaciones son positivas, es decir, que el aumento de expresión de un miRNA conlleva el aumento de expresión de otro. Además, la mayoría de correlaciones fueron significativas ( $p$ -valor < 0,05).

Tabla 28. Correlación entre los diferentes miRNAs, expresado como el coeficiente de correlación rho y (p-valor).

\*\* = (p-valor < 0,01); \*\*\* = (p-valor < 0,001)

miRNA	miR-125	miR-137	miR-182	miR-191	miR-200c	miR-205	miR-21	miR-211	miR-221	miR-9
miR-125		0,3736 (0,0016**)	0,3887 (0,0009***)	0,662 (0,0000***)	0,3528 (0,0040**)	0,4287 (0,0001***)	0,546 (0,0000***)	0,2112 (0,3358)	0,4252 (0,0002***)	0,2577 (0,1192)
miR-137			0,0822 (1)	0,1644 (0,7896)	0,0103 (1)	0,0808 (1)	0,2786 (0,0641)	-0,2346 (0,2239)	0,3971 (0,0006***)	-0,0824 (1)
miR-182				0,5495 (0,0000***)	0,913 (0,0000***)	0,851 (0,0000***)	0,2027 (0,3812)	0,4945 (0,0000***)	0,3779 (0,0014**)	0,4584 (0,0000***)
miR-191					0,5061 (0,0000***)	0,5599 (0,0000***)	0,6388 (0,0000***)	0,6143 (0,0000***)	0,5066 (0,0000***)	0,4397 (0,0001***)
miR-200c						0,9264 (0,0000***)	0,1628 (0,7896)	0,4879 (0,0000***)	0,326 (0,0117*)	0,4175 (0,0002***)
miR-205							0,2326 (0,2239)	0,5302 (0,0000***)	0,4292 (0,0001***)	0,4144 (0,0003***)
miR-21								0,1675 (0,7896)	0,5047 (0,0000***)	0,1265 (1)
miR-211									0,2237 (0,2616)	0,4823 (0,0000***)
miR-221										0,1043 (1)
miR-9										

La siguiente tabla recoge el estudio estadístico descriptivo para los miRNAs, y el valor predictivo (p-valor) de éstos para predecir el diagnóstico (Tabla 29):

Tabla 29. Descripción de los miRNAs en función del diagnóstico y su valor predictivo.

Prueba exacta de Fisher. \* = (p-valor < 0,05); \*\* = (p-valor < 0,01)

Variable	Diagnóstico	n	media	Desviación típica (sd)	Mediana	Mínimo	Máximo	p-valor
miR-125	Melanoma	22	91,83	103,85	53,99	5,52	404,22	0,2906
	Nevus	39	96,62	83,48	66,95	11,62	320,9	
	TSPMI	44	124,59	111,43	108,32	5,89	495,93	
miR-137	Melanoma	22	0,117	0,155	0,0558	0,000457	0,547	0,0048**
	Nevus	39	2,27	4,9	0,14	0,00406	19,6	
	TSPMI	44	2,87	7,19	0,288	0,0024	37,1	
miR-182	Melanoma	22	0,79879	0,87769	0,37749	0,0207	3,01467	0,0292*
	Nevus	39	0,69358	0,69992	0,47074	0,00559	2,63902	
	TSPMI	44	1,44815	1,77141	0,92919	0,02239	9,84233	
miR-191	Melanoma	22	144,9	160,7	75	38,3	698	0,058
	Nevus	39	113,1	68	84,7	23,4	317,1	
	TSPMI	44	167,4	123,6	125	20,3	680,8	
miR-200c	Melanoma	22	25,5215	30,388	11,2358	0,0926	102,8215	0,0739
	Nevus	39	22,9099	23,2912	17,0063	0,0434	99,5260	
	TSPMI	44	43,5477	54,7318	24,5086	0,3792	289,8171	
miR-205	Melanoma	22	25,3	38,5	9,6	0,00306	149	0,022*
	Nevus	39	21,8	22,6	18,2	0,00559	112	
	TSPMI	44	43,9	48,3	28,3	0,119	190	

<b>miR-21</b>	<b>Melanoma</b>	22	251	313	167	43,7	1.480	0,1907
	<b>Nevus</b>	39	177	112	151	0,00894	464	
	<b>TSPMI</b>	44	253	205	205	26,1	995	
<b>miR-211</b>	<b>Melanoma</b>	22	882,54	1.600,62	344,13	8,8	7.151,35	0,5024
	<b>Nevus</b>	39	658,56	1.019,88	240,52	0,28	3.519,12	
	<b>TSPMI</b>	44	1.072,07	2.055,17	302,07	2,36	10.854,44	
<b>miR-221</b>	<b>Melanoma</b>	22	20,168	39,606	7,932	1,036	192,538	<b>0,0396*</b>
	<b>Nevus</b>	39	12,739	12,698	9,422	0,791	73,364	
	<b>TSPMI</b>	44	24,795	27,113	15,331	1,040	135,298	
<b>miR-9</b>	<b>Melanoma</b>	22	0,807	1,0459	0,2364	0,0364	3,5113	0,1309
	<b>Nevus</b>	39	0,7418	2,0174	0,2469	0,0863	12,7905	
	<b>TSPMI</b>	44	1,2392	2,334	0,4371	0,0693	12,7905	

Tras el análisis de los resultados obtenidos de expresión de los miRNAs analizados en todas las muestras, se pudo observar que solo los niveles del miR-137, miR-182, miR-205 y miR-221 pueden servir como predictores del grupo biológico (nevus, TSPMI y melanoma) (Figura 37). Observando la Tabla 32 podemos ver que los valores de medianas son menores en el grupo de melanoma de aquellos miRNAs significativos, por lo que cuando el diagnóstico es de mayor malignidad, el valor de los miR-137, miR-182, miR-205 y miR-221 es menor. Es decir, valores bajos de los 4 miRNAs apoyan el diagnóstico de melanoma spitzoide.



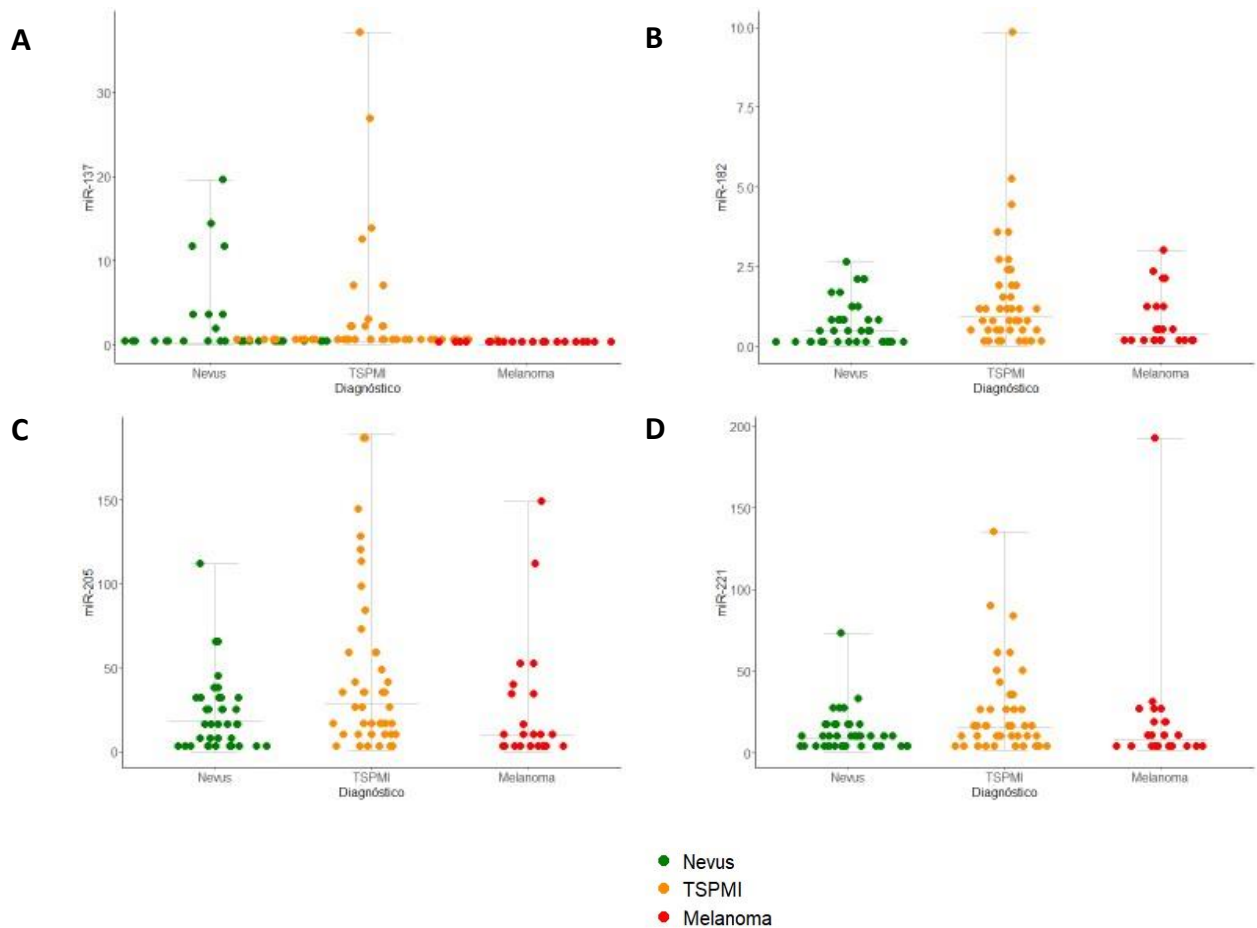


Figura 37. Expresión de los miRNA diferencialmente expresados en función del diagnóstico. (A) miR-137 (B) miR-182 (C) miR-205 (D) miR-221.

Sin embargo, cuando intentamos identificar un punto de corte en los miRNAs que permitiera clasificar las muestras TSPMI como nevus o melanoma vimos que no era posible. Se debe al hecho de que, para la mayoría de los miRNAs, el rango de valores de nevus está contenido o contiene el de melanoma, es decir, no hay valores de corte que permitan sin lugar a dudas identificar un caso como nevus o melanoma. Además, de forma general, el rango de valores de TSPMI es el más amplio y contiene a los valores de nevus y melanoma (Figuras 38-47).

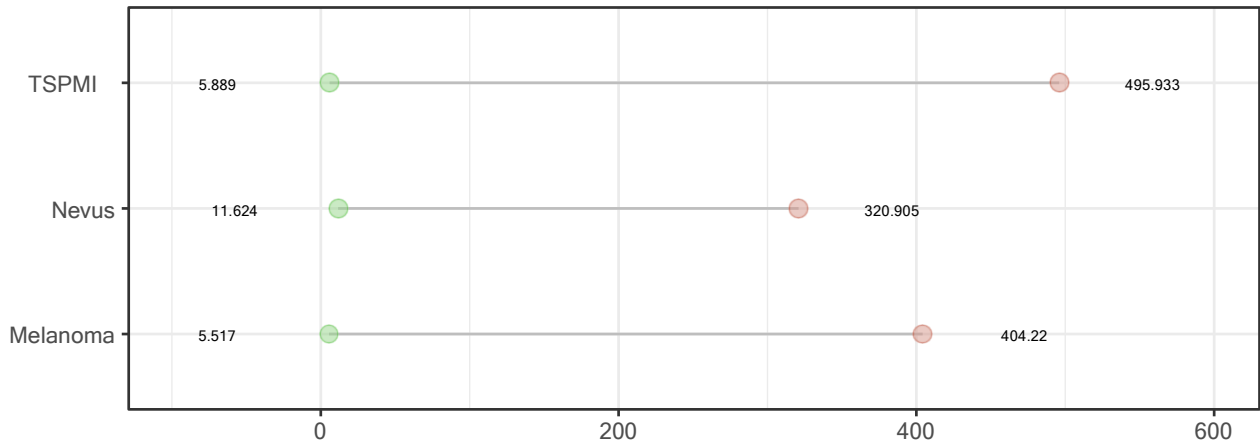


Figura 38. Valores mínimo y máximo de miR-125b según diagnóstico.

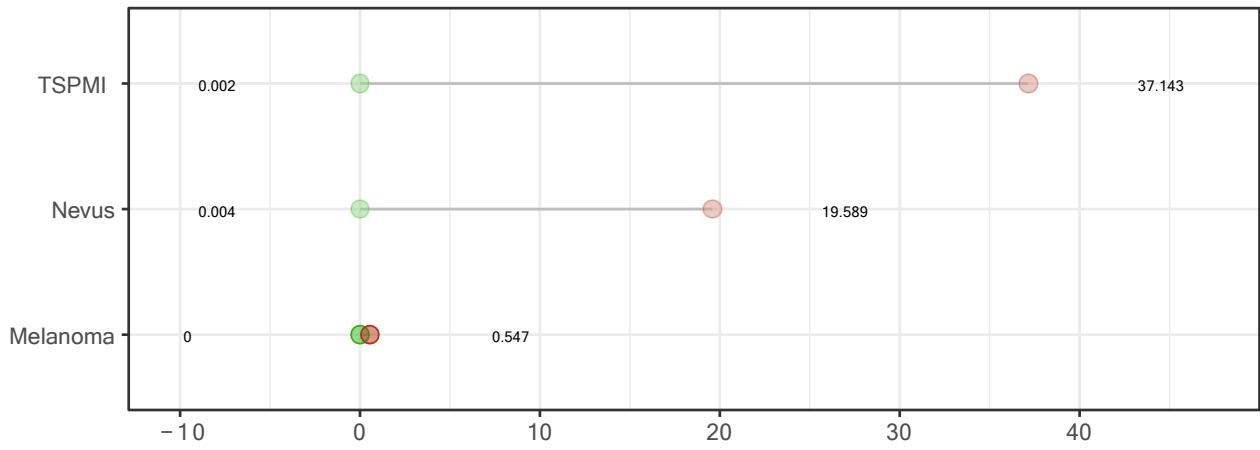


Figura 39. Valores mínimo y máximo de miR-137 según diagnóstico.

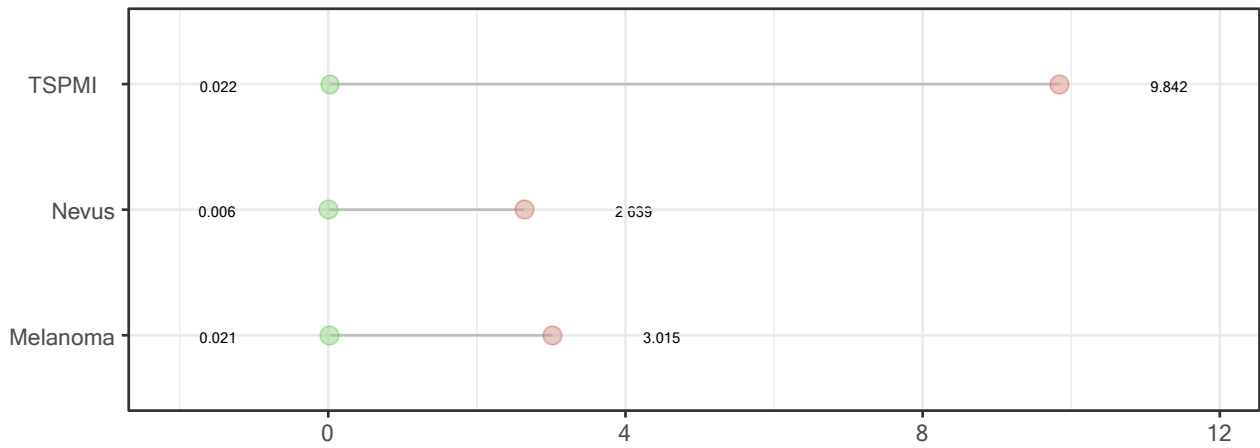


Figura 40. Valores mínimo y máximo de miR-182 según diagnóstico.

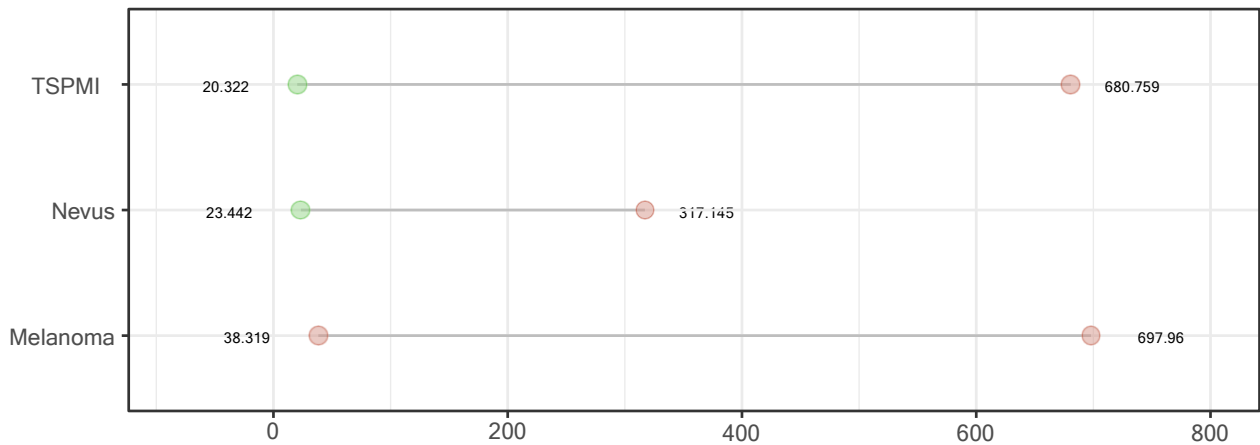


Figura 41. Valores mínimo y máximo de miR-191 según diagnóstico.

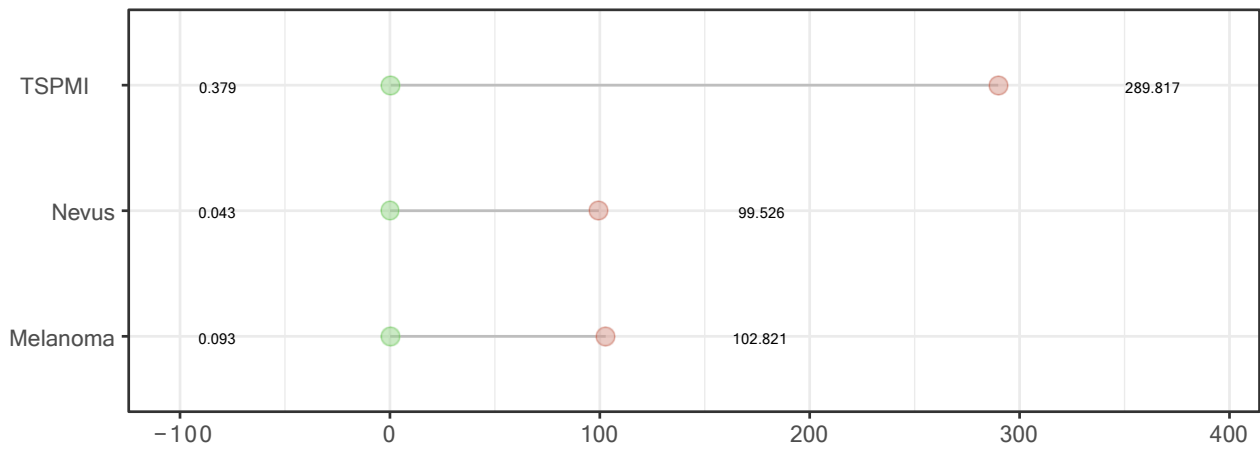


Figura 42. Valores mínimo y máximo de miR-200c según diagnóstico.

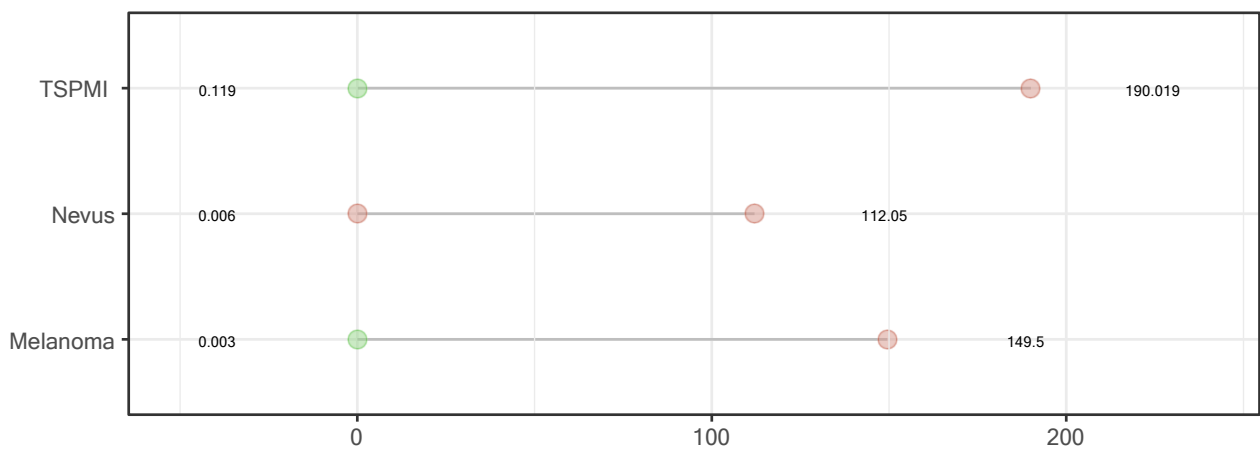


Figura 43. Valores mínimo y máximo de miR-205 según diagnóstico.

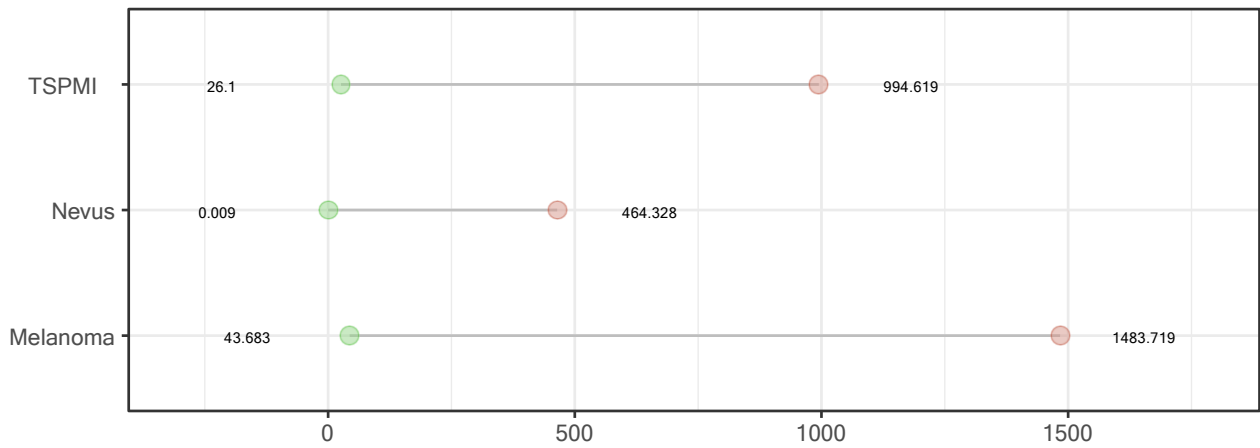


Figura 44. Valores mínimo y máximo de miR-21 según diagnóstico.

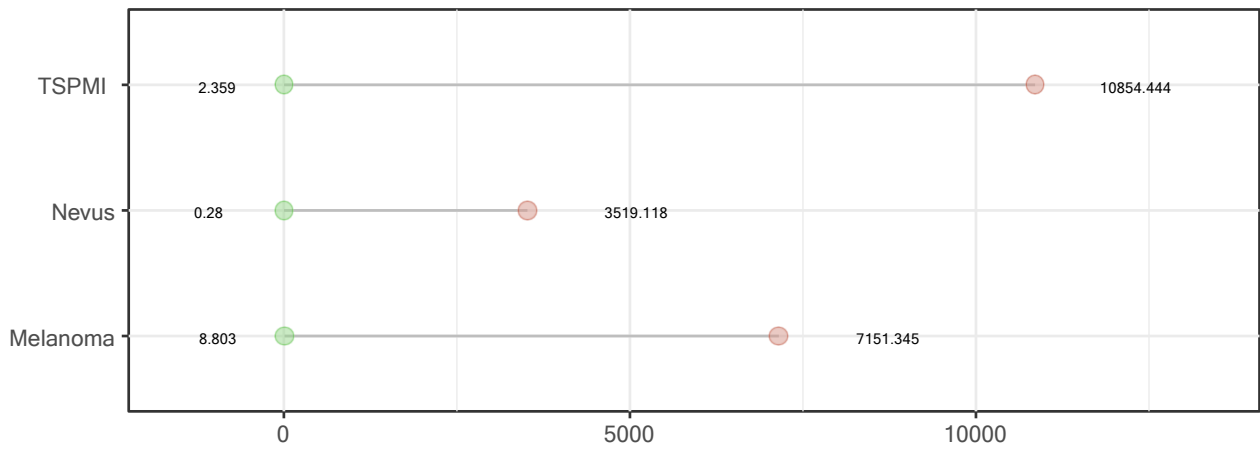


Figura 45. Valores mínimo y máximo de miR-211 según diagnóstico.

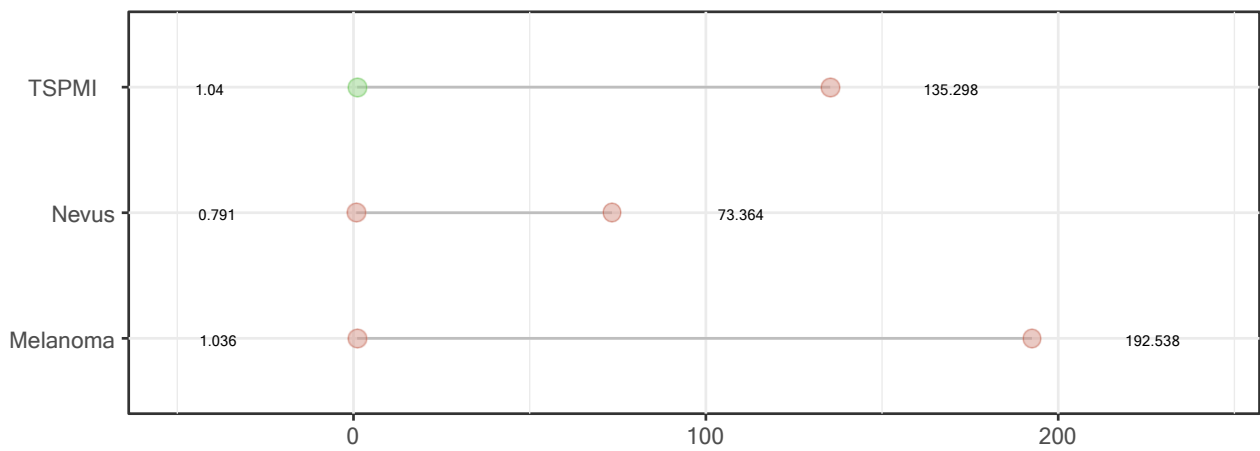


Figura 46. Valores mínimo y máximo de miR-221 según diagnóstico.

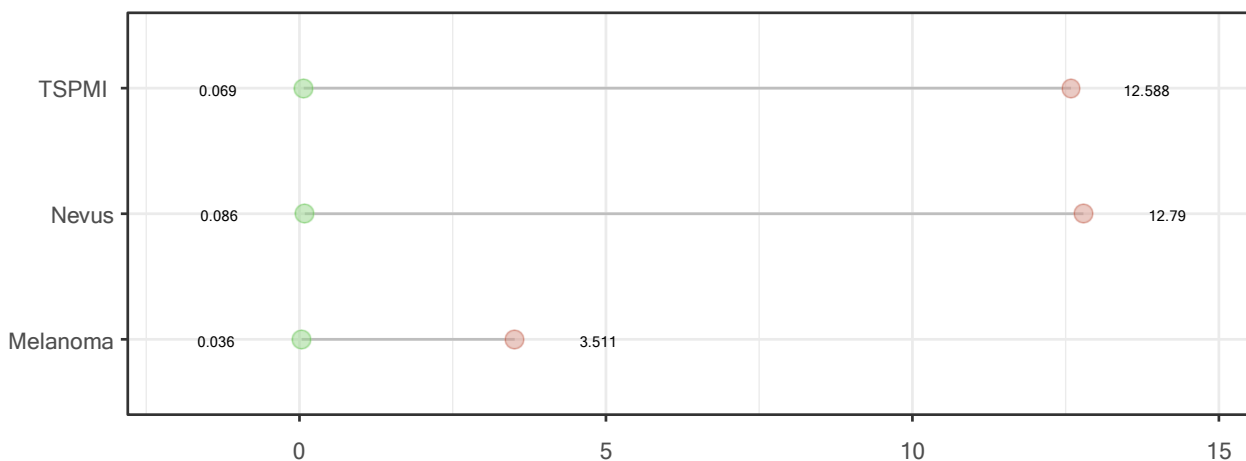


Figura 47. Valores mínimo y máximo de miR-9 según diagnóstico.

### 6.G. Relación entre metilación y miRNAs

Para esta relación, estudiamos únicamente las 40 lesiones spitzoides de las que se hizo el estudio de metilación. Como hemos visto anteriormente en la Tabla 19, todos los cg diferencialmente metilados estaban significativamente relacionados con la variable diagnóstico, observando que, a mayor grado de metilación, mayor riesgo de melanoma.

Al realizar el estudio descriptivo y predictivo de los miRNAs para esta selección de casos, vimos que solo cuatro fueron determinantes significativamente para el diagnóstico (Tabla 30).

Tabla 30. Descripción de los miRNAs en función del diagnóstico y su valor predictivo en las 40 muestras estudiadas por RRBS.

Prueba exacta de Fisher. \* = (p-valor < 0,05); \*\* = (p-valor < 0,01)

Variable	Diagnóstico	n	media	Desviación típica (sd)	Mediana	Mínimo	Máximo	p-valor
miR-125	Melanoma	9	107,96	97,57	55,41	8,82	322,24	0,1654
	Nevus	12	96	90,9	59,45	16,13	320,9	
	TSPMI	19	172,6	139,1	124,5	16,29	495,93	
miR-137	Melanoma	9	0,123	1,73	0,0496	0,000457	0,523	0,1143
	Nevus	12	0,546	1,04	0,128	0,0162	3,42	
	TSPMI	19	1,43	3,37	0,182	0,00415	13,8	
miR-182	Melanoma	9	0,88751	1,0887	0,25774	0,07944	3,01467	0,0021**
	Nevus	12	0,59619	0,60375	0,50368	0,00559	2,00973	
	TSPMI	19	2,22227	2,23993	1,30224	0,42928	9,84233	
miR-191	Melanoma	9	216,7	216,1	136,7	47,8	698	0,0719
	Nevus	12	146,2	95	114,2	23,4	317,1	
	TSPMI	19	248,6	139,5	228,7	69,4	680,8	
miR-200c	Melanoma	9	26,6237	37,8282	9,0945	0,0926	102,8215	0,0142*
	Nevus	12	22,5517	25,1478	14,1578	0,0434	80,1706	

	<b>TSPMI</b>	19	64,5890	68,3635	45,0983	10,3317	289,8171	
<b>miR-205</b>	<b>Melanoma</b>	9	26,4	38,7	9,69	0,00306	112	<b>0,0075**</b>
	<b>Nevus</b>	12	18,5	20,2	11,5	0,0059	64	
	<b>TSPMI</b>	19	67,7	60,4	41,6	7,71	190	
<b>miR-21</b>	<b>Melanoma</b>	9	394,6	438,2	271,7	90	1.483,7	0,2521
	<b>Nevus</b>	12	193,4	108,9	158,2	48,7	422,3	
	<b>TSPMI</b>	19	328,3	253,6	236,6	89,7	994,6	
<b>miR-211</b>	<b>Melanoma</b>	9	519,86	512,99	355,57	14,37	1.528,6	0,2069
	<b>Nevus</b>	12	737,01	1.131,73	264,97	0,28	3.519,12	
	<b>TSPMI</b>	19	1.639,68	2682,2	1.052,06	61,61	10.854,44	
<b>miR-221</b>	<b>Melanoma</b>	9	34,555	60,254	16,610	1,036	192,538	0,0821
	<b>Nevus</b>	12	15,882	20,079	8,803	0,791	73,364	
	<b>TSPMI</b>	19	30,948	30,439	18,164	2,3010	135,298	
<b>miR-9</b>	<b>Melanoma</b>	9	1,1463	1,2321	0,5779	0,0557	3,5113	<b>0,0105*</b>
	<b>Nevus</b>	12	0,3924	0,4328	0,2116	0,0863	1,5659	
	<b>TSPMI</b>	19	2,0793	3,2305	0,6954	0,3331	12,5882	

Contemplando todas las muestras, los miRNAs predictores eran miR-137, miR-182, miR-205 y miR-221. Sin embargo, estudiando las 40 muestras vimos que solo se mantienen como miRNAs predictores el miR-182 y el miR-205; y, además, también lo eran el miR-200c y el miR-9. Con las medianas, pudimos observar que valores bajos de miR-182, miR-205, miR-200c y miR-9 estaban asociados a una mayor probabilidad de melanoma.

Dado que técnicamente el estudio de miRNAs es más sencillo y podría introducirse de rutina en los centros hospitalarios, se intentó averiguar si éstos podrían sustituir el estudio de metilación para diagnosticar de forma fiable.

Mediante el coeficiente de correlación de Spearman podemos estimar la relación entre el grado de metilación y los niveles de expresión de los miRNAs. Tras analizar la correlación (*rho*) y el valor de p (P) para el contraste cuya hipótesis nula es que la correlación es cero, pudimos ver que las correlaciones más altas y significativas se daban entre variables de la misma naturaleza, es decir, sitios de metilación por una parte y miRNAs por otra (Tabla 31). Por lo tanto, no eran variables relacionadas porque no había correlaciones significativas entre una variable de metilación (ninguno de los siete sitios) y otra de miRNA.

Tabla 31. Correlaciones significativas entre los sitios de metilación y los miRNAs.

Variable 1	Variable 2	rho	95% IC	P
miR200c	miR205	0,94	[0,89 - 0,97]	< 0,001***
miR182	miR200c	0,94	[0,89 - 0,97]	< 0,001***
miR182	miR205	0,89	[0,80 - 0,94]	< 0,001***
miR191	miR211	0,78	[0,61 - 0,88]	< 0,001***
G9826086	G31149858	0,78	[0,61 - 0,88]	< 0,001***
miR125b	miR191	0,73	[0,53 - 0,85]	< 0,001***
miR182	miR191	0,73	[0,53 - 0,85]	< 0,001***
miR191	miR205	0,72	[0,52 - 0,84]	< 0,001***
G31149858	G156186376	0,72	[0,51 - 0,84]	< 0,001***
miR191	miR200c	0,69	[0,48 - 0,83]	< 0,001***
miR125b	miR205	0,68	[0,46 - 0,82]	< 0,001***
G9826034	G156186376	0,67	[0,44 - 0,81]	< 0,001***
G9825882	G156186376	0,66	[0,43 - 0,81]	< 0,001***
miR125b	miR200c	0,66	[0,43 - 0,81]	< 0,001***
G9826034	G9826086	0,65	[0,42 - 0,81]	< 0,001***
miR125b	miR182	0,64	[0,40 - 0,80]	< 0,001***
G9826086	G156186376	0,64	[0,40 - 0,80]	0,001**
G9825882	G9826034	0,63	[0,40 - 0,79]	0,001**
miR191	miR21	0,63	[0,39 - 0,79]	0,001**
miR125b	miR21	0,63	[0,38 - 0,79]	0,002**
G9826034	G31149858	0,63	[0,38 - 0,79]	0,002**
miR205	miR211	0,62	[0,37 - 0,78]	0,003**
miR182	miR9	0,62	[0,37 - 0,78]	0,003**
G9825862	G9826034	0,61	[0,36 - 0,78]	0,004**
G31149610	G156186376	0,60	[0,35 - 0,77]	0,005**
G9825882	G9826086	0,59	[0,33 - 0,76]	0,008**
G9825862	G31149858	0,57	[0,31 - 0,75]	0,013*
miR182	miR211	0,57	[0,30 - 0,75]	0,014*
miR191	miR221	0,55	[0,28 - 0,74]	0,023*
G9825882	G31149610	0,55	[0,28 - 0,74]	0,025*
G9825862	G9826086	0,55	[0,28 - 0,74]	0,026*
miR200c	miR211	0,55	[0,28 - 0,74]	0,027*
G9825882	G31149858	0,53	[0,26 - 0,73]	0,043*

Además, mientras que individualmente ninguna variable de miRNA era una buena predictora del diagnóstico en dos niveles (es decir, nevus vs melanoma), los niveles de metilación de los siete cg descritos sí son buenos predictores. Así, el diseño del estudio no permitió responder de forma precisa a la fiabilidad de los miRNAs para diagnosticar las lesiones spitzoides en sustitución del estudio de los cg estudiados.

Dado que disponíamos de la predicción bioinformática de unos TSPMI según su grado de metilación para su posible comportamiento como nevus o como melanoma, podíamos crear una regla, hipotética y teórica, de clasificación de las lesiones ambiguas en función de los niveles de miRNAs de esas muestras concretas.

Se procedió de la siguiente forma:

1. Se seleccionaron los 40 casos que disponíamos clasificados según la predicción bioinformática del modelo 1.
2. Creamos una regla de clasificación de estos 40 casos a partir de los miRNAs. Para ello, se usó la técnica de árbol (Figura 48). El árbol visualiza la regla de clasificación identificada. Se observaron ocho nodos de división a partir de cinco miRNAs: miR-182, miR-137, miR-200c, miR-21 y miR-205. Esto dio lugar a nueve nodos finales, de los que cuatro suponían el 80% de los casos (32 de los 40 casos):
  - Si  $\text{miR-182} < 2,6$  y  $\text{miR-137} \geq 0,1$  y  $\text{miR-21} < 624$  y  $\text{miR-205} < 49$  (13 casos), las lesiones ambiguas se clasifican como nevus.
  - Si  $\text{miR-182} < 2,6$  y  $\text{miR-137} < 0,1$  y  $\text{miR-200c} < 26$  y  $\text{miR-182} \geq 0,067$  (9 casos), los TSPMI se clasifican como melanoma (89% de probabilidad).
  - Si  $\text{miR-182} \geq 2,6$  (6 casos), los tumores atípicos se clasifican como melanoma.
  - Si  $\text{miR-182} < 2,6$  y  $\text{miR-137} < 0,1$  y  $\text{miR-200c} \geq 26$  y  $\text{miR-137} < 0,033$  (4 casos), las muestras TSPMI se clasifican como nevus.
  - Para el resto de nodos terminales, que suponen 8 pacientes restantes, se procede de forma similar.



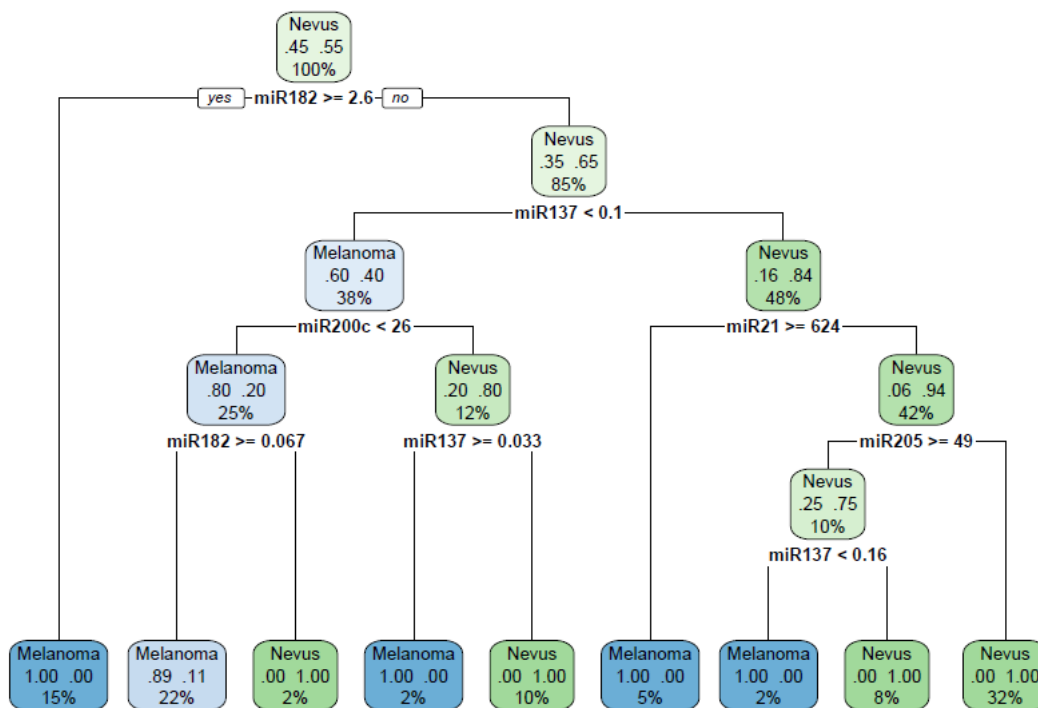


Figura 48. Árbol de clasificación diagnóstica hipotética para las lesiones TSPMI a partir de los miRNAs.

3. Determinamos la calidad de la clasificación intra-muestral: Se observó que, de los 9 nodos finales, solo en uno (el segundo) persistían dos tipos de diagnóstico, siendo el mayoritario de este nodo el de melanoma (8 de los 9 casos). Es decir, si aplicamos la regla de clasificación a la misma muestra usada para su definición, se producía un error de un caso de 40 (2,5%). Si nos quedábamos con tres niveles de clasificación (cinco nodos terminales y cuatro variables de clasificación), el error se daba en 3 de los 40 casos (10%). Esta regla de clasificación se realizó solo con 40 casos y no permite estimar la calidad de la clasificación ante nuevas observaciones. Debe tomarse, por tanto, como un estudio preliminar y poco robusto.
4. Clasificamos el resto de casos TSPMI para los que no se disponía de su clasificación bioinformática: usamos la regla de clasificación generada para clasificar el resto de diagnósticos TSPMI, es decir, aquellos casos ambiguos que no se habían estudiado por RRBS. De los 25 casos predichos, 17 se catalogaron como nevus y 8 como melanoma.

## 6.H. Relación entre metilación y variables clínicas e histológicas

Se hizo un estudio para relacionar cada una de las variables de metilación, es decir, los valores de metilación de cada cg diferencialmente metilado encontrado en el análisis de RRBS, con el resto de variables clínicas e histológicas.

En la siguiente tabla (Tabla 32) se muestran únicamente aquellas variables significativas ( $p$ -valor  $< 0,05$ ) para los sitios de metilación 1 (cg31149610 – Figura 49), 2 (cg9826086 – Figura 50), 3 (cg9825862 – Figura 51), 4 (cg9825882 – Figura 52), 5 (cg9826034 – Figura 53), 6 (cg31149858 – Figura 54) y 7 (cg156186376 – Figura 55).

Tabla 32. Variables clínicas significativas para los sitios de metilación.

CpG ID NO.	Variable	Tipo	n	media	Desviación típica (sd)	Mediana	Mínimo	Máximo	p-valor
1	Mitosis profunda / marginal	Sí	7	52	27	45,8	14,3	98,4	0,014*
		No	32	25	26,6	25,7	0	100	
2	Mitosis/mm2	0-2	29	20,147	15,734	17,798	0,195	63,861	0,0491*
		3-6	8	29,307	10,071	26,21	13,967	50,806	
		≥6	2	46,104	12,482	46,104	37,278	54,93	
	Mitosis atípica	Sí	12	32,83	13,533	29,03	13,967	54,93	0,0081**
		No	27	19,147	15,604	17,651	0,195	63,861	
	Mitosis profunda / marginal	Sí	7	35,754	16,211	37,278	13,967	54,93	0,0370*
		No	32	20,645	15,04	20,713	0,195	63,861	
	Inflamación peritumoral	Sí	7	10,393	8,064	9,042	0,298	23,969	0,0294*
		No	25	25,777	17,137	24,082	0,195	63,861	
	Inflamación intratumoral	Sí	9	10,886	9,09	9,042	0,298	24,082	0,0196*
		No	24	27,53	16,769	26,188	0,195	63,861	
	Esclerosis / esmoplasia	Sí	7	13,521	7,392	13,967	0,195	23,969	0,0370*
No		32	25,509	16,798	25,665	0,298	63,861		
3	Mitosis atípica	Sí	12	18,467	11,599	18,418	0,291	41,998	0,0049**
		No	27	7,344	9,33	1,854	0	32,002	
4	Localización de la lesión	Cabeza/ Cuello	3	40,049	15,653	32,286	29,795	58,066	0,025*
		Tronco	5	5,166	7,592	0,238	0,062	17,2	
		Extremidades superiores y hombros	10	28,647	21,813	28,749	0,138	64,048	
		Extremidades inferiores y cadera	6	7,845	10,388	2,875	0	24,096	
		No especificado	16	23,848	24,43	17,14	0	96	
	Propagación pagetoide	Sí	13	35,74	23,4	28,62	13,35	96	0,0014**
		No	26	14,04	17,7	7,41	0	58,07	
5	Mitosis/mm2	0-2	29	14,56	11,3	14,57	0	43,54	0,0045**

		3-6	8	26,59	8,38	25,56	15,75	44,02	
		≥6	2	32,13	13,9	32,13	22,31	41,96	
	Mitosis atípica	Sí	12	27,74	8,84	24,15	15,75	44,02	0,0003***
		No	27	13,56	10,85	14,53	0	43,54	
	Mitosis profunda / marginal	Sí	7	30,47	9,04	26,45	22,31	44,02	0,0013**
		No	32	15,18	11,01	15,62	0	43,54	
	Inflamación peritumoral	Sí	7	7,477	6,088	7,313	0,032	15,748	0,0252*
		No	25	20,112	11,671	20,862	0	44,024	
	Inflamación intratumoral	Sí	9	8,453	6,962	7,313	0,032	20,098	0,0109*
		No	24	21,508	10,606	22,195	0	44,024	
6	Género	Mujer	17	8,84	8,54	5,77	0	31,25	0,0154*
		Hombre	11	16,36	7,98	13,42	6,83	30,63	
	Mitosis atípica	Sí	12	17,27	9,14	17,33	1,84	31,25	0,0115*
		No	27	9,69	7,68	7,5	0	28,75	
	Mitosis profunda / marginal	Sí	7	17,79	6,99	15,97	8,37	30,63	0,0308*
		No	32	10,76	8,72	7,68	0	31,25	
Inflamación intratumoral	Sí	9	4,62	4,35	4,29	0	13,25	0,0070**	
	No	24	14,14	9,02	14,09	0	31,25		
Esclerosis / desmoplasia	Sí	7	5,59	4,92	5,77	0	14,08	0,0232*	
	No	32	13,43	8,86	13,72	0	31,25		
7	Localización de la lesión	Cabeza / Cuello	3	32,823	7,071	36,743	26,99	40,735	0,0339*
		Tronco	5	8,417	6,835	7,692	2,704	19,973	
		Extremidades superiores y hombros	10	18,945	13,114	13,131	6,126	39,041	
		Extremidades inferiores y cadera	6	15,891	9,342	17,444	4,122	27,438	
		No especificado	16	19,455	8,951	21,311	0,103	30,664	
	Mitosis profunda / marginal	Sí	7	29,34	9,178	30,664	18,935	40,735	0,0076**
		No	32	16,096	10,336	15,452	0,103	37,793	
	Atipia / Pleomorfismo	Sí	23	22,523	11,318	21,352	0,103	40,735	0,0094**
		No	16	12,651	8,512	10,018	2,704	27,438	
	Inflamación peritumoral	Sí	7	8,046	6	7,264	0,103	19,973	0,0217*
		No	25	20,397	11,248	20,274	2,704	40,735	
	Inflamación intratumoral	Sí	9	10,903	11,422	7,264	0,103	37,793	0,0415*
No		24	20,095	10,264	19,863	2,704	40,735		

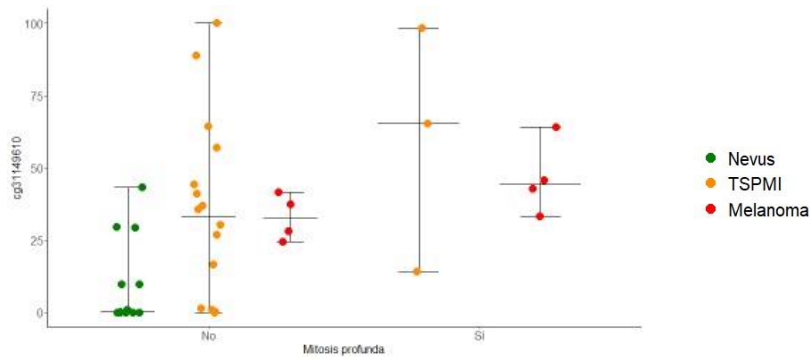


Figura 49. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg31149610 respecto a la presencia de mitosis profunda en función del diagnóstico.

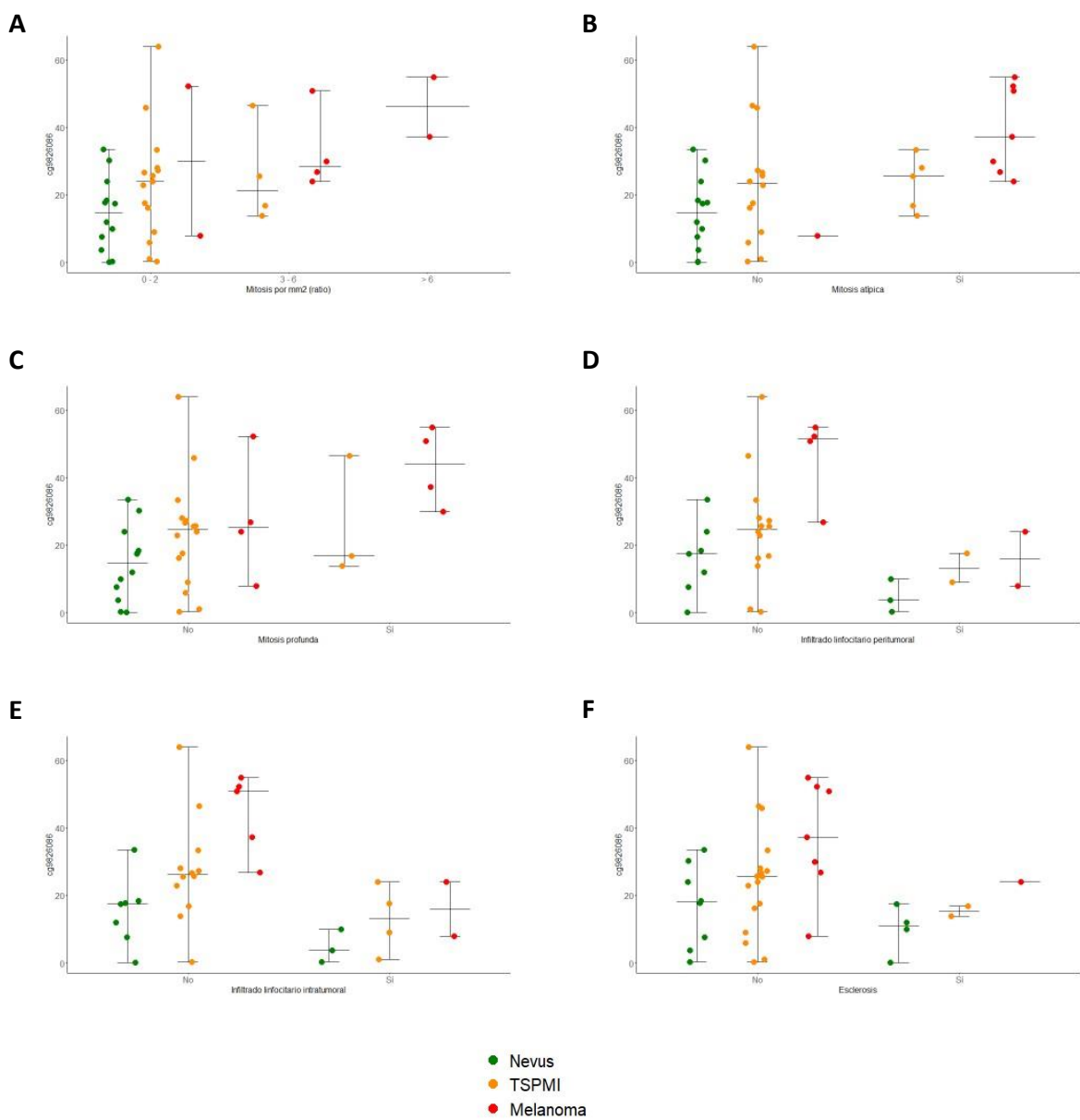


Figura 50. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg9826086 respecto a la presencia de (A) mitosis por mm2, (B) mitosis atípica, (C) mitosis profunda, (D) infiltrado linfocitario peritumoral, (E) infiltrado linfocitario intratumoral y (F) esclerosis en función del diagnóstico.

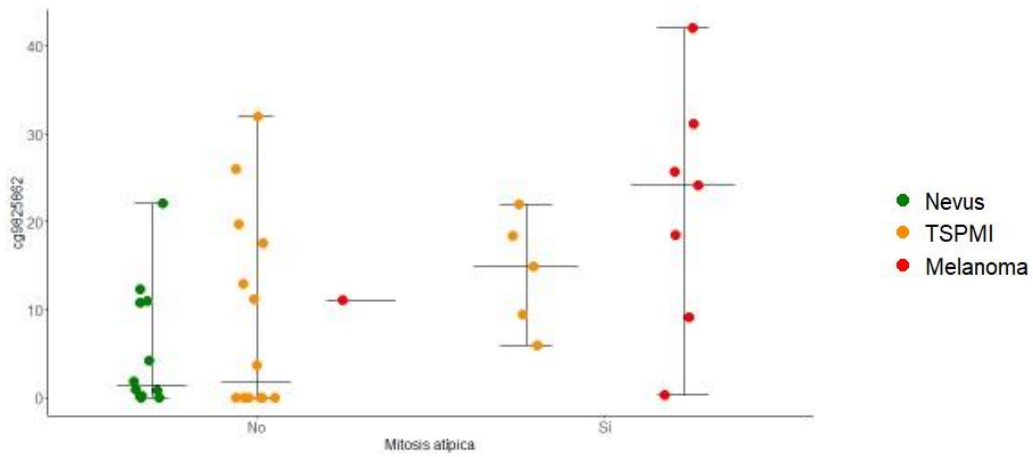


Figura 51. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg9825882 respecto a la presencia de mitosis atípica en función del diagnóstico.

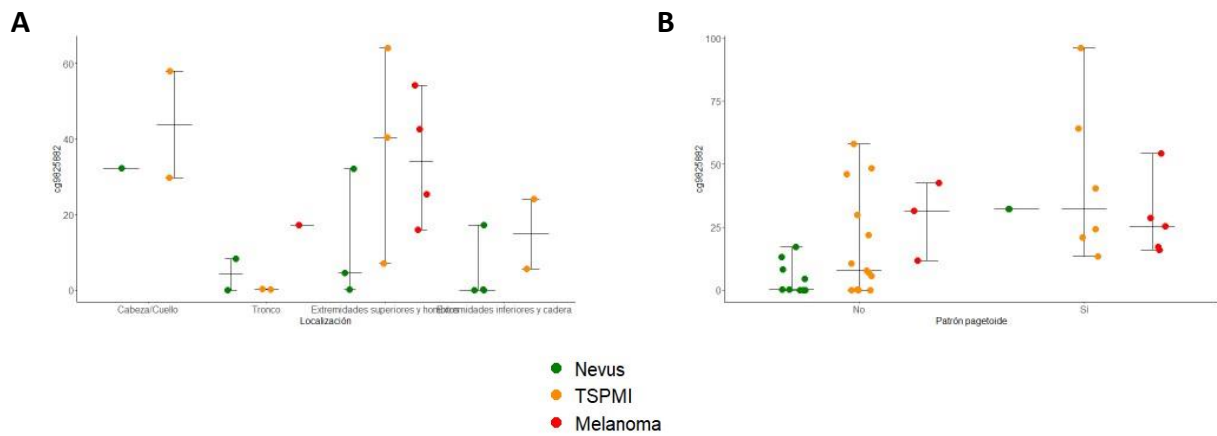


Figura 52. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg9825882 respecto a la (A) localización del tumor y (B) la presencia de patrón pagetoide en función del diagnóstico.

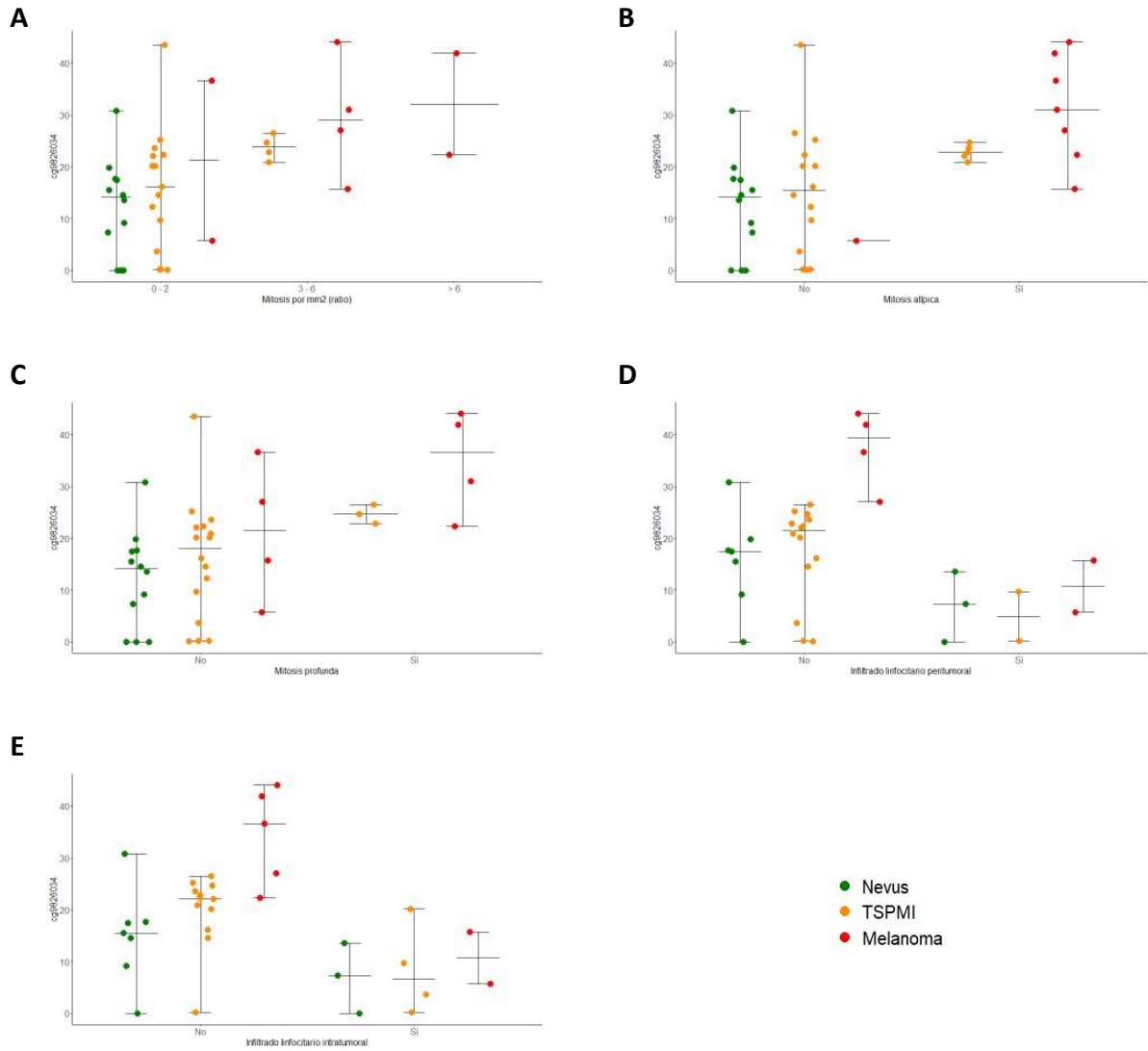


Figura 53. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg9826034 respecto a la presencia de (A) mitosis por mm2, (B) mitosis atípica, (C) mitosis profunda, (D) infiltrado linfocitario peritumoral e (E) infiltrado linfocitario intratumoral en función del diagnóstico.

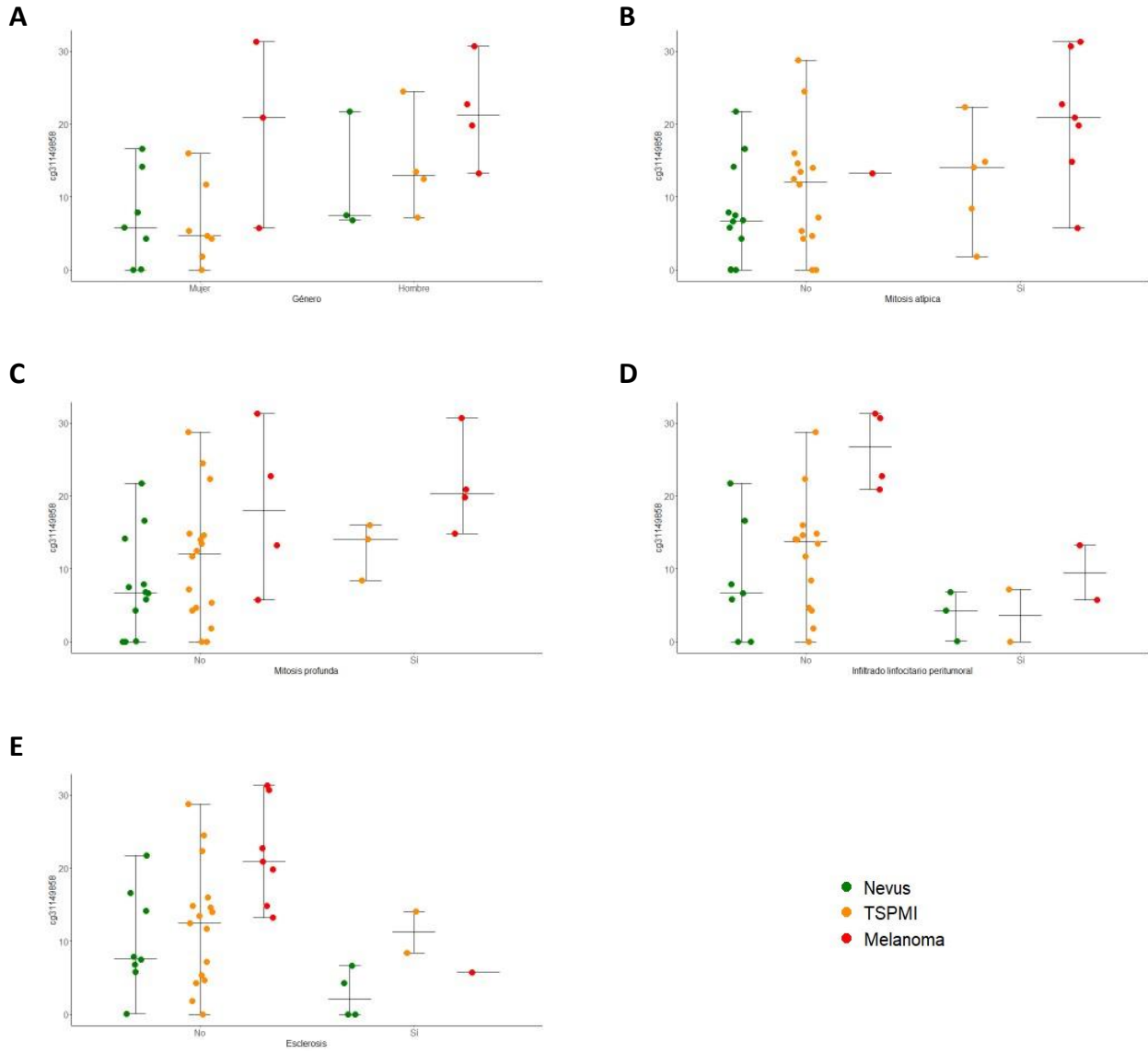


Figura 54. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg31149858 respecto al (A) género, (B) mitosis atípica, (C) mitosis profunda, (D) infiltrado linfocitario peritumoral y (E) esclerosis en función del diagnóstico.

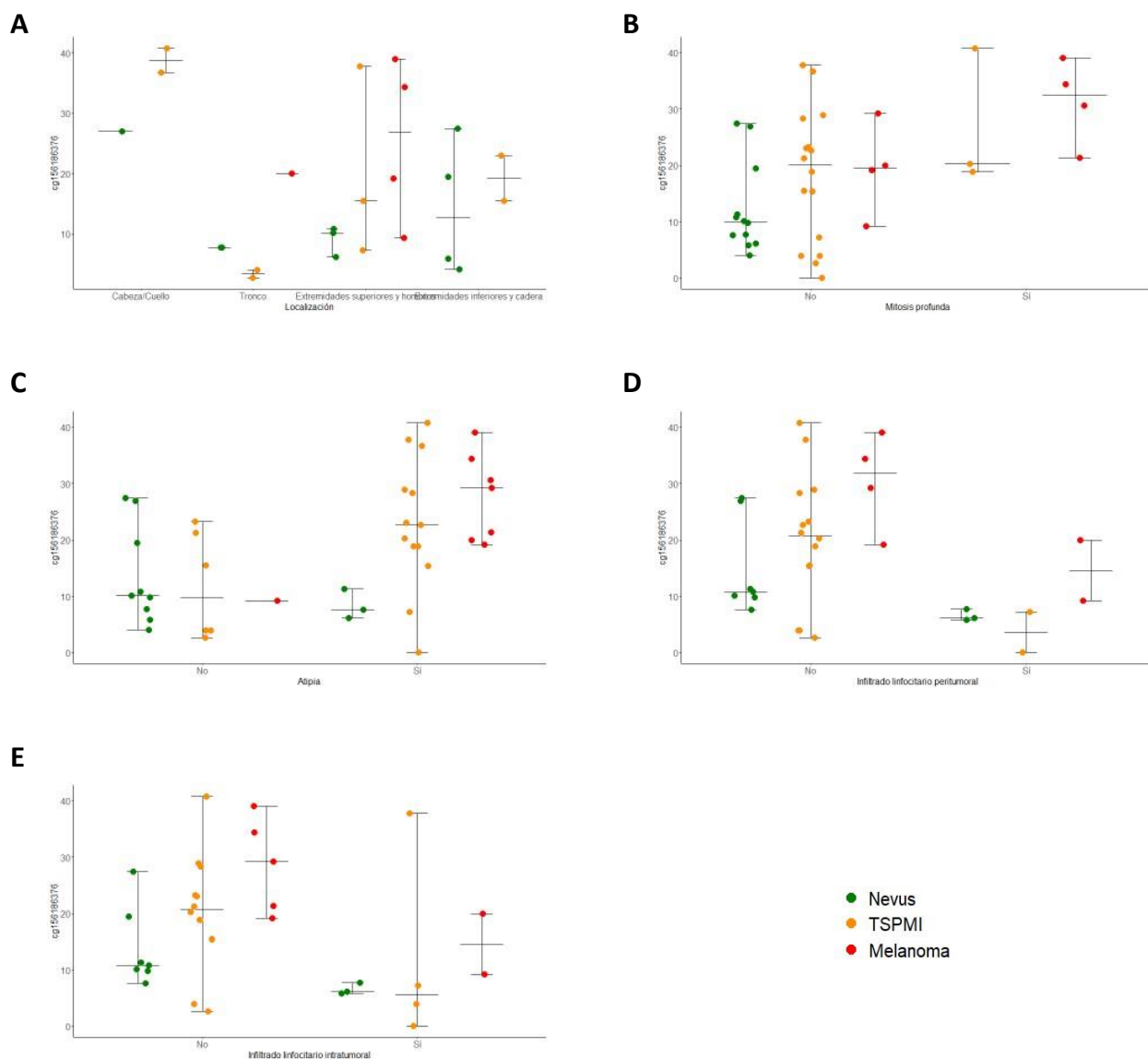


Figura 55. Distribución de las muestras según el porcentaje de metilación de cg156186376 respecto a la (A) localización, (B) mitosis profunda, (C) atipia, (D) infiltrado linfocitario peritumoral e (E) infiltrado linfocitario intratumoral en función del diagnóstico.

Se pudo observar que la metilación de seis sitios (todos excepto el CpG ID 4) estaba relacionada con uno o varios parámetros relacionados con la mitosis. A mayor porcentaje de metilación se ve un mayor número de mitosis, más mitosis atípicas o mayor presencia de mitosis profundas.

Los CpG ID 2, 5, 6 y 7 influyen en la Infiltrado linfocitario peritumoral, la Infiltrado linfocitario intratumoral o ambas. Se observó un menor porcentaje de metilación de estos sitios en aquellas muestras que muestran Infiltrado linfocitario.

Las muestras que presentan esclerosis tienen un grado de metilación bajo de los CpG ID 2 y 6.



Un elevado porcentaje de metilación del CpG ID 4 se vio relacionado con un patrón pagetoide. Las lesiones spitzoides con este cg hipermetilado suelen localizarse en la cabeza y cuello o en las extremidades superiores y hombros.

Los hombres presentaban un porcentaje de metilación alto del CpG ID 6 en comparación con las mujeres.

Una sobremetilación del CpG ID 7 se relacionaba con lesiones situadas en la cabeza y cuello, y con tumores con atipia o pleomorfismo celular.

Solo la relación entre el número de mitosis y el porcentaje de metilación del sitio cg9826034 (CpG ID 5) fue significativa ( $\rho = 0,54$ ; p-valor = 0,013) en el estudio realizado entre los sitios de metilación y las variables continuas.

#### 6.1. Relación entre miRNAs y variables clínicas e histológicas

Al igual que con los sitios diferencialmente metilados, se estudió la relación de cada uno de los miRNAs con el resto de variables clínicas e histológicas.

En la siguiente tabla se muestran únicamente aquellas variables significativas (p-valor < 0,05) para los diferentes miRNAs (Tabla 33):

Tabla 33. Descripción de los sitios de metilación en función de las variables clínicas e histológicas y su valor predictivo.

miRNA	Variable	Tipo	n	media	Desviación típica (sd)	Mediana	Mínimo	Máximo	p-valor
miR-125b	Localización de la lesión	Cabeza / Cuello	12	126,71	127,51	97,59	13,46	495,93	0,0296*
		Tronco	13	172,59	125,83	155,09	26,58	481,7	
		Extremidades superiores y hombros	25	121,44	104,81	85,81	5,52	404,22	
		Extremidades inferiores y cadera	21	65,38	62,65	37,74	5,89	267,61	
		No especificado	34	91,09	82,8	60,53	8,82	316,49	
	Atipia / Pleomorfismo	Sí	62	93,99	95,91	64,94	5,52	495,93	0,0420*
		No	42	128,72	104,96	115,53	11,62	481,7	
	Infiltrado linfocitario intratumoral	Sí	27	124,85	105,23	94,29	13,21	404,22	0,0311*
		No	65	111,3	102,92	78,52	5,52	495,93	
	Consunción de la epidermis	Sí	39	81,14	90,43	34,23	5,52	404,22	0,0036**
No		65	124,14	103,62	89,14	11,62	495,93		
miR-137	Localización de la lesión	Cabeza / Cuello	12	1,84	3,97	0,336	0,0024	14,1	0,0063**
		Tronco	13	2,75	4,36	0,417	0,0328	11,9	
		Extremidades superiores y hombros	25	1,11	2,85	0,108	0,00406	12,5	

		<b>Extremidades inferiores y cadera</b>	21	0,185	0,403	0,0565	0,0039	1,85		
		<b>No especificado</b>	34	3,77	8,61	0,119	0,000457	37,1		
	<b>Simetría</b>	<b>Sí</b>	96	2,25856	5,81169	0,17061	0,00339	37,14253		<b>0,0328*</b>
		<b>No</b>	8	0,07698	0,08718	0,05425	0,0024	0,27739		
	<b>Esclerosis / desmoplasia</b>	<b>Sí</b>	16	4,4379	6,6669	0,4709	0,0328	19,5894	<b>0,0201*</b>	
		<b>No</b>	88	1,664	5,3316	0,1325	0,0024	37,1425		
<b>miR-182</b>	<b>Dermis profunda</b>	<b>Sí</b>	27	0,4878	0,65924	0,21198	0,00559	2,33918	<b>0,0005**</b>	
		<b>No</b>	75	1,23268	1,45994	0,75573	0,03815	9,84233		
	<b>Patrón pagetoide</b>	<b>Sí</b>	38	1,2311	1,04963	0,81461	0,03815	4,42906	<b>0,0145*</b>	
		<b>No</b>	66	0,92995	1,46407	0,471	0,00559	9,84233		
	<b>Formación de masa expansiva</b>	<b>Sí</b>	20	0,55895	0,69139	0,28521	0,00559	2,33918	<b>0,0111*</b>	
		<b>No</b>	84	1,15451	1,46407	0,471	0,00559	9,84233		
	<b>Mitosis profunda / marginal</b>	<b>Sí</b>	13	1,05616	2,66028	0,24965	0,03312	9,84233	<b>0,0253*</b>	
		<b>No</b>	91	1,03767	1,04003	0,68825	0,00559	5,24158		
	<b>Esclerosis / desmoplasia</b>	<b>Sí</b>	16	0,58181	0,73188	0,14803	0,00559	2,33918	<b>0,0216*</b>	
		<b>No</b>	88	1,12329	1,39899	0,66801	0,0207	9,84233		
<b>miR-191</b>	<b>Localización de la lesión</b>	<b>Cabeza / Cuello</b>	12	173,1	170,1	118,2	60	680,8	<b>0,0194*</b>	
		<b>Tronco</b>	13	228,9	163	202,1	45,2	698		
		<b>Extremidades superiores y hombros</b>	25	152,2	111,8	93,6	38,3	416,2		
		<b>Extremidades inferiores y cadera</b>	21	114,2	82,6	85,6	20,3	336,9		
		<b>No especificado</b>	34	109	77,2	82,5	23,4	353,9		
	<b>Maduración</b>	<b>Sí</b>	59	156,2	116,8	122,4	23,4	680,8	<b>0,0344*</b>	
<b>No</b>		45	126,7	118,1	83,2	20,3	698			
<b>miR-200c</b>	<b>Dermis profunda</b>	<b>Sí</b>	27	14,8609	20,6989	6,9596	0,0434	73,2624	<b>0,0006***</b>	
		<b>No</b>	76	38,3513	45,4817	26,4865	0,2112	289,8171		
	<b>Patrón pagetoide</b>	<b>Sí</b>	38	39,5222	37,1451	31,4514	0,3595	161,5681	<b>0,0195*</b>	
		<b>No</b>	66	28,3201	43,6271	16,1084	0,0434	289,8171		
	<b>Formación de masa expansiva</b>	<b>Sí</b>	20	15,1722	20,3575	8,7469	0,0434	73,2624	<b>0,0039**</b>	
		<b>No</b>	84	36,5182	44,2553	24,5086	0,2112	289,8171		
	<b>Mitosis/mm<sup>2</sup></b>	<b>0-2</b>	84	32,2812	34,5779	21,4781	0,0434	164,3926	<b>0,0422*</b>	
		<b>3-6</b>	17	38,5764	68,456	11,5996	0,1626	289,8171		
		<b>&gt;6</b>	3	1,1842	1,2372	0,648	0,3057	2,5991		
	<b>Mitosis profunda / marginal</b>	<b>Sí</b>	13	33,6941	78,5693	9,5467	0,1626	289,8171	<b>0,0476*</b>	
<b>No</b>		91	32,2302	33,9429	22,1924	0,0434	164,3926			
<b>Esclerosis / desmoplasia</b>	<b>Sí</b>	16	17,1551	22,9266	2,7351	0,0434	73,2624	<b>0,0170*</b>		
	<b>No</b>	88	35,1873	43,6162	21,4279	0,1626	289,8171			
<b>miR-205</b>	<b>Dermis profunda</b>	<b>Sí</b>	27	15,9	25,2	7,41	0,00306	112	<b>0,0006***</b>	
		<b>No</b>	76	36,6	41,1	25,1	0,0289	190		
	<b>Patrón pagetoide</b>	<b>Sí</b>	38	43,2	46,5	30,9	0,0851	190	<b>0,0169*</b>	
		<b>No</b>	66	25,7	33,7	15,4	0,00306	184		
	<b>Sí</b>	20	26,6	42,5	8,4	0,00306	128	<b>0,0313*</b>		

	Formación de masa expansiva	No	84	33,4	33,9	23,2	0,0289	190	
	Mitosis/mm <sup>2</sup>	0-2	84	33,1	38,3	20,9	0,00559	190	0,0191*
		3-6	17	32,6	47,8	16,2	0,00306	184	
		>6	3	0,0999	0,0766	0,0851	0,0318	0,183	
	Mitosis profunda / marginal	Sí	13	23,8	50	7,41	0,00306	184	0,028**
		No	91	33,3	38	19,5	0,00559	190	
	Consunción de la epidermis	Sí	39	26,9	40,3	9,69	0,00306	190	0,0383*
		No	65	35,2	39,1	24,7	0,0059	184	
	Esclerosis / desmoplasia	Sí	16	18,3	29,3	3,77	0,00559	112	0,0196*
		No	88	34,6	40,8	19,4	0,00306	190	
miR-21	Localización de la lesión	Cabeza/ Cuello	12	286	266	218	29,7	995	0,0468*
		Tronco	13	361	355	236	85	1480	
		Extremidades superiores y hombros	25	196	141	176	0,00894	603	
		Extremidades inferiores y cadera	21	171	162	138	26,1	757	
		No especificado	34	203	156	176	24,6	826	
	Densidad celular	Baja	13	103,9	61,2	90	24,6	233,5	0,0179*
		Medio/baja	11	252,5	122	320,5	48,6	422,3	
		Medio/alta	26	217,2	168,5	169,9	44,9	826	
		Alta	24	236	296,7	164,7	26,1	1483,7	
	miR-211	Localización de la lesión	Cabeza/ Cuello	12	495,67	586,02	185,9	6,76	1866,35
Tronco			13	1140,66	1195,03	599,66	20,66	3519,12	
Extremidades superiores y hombros			25	1096,54	1850,09	522,03	2,36	7151,35	
Extremidades inferiores y cadera			21	1018,2	1560,11	309,12	23,17	6360,83	
No especificado			34	667,6	1914,68	62,69	0,28	10854,44	
Dermis profunda		Sí	27	703,22	1791,81	75,43	0,28	7151,35	0,0024**
		No	76	876,22	1459,71	391,23	4,3	10854,44	
Mitosis profunda / marginal		Sí	13	275,97	384,44	81,29	2,36	1286,29	0,0499*
		No	91	974,38	1733,35	307,19	0,28	10854,44	
Infiltrado linfocitario intratumoral		Sí	27	1749,58	2077,6	1060,11	20,66	7151,35	0,0007***
		No	65	655,16	1455,35	252,48	0,28	10854,44	
Pigmentación		Sí	31	1721,5	2407,88	878,56	0,28	10854,44	0,0001***
		No	73	532,74	1007,21	156,5	2,36	6677,07	
Esclerosis / desmoplasia		Sí	16	325,42	867,07	50,27	0,28	3519,12	0,001***
		No	88	989,2	1730,34	356,31	7,82	10854,44	
miR-221	Localización de la lesión	Cabeza/ Cuello	12	31,324	40,103	11,929	3,057	135,298	0,0252*
		Tronco	13	36,741	52,784	14,723	5,367	192,538	
		Extremidades superiores y hombros	25	20,418	16,835	16,668	2,736	73,364	
		Extremidades inferiores y cadera	21	9,111	7,392	7,116	1,04	34,969	

		<b>No especificado</b>	34	14,006	13,292	11,835	0,791	60,213	
	<b>Elastosis solar</b>	<b>Sí</b>	2	58,268	21,349	58,268	43,171	73,364	<b>0,0332*</b>
		<b>No</b>	102	18,764	26,297	11,893	0,791	192,538	
	<b>Tipo de célula</b>	<b>Epiteloide</b>	80	20,23	26,831	12,938	0,791	192,538	<b>0,0173*</b>
		<b>Fusiforme</b>	12	7,924	6,754	6,177	2,301	24,051	
		<b>Mixta</b>	12	26,416	35,376	15,513	5,922	135,298	
	<b>Necrosis</b>	<b>Sí</b>	2	3,456	0,773	3,456	2,91	4,003	<b>0,0386*</b>
		<b>No</b>	101	18,696	24,367	12,134	0,791	192,538	
<b>miR-9</b>	<b>Infiltrado linfocitario intratumoral</b>	<b>Sí</b>	27	1,416	2,4926	0,5278	0,1243	12,7905	<b>0,0259*</b>
		<b>No</b>	65	0,9145	1,9525	0,3331	0,0364	12,5882	
	<b>Pigmentación</b>	<b>Sí</b>	31	1,0053	1,132	0,5471	0,0911	4,1901	<b>0,0351*</b>
		<b>No</b>	73	0,9516	2,2943	0,2736	0,0364	12,7905	
	<b>Esclerosis / desmoplasia</b>	<b>Sí</b>	16	0,4309	0,595	0,1573	0,0458	2,307	<b>0,0431*</b>
		<b>No</b>	88	1,0652	2,1623	0,3772	0,0364	12,7905	

Los miR-125b, miR-137, miR-191, miR-21, miR-211 y miR-221 están significativamente expresados en mayor nivel en las lesiones situadas en el tronco. Los niveles de expresión de éstos son prácticamente similares para las extremidades superiores, hombros, cabeza y cuello, pero una baja expresión se asocia a lesiones situadas en las extremidades inferiores y cadera.

Podemos ver que el miR-125b (Figura 56) está relacionado también con la atipia celular, el infiltrado linfocitario intratumoral y la consunción de la epidermis. Elevados valores de miR-125b se asocian a células sin atipia o pleomorfismo, pero con infiltrado linfocitario intratumoral y consunción de la epidermis, en comparación con una expresión menor de éste.

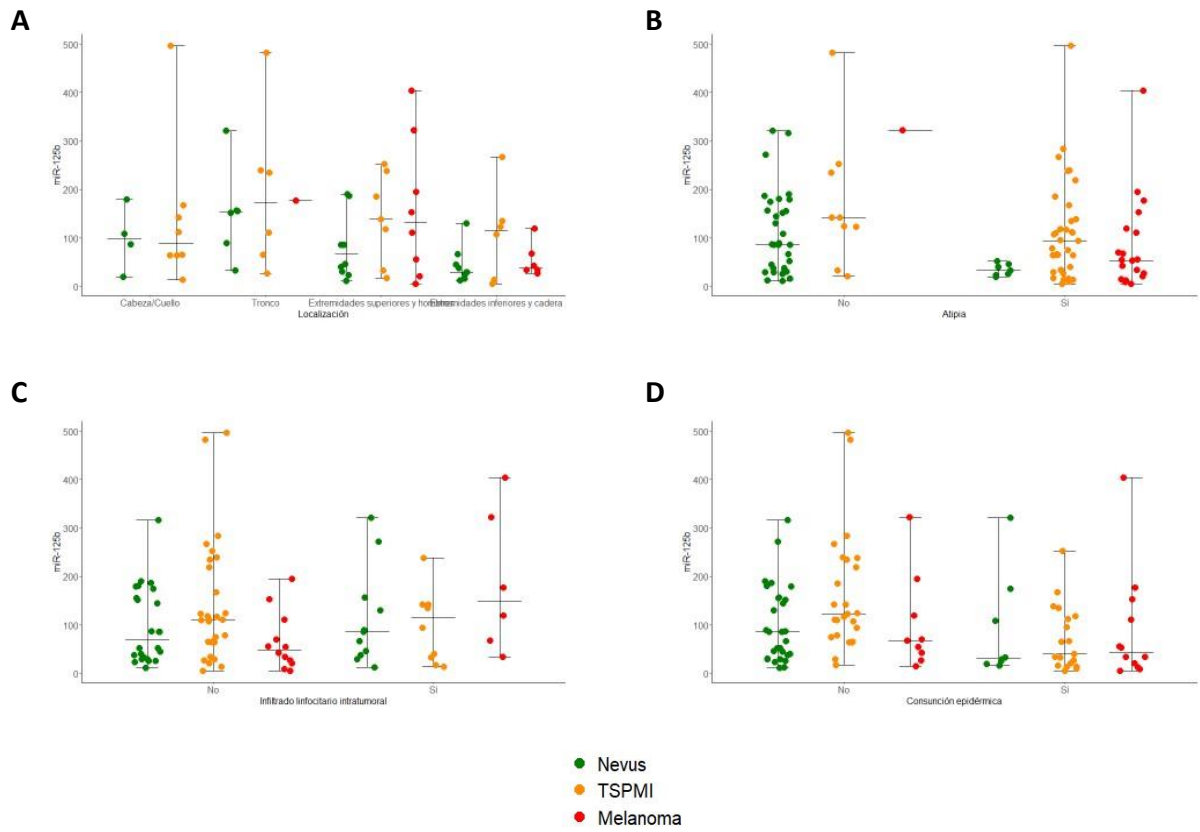


Figura 56. Distribución de las muestras según la expresión de miR-125b respecto a la (A) localización, (B) atipia, (C) infiltrado linfocitario intratumoral y (D) consunción de la epidermis en función del diagnóstico.

Una baja expresión de miR-137 se asocia a lesiones asimétricas y con esclerosis (Figura 57).

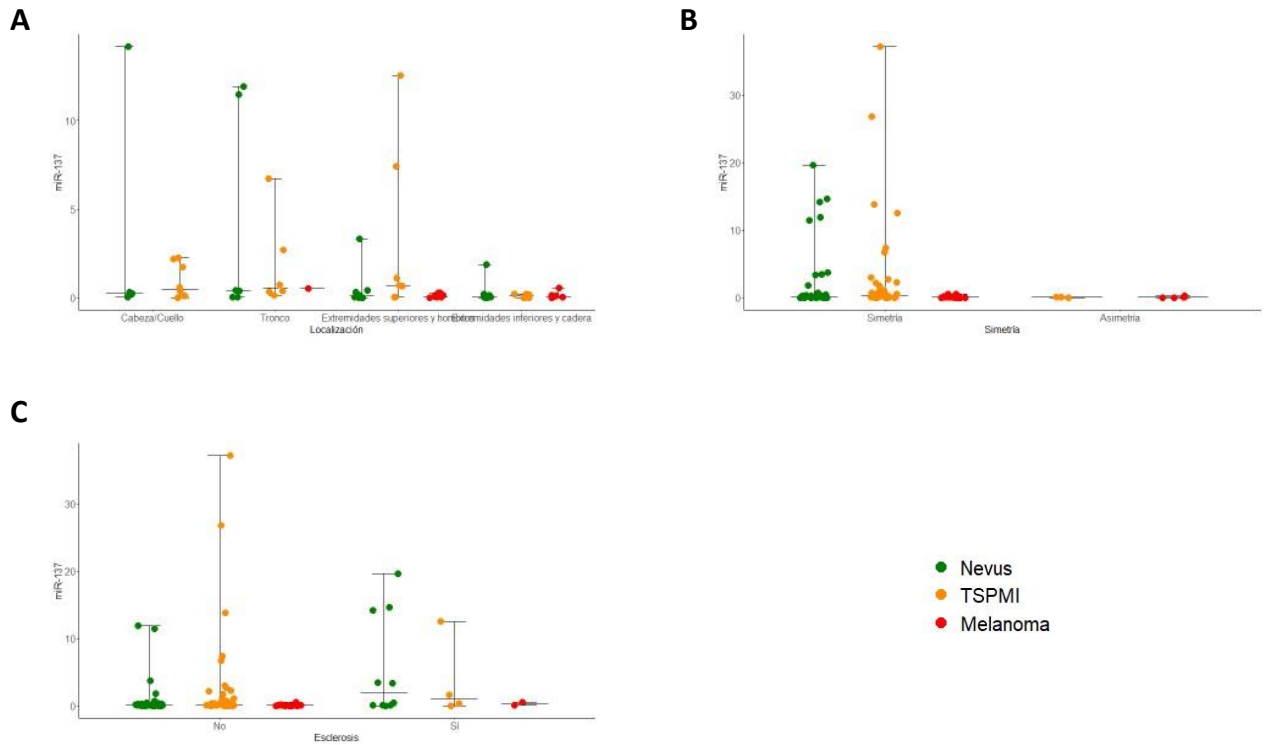


Figura 57. Distribución de las muestras según la expresión de miR-137 respecto a la (A) localización, (B) simetría y (C) esclerosis en función del diagnóstico.

Los niveles de miR-182 (Figura 58) son más elevados en las lesiones que no presentan dermis profunda, no forman masas expansivas ni tienen mitosis profundas ni esclerosis, pero sí patrón pagetoide.

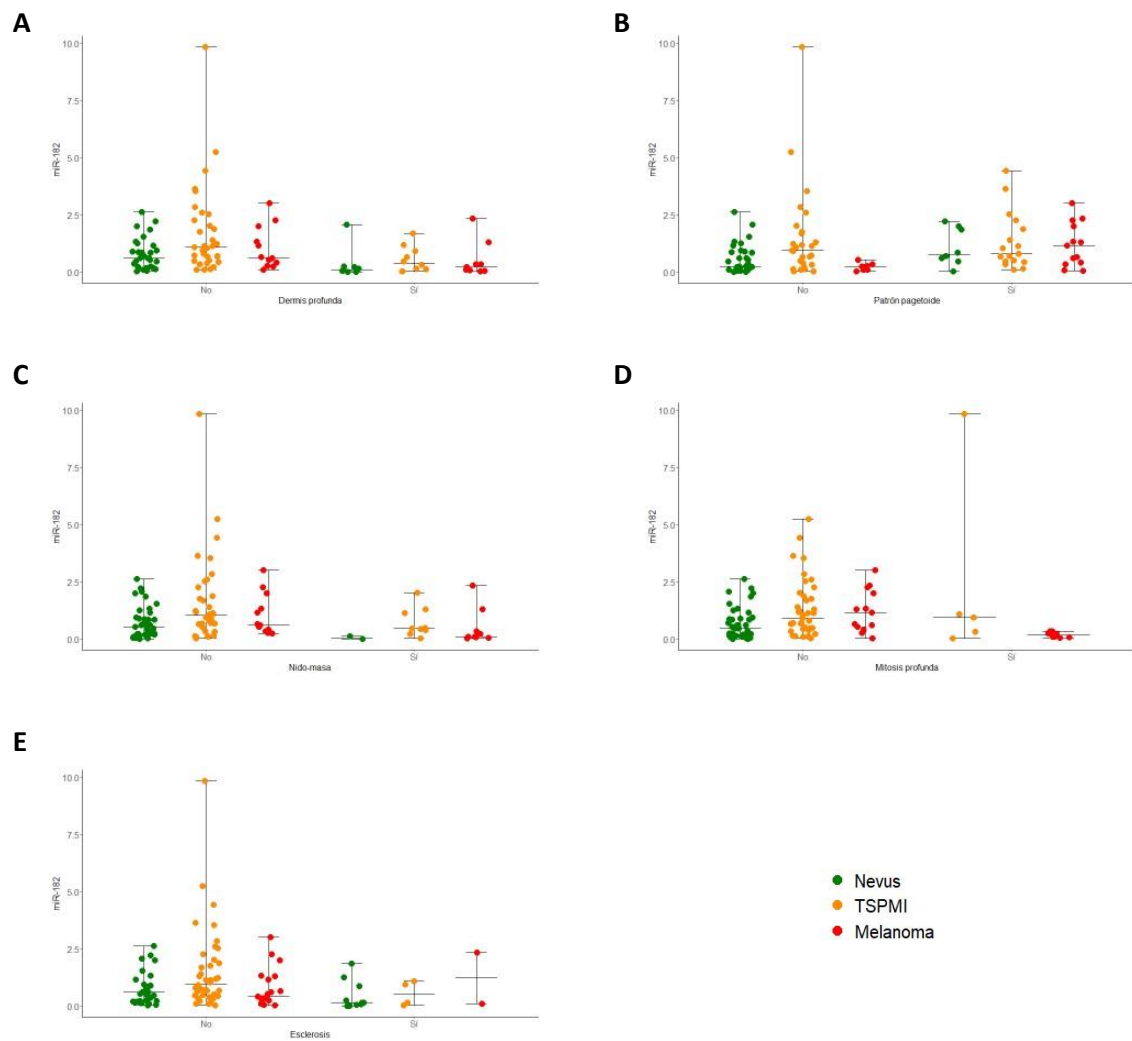


Figura 58. Distribución de las muestras según la expresión de miR-182 respecto a la (A) dermis profunda, (B) patrón pagetoide, (C) formación de masa expansiva, (D) mitosis profunda y (E) esclerosis en función del diagnóstico.

Además, la elevada expresión de miR-191 está relacionada con una maduración celular (Figura 59).

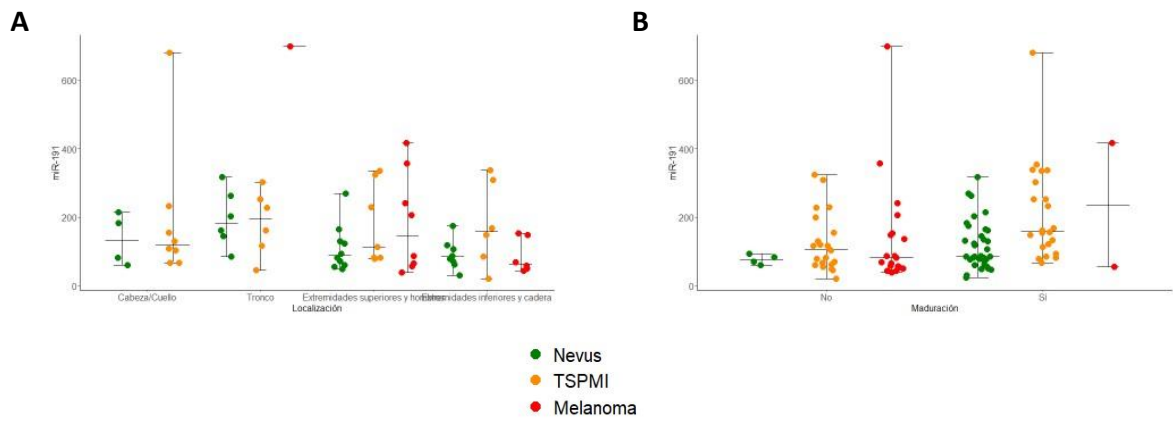


Figura 59. Distribución de las muestras según la expresión de miR-191 respecto a la (A) localización y (B) maduración en función del diagnóstico.

Unos niveles bajos tanto de miR-200c (Figura 60) como de miR-205 (Figura 61) se relacionan significativamente con lesiones que afectan a la dermis profunda, sin patrón pagetoide pero con formación de masa expansiva, con una gran número de mitosis por mm<sup>2</sup>, mitosis profundas y esclerosis. Además, la baja expresión del miR-205 también se asocia a consunción de la epidermis.



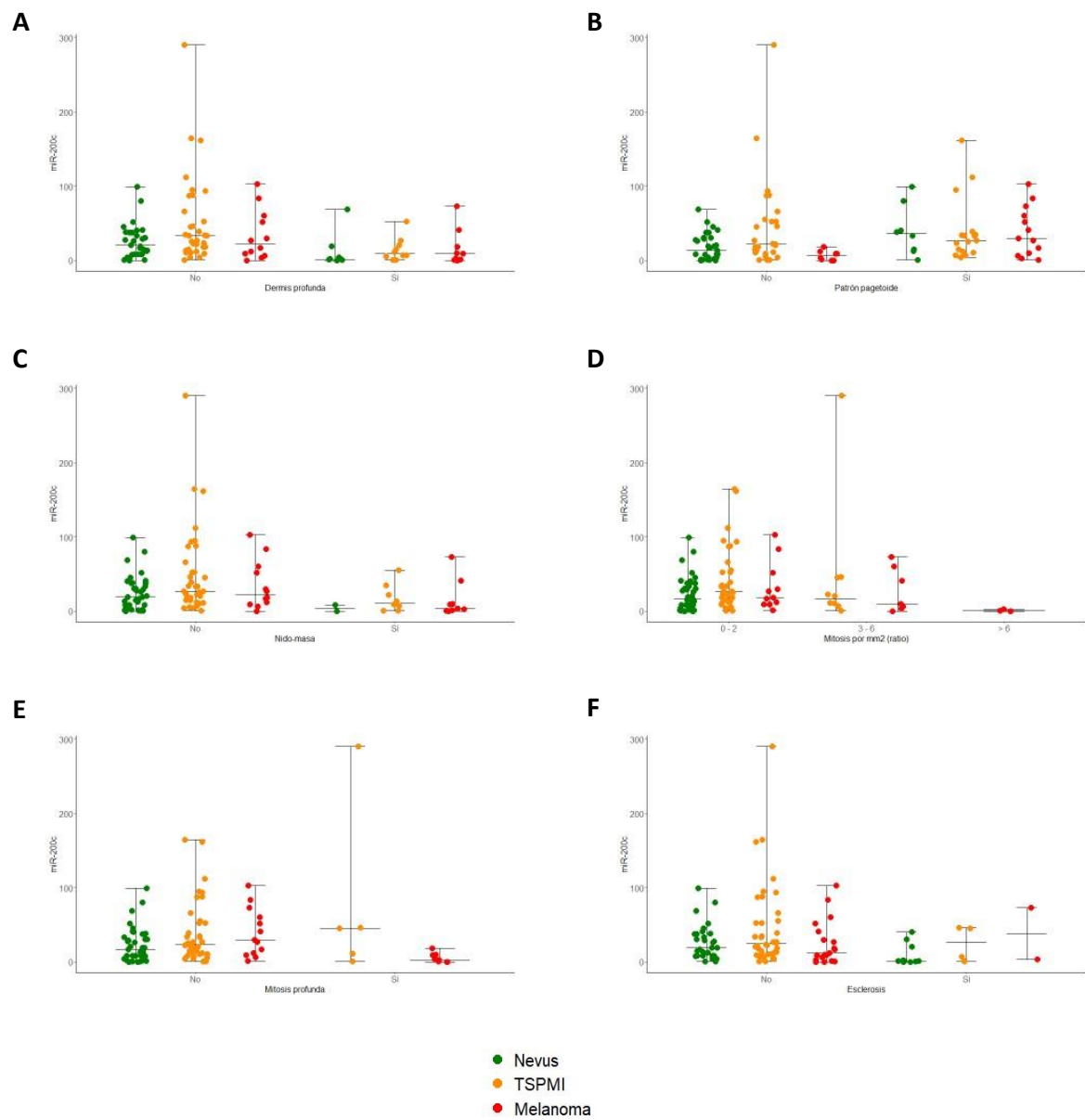


Figura 60. Distribución de las muestras según la expresión de miR-200c respecto a la (A) dermis profunda, (B) patrón pagetoide, (C) formación de masa expansiva, (D) número de mitosis (ratio), (E) mitosis profunda y (F) esclerosis en función del diagnóstico.

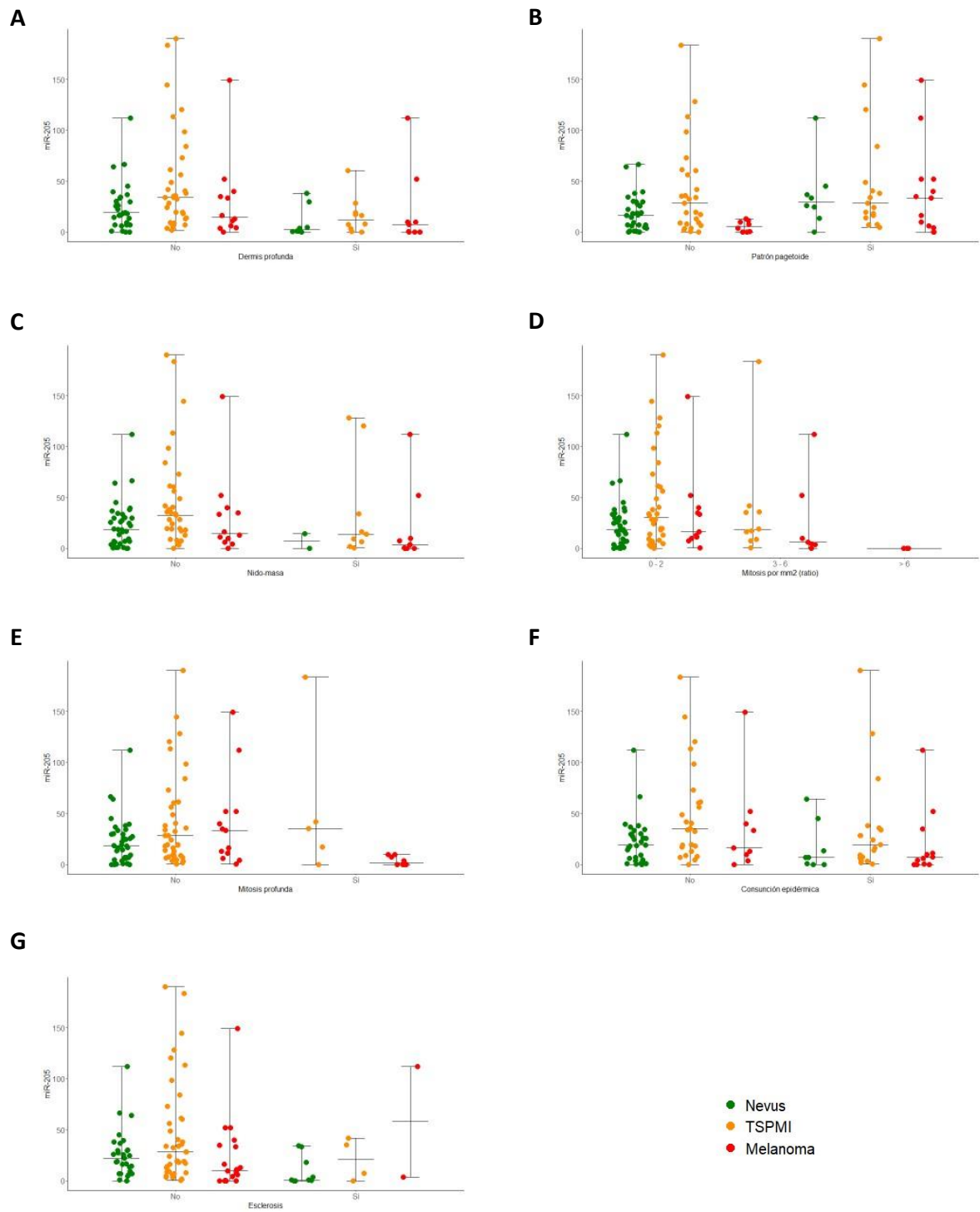


Figura 61. Distribución de las muestras según la expresión de miR-205 respecto a la (A) dermis profunda, (B) patrón pagetoide, (C) formación de masa expansiva, (D) número de mitosis (ratio), (E) mitosis profunda, (F) consunción de la epidermis y (G) esclerosis en función del diagnóstico.

Una sobreexpresión de miR-21 está relacionada con una alta densidad celular (Figura 62).

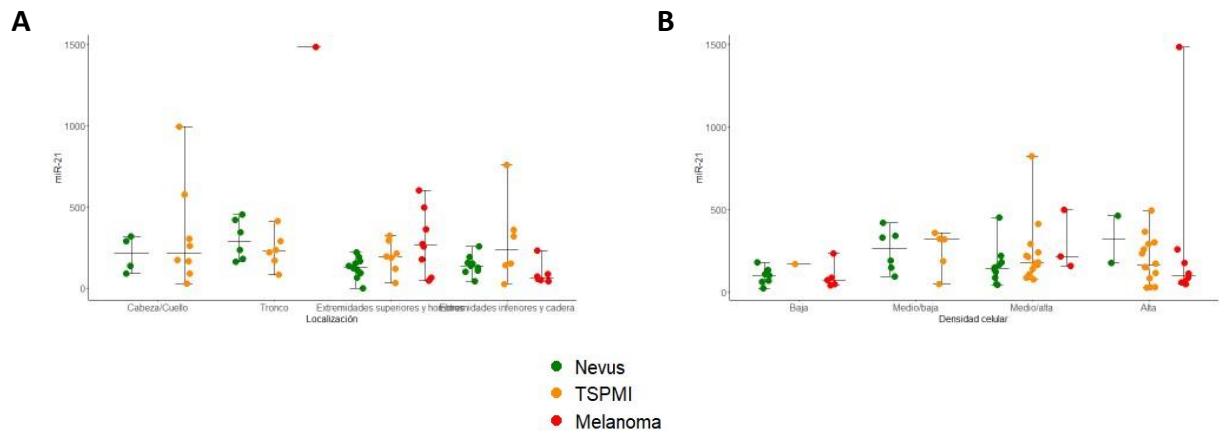


Figura 62. Distribución de las muestras según la expresión de miR-21 respecto a la (A) localización y (B) densidad celular en función del diagnóstico.

Una expresión baja de miR-211 (Figura 63) se asocia con lesiones que afectan a la dermis profunda, con mitosis profundas o marginales y esclerosis, pero sin infiltrado linfocitario intratumoral ni pigmentación.

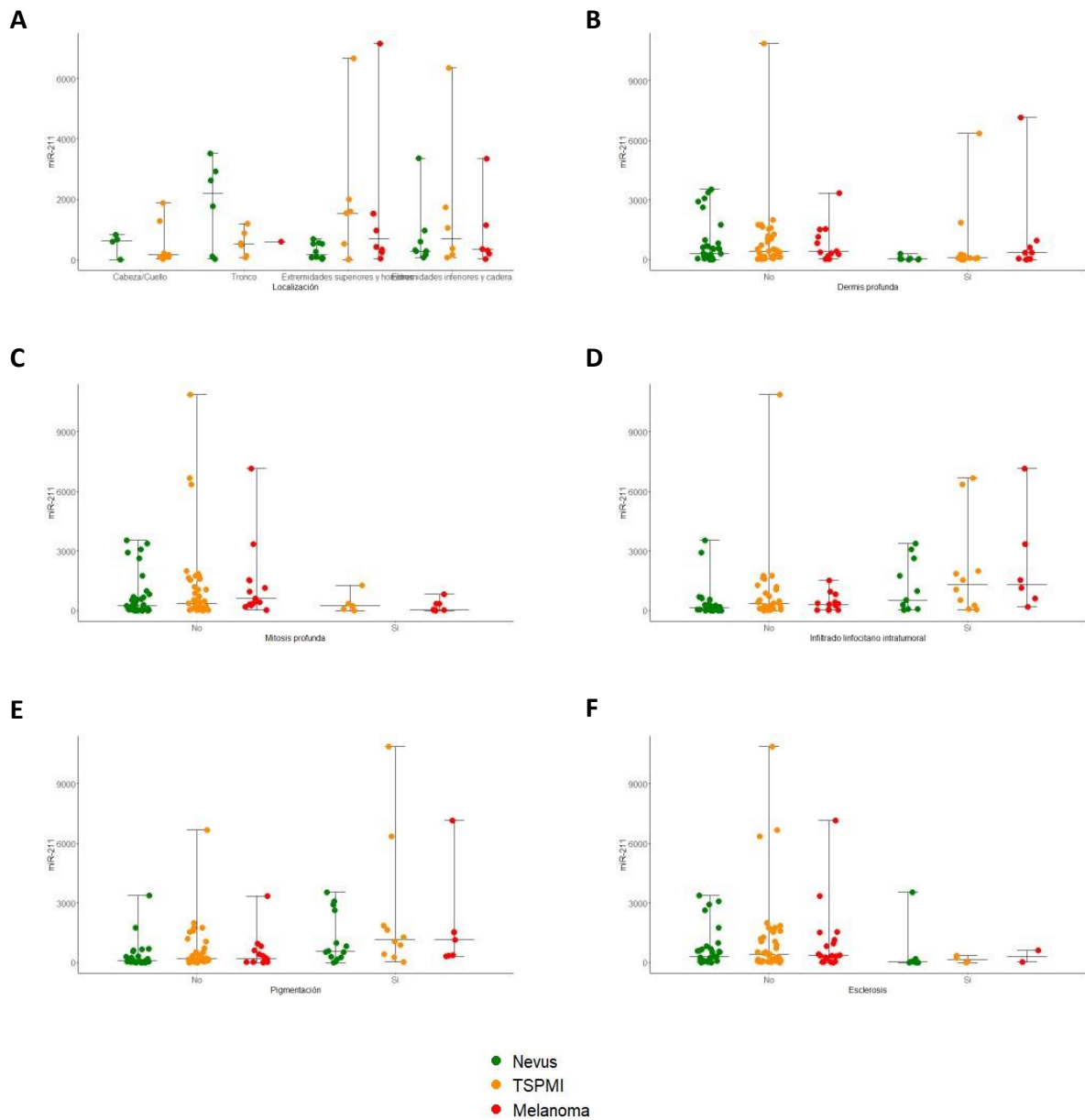


Figura 63. Distribución de las muestras según la expresión de miR-211 respecto a la (A) localización, (B) dermis profunda, (C) mitosis profunda, (D) infiltrado linfocitario intratumoral, (E) pigmentación y (F) esclerosis en función del diagnóstico.

Si los niveles de miR-221 (Figura 64) son bajos, las lesiones se caracterizan por no tener elastosis solar y contener células fusiformes. Además, se puede observar que solo tienen necrosis algunos tumores clasificados como melanoma spitzoide y la expresión de miR-221 en éstos es menor respecto a los tumores sin necrosis.

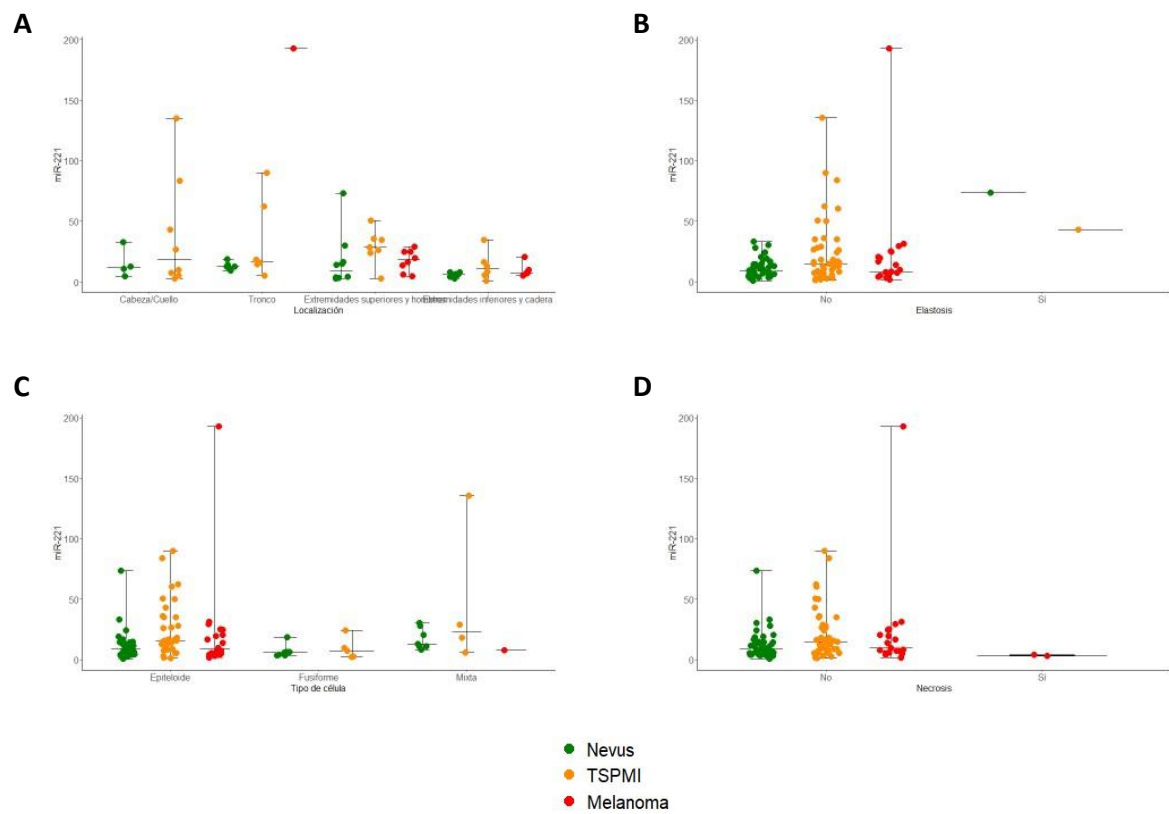


Figura 64. Distribución de las muestras según la expresión de miR-221 respecto a la (A) localización, (B) elastosis solar, (C) tipo de célula y (D) necrosis en función del diagnóstico.

Las lesiones con elevada expresión de miR-9 (Figura 65) suelen mostrar infiltrado linfocitario intratumoral y pigmentación, pero no esclerosis.

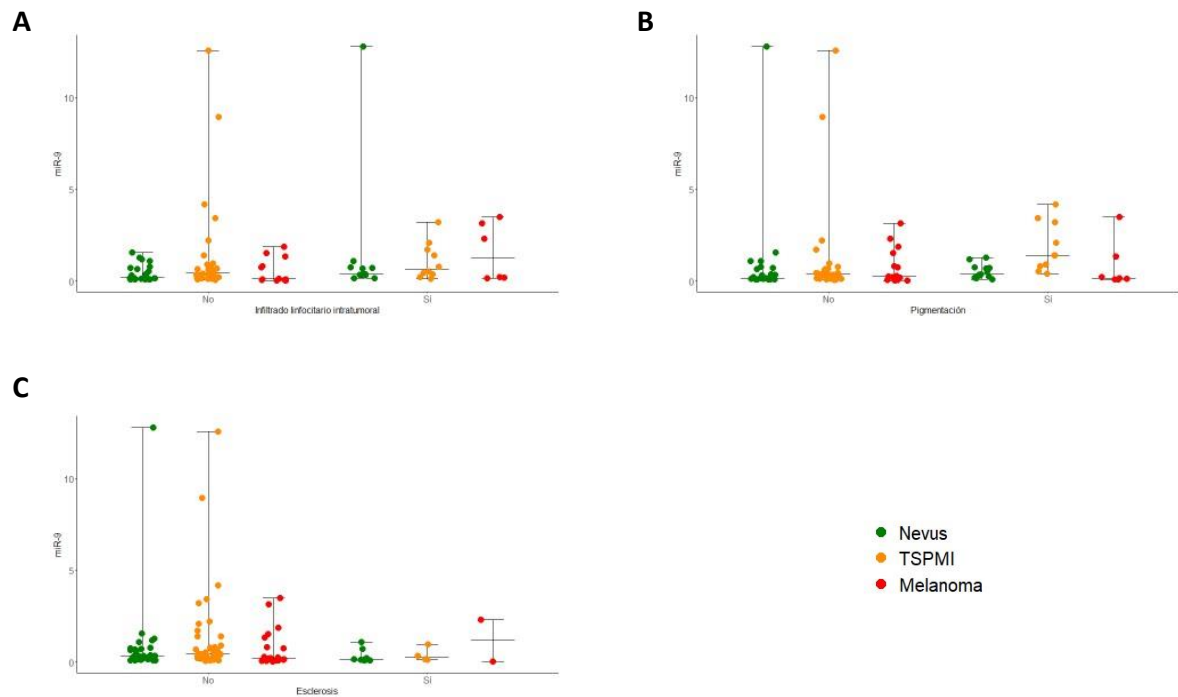


Figura 65. Distribución de las muestras según la expresión de miR-9 respecto a la (A) infiltración linfocitaria intratumoral, (B) pigmentación y (C) esclerosis en función del diagnóstico.

No hay relación significativa del 5% entre la expresión de los miRNAs y las variables continuas, con la excepción de Breslow y miR-182 ( $\rho = -0,7296$ ,  $p$ -valor = 0,0295) y para el tamaño de la lesión y miR-205 ( $\rho = -0,3762$ ,  $p$ -valor = 0,0459). Ambas relaciones significativas tienen un coeficiente rho negativo, por lo que a menor expresión del miR-182 y miR-205 habrá un mayor Breslow y tamaño de la lesión, respectivamente.

## **7. DISCUSIÓN**

Son múltiples los estudios que durante la última década plantean buscar nuevos biomarcadores que puedan ser clave para mejorar la clasificación, diagnóstico y pronóstico de las lesiones spitzoides, y entre estos biomarcadores podrían destacar los cambios epigenéticos y, en particular, la metilación<sup>2,27,39</sup>. De hecho, ya se han realizado estudios de metilación de ADN en melanoma con el fin de encontrar marcadores para predecir la progresión tumoral y que puedan asimismo servir como dianas terapéuticas<sup>63,65</sup>. Recientemente se ha descrito un patrón de metilación en el ADN de las lesiones melanocíticas spitzoides si se comparan con los tumores benignos y malignos convencionales<sup>68</sup>, pero no hay estudios que intenten comparar los distintos subtipos del espectro de las lesiones spitzoides. Puesto que nuestro fin es poder clasificar las lesiones ambiguas según su grado de malignidad necesitamos comparar los tres grupos de tumores spitzoides, sin tener en cuenta las lesiones melanocíticas convencionales.

Para realizar el estudio de metilación seleccionamos la técnica “Reduced Representation Bisulfite Sequencing” (RRBS). Con ella estudiamos 40 tumores spitzoides con la finalidad de comparar el estado de metilación génica (tanto hipermetilación como hipometilación). Esta metodología ya se ha empleado previamente en el estudio de diferentes tipos de tumores, como el cáncer colorrectal<sup>81,82</sup>, pulmón<sup>83</sup> o de esófago<sup>84</sup>, entre otros.

Tras el estudio de RRBS de los 3 grupos de tumores spitzoides, los análisis bioinformáticos demostraron la existencia de 214 sitios cg hipermetilados con una diferencia de metilación mínima del 10% y una significancia de q-valor < 0,05. Sin embargo, con el heatmap no se podían agrupar las lesiones spitzoides en función de su diagnóstico como nevus, TSPMI o melanoma. Esto se debe a que los tumores ambiguos (TSPMI) son un grupo muy heterogéneo, con algunas características similares a los nevus y otras parecidas a los melanomas spitzoides.

Por este motivo decidimos realizar el estudio de contraste partiendo inicialmente únicamente de los grupos claramente diferenciados: nevus y melanomas spitzoides. Encontramos 224 sitios diferencialmente metilados (hipermetilados o hipometilados), que permiten distinguir los tumores benignos de los malignos con una mayor definición. Marcando un p-valor  $\leq 0,02$ , se seleccionaron siete sitios de metilación. Por lo tanto, era de esperar que todos ellos fueran buenos predictores del diagnóstico. Se comprobó además que los melanomas spitzoides tienen un porcentaje de metilación mucho mayor que los nevus.

Cuatro de los siete sitios cg se encuentran en el pseudogen TEKT4P2, dos sitios están en el gen MYO1D y el restante está en el locus PMF1-BGLAP.

Creamos dos modelos bioinformáticos predictivos para primero distinguir las lesiones spitzoides benignas (nevus) de las malignas (melanomas) pero también para aplicar esos mismos algoritmos de metilación génica para subclassificar los TSPMI en función de su grado de malignidad, del que se puede deducir su riesgo potencial de agresividad clínica, en función de un valor de probabilidad que hemos llamado P(melanoma). Por una parte, un riesgo bajo significa que la probabilidad de que el tumor se comporte como un melanoma spitzoide es baja, es decir, se predice un comportamiento de la lesión de tipo nevus cuando P(Melanoma) es menor a 0,4. Por otra parte, cuando P(Melanoma) es mayor o igual a 0,4, la lesión tiene un riesgo alto de comportarse como un melanoma spitzoide. De esta forma, se adopta un carácter conservador de falso positivo, es decir, que el modelo prefiere equivocarse diciendo que es melanoma y no lo sea realmente, antes de que sea un melanoma spitzoide real y lo clasifique como nevus.

Como los dos sitios CpG del modelo 2 están incluidos entre los 7 sitios del modelo 1, y visto el poder de clasificación del modelo 1 para las muestras conocidas, se puede concluir que los 2 sitios CpG que comparten ambos modelos (uno en el gen MYO1D y otro en TEKT4P2) explican la mayor parte de la varianza en el modelo, y los 5 sitios CpG adicionales mejoran la clasificación.

TEKT4P2 está más metilado en los melanomas spitzoides en comparación con los nevus. Al ser un pseudogen, es un ARN no codificante y no hay mucha información respecto a su implicación en neoplasias humanas en la literatura. En el melanoma convencional se ha descrito que TEKT4P2 puede servir como biomarcador de progresión a metástasis<sup>85</sup>. Más concretamente, hay una infraexpresión de TEKT4P2 según aumenta el estadio. Los niveles de este ARN no codificante son menores en los estadios I/II y III/IV respecto al estadio 0 (p-valor < 0,05 y < 0,01, respectivamente)<sup>85</sup>. En este mismo estudio, además, TETK4P2 se relaciona con varios miRNAs (miR-193-3p, miR-194-3p, miR-194-5p, miR-3677-3p, miR-658 y miR708-5p)<sup>85</sup>.

Nada se ha descrito previamente sobre la expresión de TETK4P2 en los tumores melanocíticos spitzoides. Podría ocurrir que la metilación de TEKT4P2 provocara un silenciamiento y por este motivo hubiese una menor expresión del ARN no codificante según aumenta la malignidad de las lesiones (tanto en melanoma maligno convencional como en el melanoma spitzoide). Mediante la validación de la RRBS con la MS-HRM pudimos confirmar que los melanomas spitzoides tienen un mayor porcentaje de metilación de TEKT4P2 que las lesiones benignas. No obstante, cuando hemos estudiado los niveles de TEKT4P2 en nuestras muestras de parafina por PCR a tiempo real no hemos visto diferencias significativas entre los grupos nevus, TSPMI y melanoma spitzoide. Puede ocurrir que la metilación de un gen no se correlacione con su



expresión génica ya que sobre esta última pueden influir otros factores<sup>86</sup>. Aunque un aumento de la metilación normalmente causa silenciamiento génico, las bases biológicas y mecanismos que permiten que la hipermetilación no cause una expresión a la baja del transcrito todavía se desconocen. Una posible explicación es que la metilación, si está en una región cerca del sitio de inicio de la transcripción, conlleva una serie de cambios tridimensionales en la conformación de la cromatina en esta área, resultando incluso en un aumento de la transcripción<sup>87</sup>. Otra opción es que la metilación puede evitar la unión de represores que normalmente inhibirían la expresión génica en las células normales<sup>88</sup>.

El gen MYO1D, al igual que TEK4P2, está más metilado en los melanomas spitzoides que en las lesiones benignas en el estudio de RRBS. Sin embargo, esta diferencia de metilación no se pudo corroborar por MS-HRM. La expresión de este gen se ha descrito como un biomarcador con valor pronóstico tanto en el cáncer urotelial (actuando como marcador de evolución desfavorable) como en el cáncer renal (marcador de evolución favorable)<sup>89</sup>. Además, se ha observado que MYO1D está asociado al cáncer de próstata, ya que es uno de los genes diana de la actividad de la histona H3K27me3<sup>90</sup>. En el cáncer de próstata se produce una hiperactivación de la histona H3K27me3 en estadios avanzados, por lo que MYO1D sufriría una hipermetilación, es decir, a mayor malignidad habría una mayor metilación de MYO1D<sup>91</sup>. Sin embargo, en otros tipos tumorales se han observado resultados contradictorios ya que MYO1D se une a proteínas de la familia ErbB, sobretodo EGFR, y las anclan en la membrana plasmática a través del citoesqueleto de actina. Una sobreexpresión de MYO1D aumenta la motilidad y viabilidad celular mediante el aumento de los niveles de EGFR en cáncer colorrectal, por lo que una sobreexpresión de MYO1D contribuye a la carcinogénesis en este tipo de tumores, considerándose como un posible oncogén<sup>92</sup>. También se ha descrito que MYO1D regula EGFR y las sucesivas rutas oncogénicas en leucemia mieloide aguda<sup>93</sup>. Se comprobó en modelos celulares que un knock-down del gen MYO1D suprimía el crecimiento e invasión celular en cáncer de pulmón y glioblastomas.<sup>94</sup>

Al igual que los sitios cg encontrados en TEK4P2 y MYO1D, el *locus* PMF1-BGLAP está hipermetilado en las lesiones melanocíticas malignas en comparación con los nevus de Spitz. Se ha predicho que tiene una localización intracelular pero no es específica de ningún tejido<sup>89</sup>. PMF1-BGLAP codifica la proteína nuclear PMF1, que está regulada por poliaminas, y que es necesaria para el alineamiento y segregación correcto de los cromosomas durante la mitosis<sup>95</sup>. Se ha descrito como un marcador de mal pronóstico en cáncer renal y de hígado<sup>89</sup>.

Además, tal y como ocurre en los tumores spitzoides, se ha descrito que la metilación del gen PMF1 en cáncer de vejiga se asocia con malignidad<sup>96</sup>.

Para validar los siete sitios diferencialmente encontrados entre las lesiones spitzoides tipo nevus y melanoma se realizó la técnica MS-HRM<sup>97</sup>. Se trata de un protocolo basado en la comparación de curvas de melting de productos de PCR, ya que van a tener temperaturas de fusión distintas en función del grado de metilación. Aunque hay varios métodos para analizar los resultados, nosotros seleccionamos la utilización de los picos de temperatura<sup>98</sup>. No se pudo validar por esta técnica la diferencia de metilación de PMF1-BGLAP, ya que no se obtenían valores de Ct aceptables, lo que podría deberse a un mal diseño de los primers, que deben cumplir ciertas condiciones<sup>97</sup>. No se observaron diferencias significativas en el grado de metilación de MYO1D, por lo que no serviría como indicador de la evolución de las muestras. Como se ha mencionado anteriormente, solo TEKT4P2 estaba diferencialmente metilado entre los nevus y melanomas spitzoides, encontrando un mayor porcentaje de metilación en las lesiones malignas. Esta diferencia de los niveles de metilación podría permitir clasificar las muestras pertenecientes al grupo de TSPMI. Sin embargo, se debería establecer un valor de corte para poder clasificar las muestras como nevus o melanoma.

Aunque no hemos encontrado ningún parámetro histológico ni clínico que se relacione con todos los sitios diferencialmente metilados descritos, con la excepción del sitio cg9825882 localizado en el TEKT4P2, el resto influyen en algún aspecto relacionado con la mitosis. Los niveles de metilación eran más elevados en lesiones que presentaban mayor número de mitosis, mitosis atípicas o mitosis profundas. Las lesiones spitzoides benignas se caracterizan por tener pocas o ninguna mitosis, mientras que tanto las lesiones ambiguas como las malignas, y especialmente estas últimas que en nuestra serie presentan una mayor metilación, se caracterizan por un mayor número de mitosis y suelen ser profundas, marginales o atípicas<sup>12</sup>.

En cuanto al seguimiento clínico de nuestros pacientes solo dos de ellos desarrollaron metástasis (2/105). De estos, solo uno (1/105) murió a consecuencia de la enfermedad. Por este motivo, no se han podido realizar estudios estadísticos relacionados con la supervivencia. Resulta inusual que dado el número de lesiones ambiguas que disponemos, durante el seguimiento no haya más pacientes que hayan desarrollado metástasis ganglionares, ya que se estima que el 30% de estos pacientes puede desarrollar un ganglio centinela positivo aunque solo el 1% morirá a consecuencia de la enfermedad<sup>43,99</sup>. El tiempo de seguimiento clínico promedio de nuestros pacientes ha sido de 53 meses, con una mediana de 32 meses y una desviación estándar de 63,66. El paciente con mayor tiempo de seguimiento ha sido de 237 meses (equivalente a casi

20 años). En este sentido, y en línea con nuestros resultados, en un estudio longitudinal de 144 pacientes con lesiones spitzoides, entre nevus y tumores atípicos, con un tiempo de seguimiento de nueve años no notificaron ningún paciente con metástasis<sup>100</sup>.

Los miRNAs son conocidos marcadores epigenéticos estudiados en las lesiones melanocíticas y han sido utilizados tanto para clasificar los tumores ambiguos<sup>71</sup> como para crear un perfil diagnóstico en las lesiones spitzoides<sup>72</sup>. Para este estudio, seleccionamos una serie de miRNAs conocidos por estar desregulados en melanoma convencional<sup>101</sup>. Éstos son miR-125, miR-137, miR-182, miR-191, miR-200c, miR-205, miR-21, miR-211, miR-221 y miR-9.

Tras analizar sus niveles de expresión, vemos que hay diferencias significativas de los miRNA miR-137, miR-182, miR-205 y miR-221 en función del diagnóstico. Se observa que, de forma global, tanto en los miRNAs que están diferencialmente expresados de forma significativa como los que no, hay una menor expresión de todos ellos en los melanomas spitzoides en comparación con los nevus. Tanto el miR-21 como miR-211 son excepciones, ya que están sobreexpresados (no significativamente) en el melanoma spitzoide, corroborando el resultado obtenido en otro estudio<sup>71</sup>. Aunque también se ha descrito que los melanomas spitzoides tienen unos niveles de miR-200c mayores a los de las lesiones spitzoides benignas y ambiguas<sup>71</sup>, en nuestros casos observamos que no hay prácticamente diferencia en su expresión entre nevus y melanomas spitzoides, mientras que los tumores de potencial maligno incierto presentan un ratio de expresión mucho mayor.

Los miRNAs diferencialmente expresados en las lesiones spitzoides, miR-137, miR-182 y miR-205, se encuentran entre los descritos previamente por nuestro grupo de investigación con una correlación con diferentes criterios clinicopatológicos en melanomas convencionales primarios, y los niveles de estos miRNAs van decreciendo según progresa la enfermedad<sup>102</sup>. Observamos también diferencias significativas en la expresión de miR-125b, miR-200c, miR-211 y miR-9, que también hemos estudiado en las lesiones spitzoides. Se observó en melanoma convencional que unos niveles de expresión bajos de los miR-205, miR-200c y miR-125b pueden servir como biomarcadores moleculares pronósticos para seleccionar pacientes de melanoma con alto riesgo de desarrollar metástasis a distancia<sup>102</sup>, y además, de forma independiente del estado mutacional del gen BRAF<sup>103</sup>.

Por otra parte, también hay diferencias significativas en los niveles de miR-221, encontrando una infraexpresión de este en los melanomas spitzoides en comparación con los nevus. Sin embargo, se han encontrado elevados niveles de este miRNA circulando en la sangre de pacientes con melanoma cutáneo convencional cuando se comparaba con muestras de

pacientes sanos, indicando además que miR-221 puede ser un biomarcador pronóstico<sup>104</sup>. miR-221 está relacionado con p27, que suele encontrarse en niveles bajos en melanoma, y funciona como regulador del ciclo celular modulando la ciclina D1<sup>105</sup>. Inhibiendo *in vitro* e *in vivo* la expresión del miR-221 mediante antagonistas específicos se observa una reducción de la progresión de las células de melanoma maligno<sup>106</sup>, que podría explicar por qué las lesiones spitzoides tienen un porcentaje bajo de metástasis.

Intentamos identificar un punto de corte para los miRNAs a partir del cual se pudiesen subclassificar los TSPMI como nevus o como melanoma spitzoide, tal y como realizamos con los sitios de metilación. Sin embargo, los valores de expresión de todos los miRNAs entre nevus y melanoma se solapan, y el rango de TSPMI es más amplio y contiene los valores de los grupos benigno y maligno. En consecuencia, ninguno de los miRNAs estudiados puede servirnos como biomarcador pronóstico de evolución de las lesiones melanocíticas spitzoides de potencial maligno incierto. Este hecho puede deberse a que la selección de los miRNAs se realizó partiendo de estudios sobre melanoma maligno, debido a nuestros estudios previos, y sería más adecuado haber hecho una nueva selección basándonos en las lesiones spitzoides<sup>72</sup> o realizar un estudio de secuenciación masiva, como miRNA-Seq<sup>107</sup>.

Como nuestro propósito es conseguir un biomarcador diagnóstico y pronóstico para las lesiones spitzoides, éste debería ser accesible en la rutina clínica de los centros hospitalarios. El estudio de RRBS es caro, lento y costoso, mientras que la técnica MS-HRM necesita unos termocicladores concretos que pueden no estar en los laboratorios de biología molecular de los hospitales y su interpretación es compleja. Por ese motivo, realizamos el estudio mediante PCR en tiempo real del único biomarcador validado por MS-HRM, el pseudogen TEK4P2 por RT-PCR, pero como se ha explicado anteriormente, no se observan diferencias de expresión del ARN mensajero de TEK4P2 entre nevus, TSPMI y melanoma spitzoides.

Asimismo, se intentó establecer una relación entre los siete sitios diferencialmente metilados con los 10 miRNAs, pero se observó que eran variables de características no relacionables. No obstante, creamos una regla de predicción de las lesiones ambiguas en función de los niveles de los miRNA, partiendo del modelo bioinformático creado a partir de los resultados de RRBS. La clasificación creada mediante la técnica de árbol es hipotética, por lo que el resultado que obtenemos no es posible compararlo con ninguna otra clasificación, por lo que se trata únicamente de una aproximación teórica.

Como conclusión, con este trabajo hemos sido capaces de crear un algoritmo diagnóstico altamente efectivo para distinguir los tumores melanocíticos spitzoides benignos (nevus de

Spitz) de los malignos (melanomas spitzoides) en función de la metilación de sitios de metilación de TEKT4P2, MYO1D y PMF1-BGLAP. Asimismo, utilizando este mismo algoritmo hemos propuesto subclasificar las lesiones spitzoides atípicas, de potencial maligno incierto, en dos grupos, de bajo y alto grado de malignidad, según la similitud de sus patrones de metilación con los de los nevus o con los de los melanomas spitzoides, respectivamente.

Al tratarse de un resultado con un elevado potencial de traslación clínica, nos pusimos en contacto con la Unidad de Innovación de la Fundación para la Investigación del Hospital Clínico de la Comunidad Valenciana-INCLIVA y con la Oficina de Transferència de Resultats d'Investigació (OTRI) de la Universitat de València para realizar el estudio de patentabilidad. El 28 de junio del 2021 se solicitó formalmente el registro del algoritmo descrito en la Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM) como patente europea con número de solicitud 300414784, número de aplicación EP21382569.8 y con referencia EP3225.4, con título "MOLECULAR TOOLS FOR THE DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF MELANOCYTIC SPITZOID TUMORS.". Además, el 27 de junio de 2022 se realizó la solicitud de patente internacional (PCT), dentro del año de prioridad, con número de solicitud 11071606, número de aplicación PCT/EP2022/067556. De esta forma, se aspira a ofrecer una solución rápida, precisa y efectiva, para poner a disposición de los sistemas nacionales de salud para su aplicación generalizada en la clínica diaria.

Con el fin de mejorar el poder diagnóstico y pronóstico del algoritmo descrito sería necesario realizar el estudio de metilación en un mayor número de lesiones spitzoides con un seguimiento clínico amplio, y a ser posible, en el que un número significativo de pacientes hayan desarrollado metástasis o hayan fallecido por la enfermedad. Además, se podrían añadir otros biomarcadores epigenéticos (como nuevos sitios de metilación o miRNAs) y genéticos (como mutaciones puntuales, ganancia o pérdida de genes y/o regiones cromosómicas o fusiones). Toda la información obtenida, tanto epigenética como genética, se debería relacionar con los parámetros histopatológicos para así poder abordar el manejo y posibles tratamientos de las lesiones spitzoides de forma multidisciplinar, siempre buscando en último término el beneficio de los pacientes.

## **8. CONCLUSIONES**

1. No existen actualmente criterios universalmente aceptados para el diagnóstico y clasificación de los tumores spitzoides y, en especial, para la subclasificación de los tumores atípicos de potencial maligno incierto (TSPMI).
2. Los patrones de metilación de los tumores spitzoides son diferentes en los benignos (nevus) y los malignos (melanomas), mientras que en los TSPMI existe una gran heterogeneidad.
3. Los algoritmos de clasificación bioinformáticos nos han permitido encontrar una firma epigenética, en función del estado de determinados sitios de metilación de TEKT4P2, MYO1D y PMF1-BGLAP, que permite distinguir los nevus de Spitz de los melanomas spitzoides.
4. Esta firma epigenética permite asimismo subclasificar los TSPMI, por su similitud a los benignos o malignos, en bajo y alto grado de malignidad.
5. Los miRNAs miR-137, miR-182, miR-205 y miR-221 están infraexpresados en los melanomas spitzoides respecto a las lesiones spitzoides benignas.
6. No existe correlación entre los sitios de metilación de la firma epigenética y la expresión de los miRNAs estudiados en los tumores spitzoides.
7. La firma epigenética que proponemos debe ser corroborada y optimizada mediante estudios adicionales en un mayor número de tumores spitzoides con amplio seguimiento clínico dada la baja prevalencia de efectos clínicos adversos, especialmente en los TSPMI.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Roh MR, Eliades P, Gupta S, Tsao H. Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28(6):661-672. doi:doi:10.1111/pcmr.12412
2. Hillen LM, Van den Oord J, Geybels MS, Becker JC, Hausen A zur, Winnepenninckx V. Genomic landscape of spitzoid neoplasms impacting patient management. *Front Med.* 2018;5(DEC). doi:10.3389/fmed.2018.00344
3. Abboud J, Stein M, Ramien M, Malic C. The diagnosis and management of the Spitz nevus in the pediatric population: A systematic review and meta-analysis protocol. *Syst Rev.* 2017;6(1):1-5. doi:10.1186/s13643-017-0477-8
4. Harms KL, Lowe L, Fullen DR, Harms PW. Atypical spitz tumors a diagnostic challenge. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139(10):1263-1270. doi:10.5858/arpa.2015-0207-RA
5. Luo S, Sepehr A, Tsao H. Spitz nevi and other Spitzoid lesions: Part I. Background and diagnoses. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65(6):1073-1084. doi:10.1016/j.jaad.2011.04.040
6. Barnhill RL. The Spitzoid lesion: Rethinking Spitz tumors, atypical variants, "Spitzoid melanoma" and risk assessment. *Mod Pathol.* 2006;19(SUPPL. 2). doi:10.1038/modpathol.3800519
7. Dika E, Ravaioli GM, Fanti PA, Neri I, Patrizi A. Spitz Nevi and Other Spitzoid Neoplasms in Children: Overview of Incidence Data and Diagnostic Criteria. *Pediatr Dermatol.* 2017;34(1):25-32. doi:10.1111/pde.13025
8. Sainz-Gaspar L, Sánchez-Bernal J, Noguera-Morel L, Hernández-Martín A, Colmenero I, Torrelo A. Nevo de Spitz y otros tumores spitzoides en la infancia. Parte 1: aspectos clínicos, histológicos e inmunohistoquímicos. *Actas Dermosifiliogr.* 2020;111(1):7-19. doi:10.1016/j.ad.2019.02.011
9. Šitum M, Bolanèa Ž, Buljan M, Toma D, Ivanèic M. Nevus Spitz - Everlasting diagnostic difficulties - The review. *Coll Antropol.* 2008;32(SUPPL. 2):171-176.
10. Brown A, Sawyer JD, Neumeister MW. Spitz Nevus: Review and Update. *Clin Plast Surg.* 2021;48(4):677-686. doi:10.1016/j.cps.2021.06.002
11. Lott JP, Wititsuwannakul J, Lee JJ, et al. Clinical characteristics associated with Spitz nevi and Spitzoid malignant melanomas: The Yale University Spitzoid Neoplasm Repository experience, 1991 to 2008. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71(6):1077-1082. doi:10.1016/j.jaad.2014.08.026.Clinical
12. Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R. *WHO Classification of Skin Tumours, 4th Ed.* Vol 11.; 2018.
13. Lyon VB. The Spitz Nevus: Review and Update. *Clin Plast Surg.* 2010;37(1):21-33. doi:10.1016/j.cps.2009.08.003
14. Dika E, Neri I, Fanti PA, Barisani A, Ravaioli GM, Patrizi A. Spitz nevi: diverse clinical, dermatoscopic and histopathological features in childhood. *JDDG - J Ger Soc Dermatology.* 2017;15(1):70-75. doi:10.1111/ddg.12904
15. Darier J, Civatte A. Naevus ou naevo-carcinoma chez un nourisson. *Bull Soc Fr Derm Syph.* 1910;21:61-63.
16. Manchi M, Canzonieri V. Atypical melanocytic lesions: a historical overview. *Pol J*

*Pathol.* 2019;70(1):26-32. doi:10.5114/pjp.2019.84459

17. Pack G, Anglem T. Tumors of the soft somatic tissue in infancy and childhood. *J Pediatr.* 1939;15:372-400.
18. Spitz S. Melanomas of childhood. *Am J Pathol.* 1948;24(3):591-609.
19. Zhao G, Lee KC, Peacock S, et al. The utilization of spitz-related nomenclature in the histological interpretation of cutaneous melanocytic lesions by practicing pathologists: Results from the M-Path Study. *J Cutan Pathol.* 2017;44(1):5-14. doi:10.1111/cup.12826
20. Reed M, Ichinose H, Clark W, Mihm MC. Common and uncommon melanocytic nevi and borderline melanomas. *Semin Oncol.* 1975;2:119-147.
21. Elder DE, Bastian BC, Cree IA, Massi D, Scolyer RA. The 2018 World Health Organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway. *Arch Pathol Lab Med.* 2020;144(4):500-522. doi:10.5858/arpa.2019-0561-RA
22. Stefanaki C, Stefanaki K, Chardalias L, Soura E, Stratigos A. Differential diagnosis of Spitzoid melanocytic neoplasms. *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2016;30(8):1269-1277. doi:10.1111/jdv.13665
23. Requena C, Requena L, Kutzner H, Sa E. Spitz nevus: a clinicopathological study of 349 cases. *Am J Dermatopathol.* 2009;31(2):107-116.
24. Busam KJ, Barnhill RL. Pagetoid Spitz nevus. Intraepidermal Spitz tumor with prominent pagetoid spread. *Am J Surg Pathol.* 1995;19(9):1061-1067.
25. Lee S, Barnhill RL, Dummer R, et al. TERT Promoter Mutations Are Predictive of Aggressive Clinical Behavior in Patients with Spitzoid Melanocytic Neoplasms. *Sci Rep.* 2015;5(June):1-7. doi:10.1038/srep11200
26. Requena C, Botella R, Nagore E, et al. Characteristics of spitzoid melanoma and clues for differential diagnosis with spitz nevus. *Am J Dermatopathol.* 2012;34(5):478-486. doi:10.1097/DAD.0b013e318234e780
27. Wiesner T, Kutzner H, Cerroni L, Mihm MC, Busam KJ, Murali R. Genomic aberrations in spitzoid melanocytic tumours and their implications for diagnosis, prognosis and therapy. *Pathology.* 2016;48(2):113-131. doi:10.1016/j.pathol.2015.12.007
28. Mesbah Ardakani N, Thomas C, Robinson C, et al. Detection of copy number variations in melanocytic lesions utilising array based comparative genomic hybridisation. *Pathology.* 2017;49(3):285-291. doi:10.1016/j.pathol.2016.11.008
29. Lee CY, Gerami P. Molecular techniques for predicting behaviour in melanocytic neoplasms. *Pathology.* 2016;48(2):142-146. doi:10.1016/j.pathol.2015.12.004
30. Yeh I, Mully TW, Wiesner T, et al. Ambiguous melanocytic tumors with loss of 3p21. *Am J Surg Pathol.* 2014;38(8):1088-1095. doi:10.1097/PAS.0000000000000209
31. Gerami P, Scolyer RA, Xu X, et al. Risk assessment for atypical spitzoid melanocytic neoplasms using FISH to identify chromosomal copy number aberrations. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(5):676-684. doi:10.1097/PAS.0b013e3182753de6
32. Dimonitsas E, Liakea A, Sakellariou S, et al. An update on molecular alterations in melanocytic tumors with emphasis on Spitzoid lesions. *Ann Transl Med.* 2018;6(12):249-249. doi:10.21037/atm.2018.05.23



33. Martinez Ciarpaglini C, Gonzalez J, Sanchez B, et al. The amount of melanin influences p16 Loss in spitzoid melanocytic lesions: Correlation with CDKN2A Status by FISH and MLPA. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019;27(6):423-429. doi:10.1097/PAI.0000000000000633
34. Cesinaro AM, Schirosi L, Bettelli S, Migaldi M, Maiorana A. Alterations of 9p21 analysed by FISH and MLPA distinguish atypical spitzoid melanocytic tumours from conventional Spitz's nevi but do not predict their biological behaviour. *Histopathology*. 2010;57(4):515-527. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03653.x
35. Raghavan SS, Peternel S, Mully TW, et al. Spitz melanoma is a distinct subset of spitzoid melanoma. *Mod Pathol*. 2020;33(6):1122-1134. doi:10.1038/s41379-019-0445-z
36. Van Dijk MCRE, Bernsen MR, Ruiter DJ. Analysis of mutations in B-RAF, N-RAS, and H-RAS genes in the differential diagnosis of Spitz nevus and spitzoid melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(9):1145-1151. doi:10.1097/01.pas.0000157749.18591.9e
37. Fullen DR, Poynter JN, Lowe L, et al. BRAF and NRAS mutations in spitzoid melanocytic lesions. *Mod Pathol*. 2006;19(10):1324-1332. doi:10.1038/modpathol.3800653
38. Da Forno PD, Pringle JH, Fletcher A, et al. BRAF, NRAS and HRAS mutations in spitzoid tumours and their possible pathogenetic significance. *Br J Dermatol*. 2009;161(2):364-372. doi:10.1111/j.1365-2133.2009.09181.x
39. Lazova R, Pornputtapong N, Halaban R, et al. Spitz nevi and Spitzoid melanomas: Exome sequencing and comparison with conventional melanocytic nevi and melanomas. *Mod Pathol*. 2017;30(5):640-649. doi:10.1038/modpathol.2016.237
40. Tetzlaff MT, Reuben A, Billings SD, Prieto VG, Curry JL. Toward a Molecular-Genetic Classification of Spitzoid Neoplasms. *Clin Lab Med*. 2017;37(3):431-448. doi:10.1016/j.cll.2017.05.003
41. Van Engen-Van Grunsven ACH, Van Dijk MCRF, Ruiter DJ, Klaasen A, Mooi WJ, Blokx WAM. HRAS-mutated spitz tumors: A subtype of spitz tumors with distinct features. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(10):1436-1441. doi:10.1097/PAS.0b013e3181f0a749
42. Wiesner T, Obenauf AC, Murali R, et al. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet*. 2011;43(10):1018-1022. doi:10.1038/ng.910
43. Sainz-Gaspar L, Sánchez-Bernal J, Noguera-Morel L, Hernández-Martín A, Colmenero I, Torrelo A. Nevo de Spitz y otros tumores spitzoides en la infancia. Parte 2: características citogenéticas y moleculares. Pronóstico y tratamiento. *Actas Dermosifiliogr*. 2020;111(1):20-25. doi:doi.org/10.1016/j.ad.2019.02.010
44. Wiesner T, Murali R, Fried I, et al. A distinct subset of atypical spitz tumors is characterized by BRAF mutation and loss of BAP1 expression. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(6):818-830. doi:10.1097/PAS.0b013e3182498be5
45. Requena C, Heidenreich B, Kumar R, Nagore E. TERT promoter mutations are not always associated with poor prognosis in atypical spitzoid tumors. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2017;30(2):265-268. doi:10.1111/pcmr.12565
46. Wiesner T, He J, Yelensky R, et al. Kinase fusions are frequent in Spitz tumours and spitzoid melanomas. *Nat Commun*. 2014;5(3116). doi:10.1038/ncomms4116
47. Quan VL, Panah E, Zhang B, Shi K, Mohan LS, Gerami P. The role of gene fusions in melanocytic neoplasms. *J Cutan Pathol*. 2019;46(11):878-887. doi:10.1111/cup.13521

48. Busam KJ, Kutzner H, Cerroni L, Wiesner T. Clinical and pathologic findings of Spitz nevi and atypical Spitz tumors with ALK fusions. *Am J Pathol.* 2014;38(7):925-933. doi:10.1097/PAS.0000000000000187
49. Cesinaro AM, Gallo G, Manfredini S, Maiorana A, Bettelli SR. ROS1 pattern of immunostaining in 11 cases of spitzoid tumour: comparison with histopathological, fluorescence in-situ hybridisation and next-generation sequencing analysis. *Histopathology.* 2021;79(6):966-974. doi:10.1111/his.14445
50. Yeh I, De La Fouchardiere A, Pissaloux D, et al. Clinical, histopathologic, and genomic features of Spitz tumors with ALK fusions. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(5):581-591. doi:10.1097/PAS.0000000000000387
51. Amin SM, Haugh AM, Lee CY, et al. A comparison of morphologic and molecular features of BRAF, ALK, and NTRK1 fusion spitzoid neoplasms. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(4):491-498. doi:10.1097/PAS.0000000000000761
52. Yeh I, Botton T, Talevich E, et al. Activating MET kinase rearrangements in melanoma and Spitz tumors. *Nat Commun.* 2015;6(7174). doi:10.1038/ncomms8174
53. Yeh I, Tee MK, Botton T, et al. NTRK3 kinase fusions in Spitz tumours. *J Pathol.* 2016;240(3):282-290. doi:10.1002/path.4775
54. Cappellesso R, Nozzoli F, Marino FZ, et al. Ntrk gene fusion detection in atypical spitz tumors. *Int J Mol Sci.* 2021;22(22):1-14. doi:10.3390/ijms222212332
55. Quan VL, Zhang B, Zhang Y, et al. Integrating Next-Generation Sequencing with Morphology Improves Prognostic and Biologic Classification of Spitz Neoplasms. *J Invest Dermatol.* 2020;140(8):1599-1608. doi:10.1016/j.jid.2019.12.031
56. Zarabi SK, Azzato EM, Tu ZJ, et al. Targeted next generation sequencing (NGS) to classify melanocytic neoplasms. *J Cutan Pathol.* 2020;47(8):691-704. doi:10.1111/cup.13695
57. Hillen LM, Geybels MS, Spassova I, et al. A digital mRNA expression signature to classify challenging Spitzoid melanocytic neoplasms. *FEBS Open Bio.* 2020;10(7):1326-1341. doi:10.1002/2211-5463.12897
58. Hillen LM, Geybels MS, Rennspiess D, et al. Molecular profiling of Spitz nevi identified by digital RNA counting. *Melanoma Res.* 2018;28(6):510-520. doi:10.1097/CMR.0000000000000495
59. Lazova R, Seeley EH, Keenan M, Gueorguieva R, Caprioli RM. Imaging Mass Spectrometry - a new and promising method to differentiate Spitz nevi from Spitzoid malignant melanomas. *Am J Dermatopathol.* 2012;34(1):82-90. doi:10.1097/DAD.0b013e31823df1e2.Imaging
60. Lazova R, Seeley EH, Kutzner H, et al. Imaging mass spectrometry assists in the classification of diagnostically challenging atypical Spitzoid neoplasms. *J Am Acad Dermatol.* 2016;75(6):1176-1186. doi:10.1016/j.jaad.2016.07.007
61. Rivera RM, Bennett LB. Epigenetics in humans: An overview. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(6):493-499. doi:10.1097/MED.0b013e3283404f4b
62. Werner RJ, Kelly AD, Issa J-PJ. Epigenetics and Precision Oncology. *Cancer J.* 2017;23(5):262-269. doi:10.1097/PPO.0000000000000281
63. Micevic G, Theodosakis N, Bosenberg M. Aberrant DNA methylation in melanoma: biomarker and therapeutic opportunities. *Clin Epigenetics.* 2017;9(1):1-15.

doi:10.1186/s13148-017-0332-8

64. Chatterjee A, Stockwell PA, Ahn A, Rodger EJ, Leichter AL, Eccles MR. Genome-wide methylation sequencing of paired primary and metastatic cell lines identifies common DNA methylation changes and a role for EBF3 as a candidate epigenetic driver of melanoma metastasis. *Oncotarget*. 2017;8(4):6085-6101. doi:10.18632/oncotarget.14042
65. Wouters J, Vizoso M, Martinez-Cardus A, et al. Comprehensive DNA methylation study identifies novel progression-related and prognostic markers for cutaneous melanoma. *BMC Med*. 2017;15(1):1-16. doi:10.1186/s12916-017-0851-3
66. Martisova A, Holcakova J, Izadi N, Sebuyoya R, Hrstka R, Bartosik M. Dna methylation in solid tumors: Functions and methods of detection. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8). doi:10.3390/ijms22084247
67. Takata M, Lin J, Takayanagi S, et al. Genetic and epigenetic alterations in the differential diagnosis of malignant melanoma and spitzoid lesion. *Br J Dermatol*. 2007;156(6):1287-1294. doi:10.1111/j.1365-2133.2007.07924.x
68. Zaremba A, Jansen P, Murali R, et al. Genetic and methylation profiles distinguish benign, malignant and spitzoid melanocytic tumors. *Int J Cancer*. 2022;(May):1542-1554. doi:10.1002/ijc.34187
69. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (80- )*. 2001;294(5543):853-858. doi:10.1126/science.1064921
70. Latchana N, Ganju A, Howard JH, Carson WE. MicroRNA dysregulation in melanoma. *Surg Oncol*. 2016;25(3):184-189. doi:10.1016/j.suronc.2016.05.017
71. Latchana N, del Campo SEM, Grignol VP, et al. Classification of Indeterminate Melanocytic Lesions by MicroRNA Profiling. *Ann Surg Oncol*. 2017;24(2):347-354. doi:10.1245/s10434-016-5476-9
72. Latchana N, Regan K, Howard JH, et al. Global microRNA profiling for diagnostic appraisal of melanocytic Spitz tumors. *J Surg Res*. 2016;205(2):350-358. doi:10.1016/j.jss.2016.06.085
73. Broganelli P, Ribero S, Castagno I, et al. The large spectrum of Spitzoid tumors: a retrospective survival study. *G Ital di Dermatologia e Venereol*. 2019;154(3):315-320. doi:10.23736/S0392-0488.17.05575-4
74. Agnese DM, Abdessalam SF, Burak WE, et al. Cost-effectiveness of sentinel lymph node biopsy in thin melanomas. *Surgery*. 2003;134(4):542-547. doi:10.1016/S0039-6060(03)00275-7
75. Hengge UR, Wallerand A, Stutzki A, Kockel N. Cost-effectiveness of reduced follow-up in malignant melanoma. *JDDG - J Ger Soc Dermatology*. 2007;5(10):898-907. doi:10.1111/j.1610-0387.2007.06454.x
76. Stoffels I, Dissemond J, Schulz A, Hillen U, Schadendorf D, Klode J. Reliability and cost-effectiveness of complete lymph node dissection under tumescent local anaesthesia vs. general anaesthesia: A retrospective analysis in patients with malignant melanoma AJCC stage III. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2012;26(2):200-206. doi:10.1111/j.1468-3083.2011.04036.x

77. Kelley SW, Cockerell CJ. Sentinel lymph node biopsy as an adjunct to management of histologically difficult to diagnose melanocytic lesions: A proposal. *J Am Acad Dermatol*. 2000;42(3):527-530. doi:10.1016/S0190-9622(00)90236-6
78. Dieng M, Cust AE, Kasparian NA, Mann GJ, Morton RL. Economic evaluations of psychosocial intervention in cancer: a systematic review. *Psychooncology*. Published online 2016. doi:10.1002/pon.4075
79. Bares CB, Trask PC, Schwartz SM. An exercise in cost-effectiveness analysis: Treating emotional distress in melanoma patients. *J Clin Psychol Med Settings*. 2002;9(3).
80. Ludgate JL, Wright J, Stockwell PA, Morison IM, Eccles MR, Chatterjee A. A streamlined method for analysing genome-wide DNA methylation patterns from low amounts of FFPE DNA. *BMC Med Genomics*. 2017;10(1):1-10. doi:10.1186/s12920-017-0290-1
81. Ashktorab H, Shakoobi A, Zarnogi S, et al. Reduced Representation Bisulfite Sequencing determination of distinctive DNA hypermethylated genes in the progression to colon cancer in African Americans. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016(2102674). doi:10.1155/2016/2102674
82. Ashktorab H, Daremipouran M, Goel A, et al. DNA methylome profiling identifies novel methylated genes in African American patients with colorectal neoplasia. *Epigenetics*. 2014;9(4):503-512. doi:10.4161/epi.27644
83. Sun X, Yi J, Yang J, et al. An integrated epigenomic-transcriptomic landscape of lung cancer reveals novel methylation driver genes of diagnostic and therapeutic relevance. *Theranostics*. 2021;11(11):5346-5364. doi:10.7150/thno.58385
84. Yu X, Teng Y, Jiang X, Yuan H, Jiang W. Genome-Wide DNA Methylation Pattern of Cancer Stem Cells in Esophageal Cancer. *Technol Cancer Res Treat*. 2020;19(17):1-9. doi:10.1177/1533033820983793
85. Xu S, Sui J, Yang S, Liu Y, Wang Y, Liang G. Integrative analysis of competing endogenous RNA network focusing on long noncoding RNA associated with progression of cutaneous melanoma. *Cancer Med*. 2018;7(4):1019-1029. doi:10.1002/cam4.1315
86. Zahrah A, Muharam R, Satria Marwali ML, Ocktariyana, Deraya IE, Asmarinah. mRNA expression and DNA methylation level of the MMP-2 gene in peritoneal endometriosis. *J Pak Med Assoc*. 2021;71(2):S112-S115.
87. Castelo-Branco P, Choufani S, Mack S, et al. Methylation of the TERT promoter and risk stratification of childhood brain tumours: An integrative genomic and molecular study. *Lancet Oncol*. 2013;14(6):534-542. doi:10.1016/S1470-2045(13)70110-4
88. Weng X, Zhang H, Ye J, et al. Hypermethylated epidermal growth factor receptor (EGFR) promoter is associated with gastric cancer. *Sci Rep*. 2015;5(October 2014):1-10. doi:10.1038/srep10154
89. Pontén F, Jirstrom K, Uhlen M. The Human Protein Atlas - A tool for pathology. *J Pathol*. 2008;216(September):387-393.
90. Ngollo M, Lebert A, Daures M, et al. Global analysis of H3K27me3 as an epigenetic marker in prostate cancer progression. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1-8. doi:10.1186/s12885-017-3256-y
91. Zhang N, Shang M, Li H, et al. Dual Inhibition of H3K9me2 and H3K27me3 Promotes Tumor Cell Senescence without Triggering the Secretion of SASP. *Int J Mol Sci*.

- 2022;23(7). doi:10.3390/ijms23073911
92. Ko YS, Bae JA, Kim KY, et al. MYO1D binds with kinase domain of the EGFR family to anchor them to plasma membrane before their activation and contributes carcinogenesis. *Oncogene*. 2019;38(49):7416-7432. doi:10.1038/s41388-019-0954-8
  93. mu jiao, Yuan P, Luo J, et al. Upregulated SPAG6 promotes acute myeloid leukemia progression through MYO1D that regulates the EGFR family expression. *Blood Adv*. 2022;6(18). doi:10.1182/bloodadvances.2021006920
  94. Ko Y, Kang H, Bae JA, et al. New strategy for suppressing the growth of lung cancer cells harboring mutations in the ATP-binding region of EGFR by targeting the molecular motor MYO1D. *Clin Transl Med*. 2021;11(8):1-9. doi:10.1002/ctm2.515
  95. Rutten-Jacobs LCA, Rost NS. Emerging Insights from the Genetics of Cerebral Small Vessel Disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2020;1471(1):5-17.
  96. Ye F, Liang Y, Hu J, et al. DNA Methylation Modification Map to Predict Tumor Molecular Subtypes and Efficacy of Immunotherapy in Bladder Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(December):1-13. doi:10.3389/fcell.2021.760369
  97. Wojdacz TK, Dobrovic A, Hansen LL. Methylation-sensitive high-resolution melting. *Nat Protoc*. 2008;3(12):1903-1908. doi:10.1038/nprot.2008.191
  98. Wojdacz TK, Møller TH, Thestrup BB, Kristensen LS, Hansen LL. Limitations and advantages of MS-HRM and bisulfite sequencing for single locus methylation studies. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10(5):575-580. doi:10.1586/erm.10.46
  99. Luo S, Sepehr A, Tsao H. Spitz nevi and other Spitzoid lesions: Part II. Natural history and management. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(6):1087-1092. doi:10.1016/j.jaad.2011.06.045
  100. Sepehr A, Chao E, Trefrey B, et al. Long-term outcome of spitz-type melanocytic tumors. *Arch Dermatol*. 2011;147(10):1173-1179. doi:10.1001/archdermatol.2011.170
  101. Sand PDM. *MicroRNAs in Malignant Tumors of the Skin.*; 2016. doi:10.1007/978-3-658-12794-7
  102. Sánchez-Sendra B, Martínez-Ciarpaglini C, González-Muñoz JF, Murgui A, Terrádez L, Monteagudo C. Downregulation of intratumoral expression of miR-205, miR-200c and miR-125b in primary human cutaneous melanomas predicts shorter survival. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-14. doi:10.1038/s41598-018-35317-3
  103. Sánchez-Sendra B, González-Muñoz JF, Pérez-Debén S, Monteagudo C. The Prognostic Value of miR-125b, miR-200c and miR-205 in Primary Cutaneous Malignant Melanoma Is Independent of BRAF Mutational Status. *Cancers (Basel)*. 2022;14(6). doi:10.3390/cancers14061532
  104. Li P, He QY, Luo CQ, Qian LY. Circulating miR-221 expression level and prognosis of cutaneous malignant melanoma. *Med Sci Monit*. 2014;20:2472-2474. doi:10.12659/MSM.891327
  105. Mirzaei H, Gholamin S, Shahidsales S, et al. MicroRNAs as potential diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *Eur J Cancer*. 2016;53:25-32. doi:10.1016/j.ejca.2015.10.009
  106. Felicetti F, Errico MC, Bottero L, et al. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple

oncogenic mechanisms. *Cancer Res.* 2008;68(8):2745-2754. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2538

107. Linck L, Liebig J, Völler D, et al. MicroRNA-sequencing data analyzing melanoma development and progression. *Exp Mol Pathol.* 2018;105(3):371-379. doi:10.1016/j.yexmp.2018.11.001

