



Universitat de Lleida

Carcinoma basocelular: estudio del origen, transición epitelio mesénquima, inmunidad y regresión

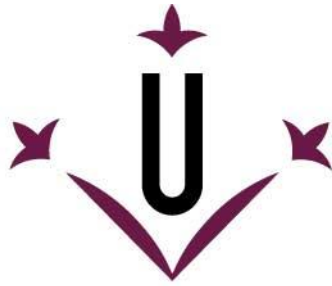
María Reyes García de la Fuente

<http://hdl.handle.net/10803/482234>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

TESIS DOCTORAL

**Carcinoma basocelular: estudio del origen,
transición epitelio mesénquima, inmunidad y
regresión**

María Reyes García de la Fuente

Memoria presentada para optar al grado de Doctora por la Universidad de
Lleida

Programa de Doctorado en salud

Directores

Eloi Garí Marsol

Josep Manel Casanova Seuma

Tutor

Eloi Garí Marsol

2017

A mi madre

No tenía miedo a las dificultades: lo que la asustaba era la obligación de tener que escoger un camino. Escoger un camino significaba abandonar otros.

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a todo el servicio de dermatología del Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida la formación recibida durante estos años, han sido muchas las vivencias compartidas y de cada uno de los miembros tengo un gran recuerdo. Agradecer especialmente a la Dra. Rosa M^a Martí que me haya invitado a participar en la docencia del grado de medicina, lo que me ha hecho una gran ilusión.

También me gustaría aprovechar para dar las gracias a los servicios de dermatología de los distintos hospitales que han contribuido en mi formación como especialista en dermatología. En primer lugar al servicio de dermatología del Hospital Universitario de Bellvitge donde ya como estudiante asistía de manera voluntaria a sus consultas y fue como me introduje en el mundo de la dermatología. También agradecer al servicio de dermatología del Hospital Universitario Vall d'Hebron que me acogieran en las sesiones del servicio, donde pude asistir libremente durante los 3 meses que duró mi rotación por el servicio de cirugía plástica, estética y reparadora y la unidad de quemados del mismo hospital. Del mismo modo, agradecer al servicio de dermatología del Hospital del Mar, en el que estuve rotando 2 meses, formándome en áreas específicas de mi especialidad.

Quiero agradecer a mis directores de tesis, al Dr. Josep Manel Casanova y al Dr. Eloi Garí el tiempo dedicado en este proyecto, su implicación y su gran ayuda. Al Dr. Josep Manel Casanova por su trabajo incesante, ideas y correcciones. Al Dr. Eloi Garí agradecerle el haberse involucrado en este proyecto, durante estos últimos años he tenido la oportunidad de trabajar a su lado y tenerle disponible para todas las dudas que me han ido surgiendo en el laboratorio.

Quisiera agradecer al servicio de anatomía patológica su colaboración en la elaboración de esta tesis doctoral, ya que han sido muchas las horas que he pasado con ellos en busca de laminillas y delante del microscopio. Concretamente me gustaría agradecer al Dr. Felip Vilardell su colaboración en el estudio anatomopatológico de las muestras, así como las amenas conversaciones, sobre variada temática, que siempre me han resultado muy interesantes. Agradecer muy especialmente a Maria Santacana

el enorme trabajo realizado en inmunohistoquímica, sus observaciones y comentarios me han resultado de gran ayuda.

También me gustaría agradecer a todos aquellos profesionales que han colaborado conmigo en este trabajo. A Joan Valls, que ha realizado un gran trabajo a nivel de estadística. A Maria Ruiz por explicarme el funcionamiento del “Biobanc” y poner a mi disposición dicho servicio. Al Dr. Verdaguer por sus grandes aportaciones sobre inmunología, sus comentarios y correcciones, gracias por haber estado siempre dispuesto a ayudarnos.

Al IRBLleida, centro acreditado por el Instituto de Salud Carlos III de Madrid, agradecerle la concesión de la beca post-MIR que me ha permitido dedicar a la investigación y al desarrollo de la presente tesis doctoral más allá de mi residencia en dermatología.

Agradecer muy especialmente a todo el grupo de ciclo celular del “IRBLleida” el haberme integrado en el laboratorio donde me he sentido muy a gusto. Gracias a cada uno de sus integrantes, destacar a Turi, Marta Rafel, Marta Guasch, Sonia Rius y Neus Colomina, pero especialmente agradecer a Tania Cemeli no solo por la ayuda e información recibida sobre la burocracia en los temas del doctorado sino por estar siempre dispuesta a ayudarme en todo lo que he necesitado. También acordarme de otros investigadores fuera del grupo de ciclo celular del “IRBLleida” como Isidre Felip e Irene Pradas con los que he compartido gratos momentos.

También quisiera dar las gracias a Luis Harguindey por las aportaciones a nivel de informática y por ayudarme en todo lo que ha estado a su alcance destacando la gran persona que es.

Agradecer a toda mi familia su apoyo, especialmente a mis padres, María del Carmen y Fulgencio, a ellos quisiera agradecerles el haberme hecho el regalo más grande que se le puede hacer a una persona, la vida. Gracias por la educación que me habéis dado pero sobretodo por los valores que me habéis inculcado, que han sido fundamentales en mi vida personal y profesional.

Agradecer a mi hermano Juan Pedro, a mi tía M^a Reyes y a mi madrina Mercedes lo mucho que han hecho por mí. También agradecer de una manera especial a mi tía Nieves y a mis abuelos todo lo que me han aportado directa o indirectamente.

Finalmente, me gustaría dar las gracias a los pacientes que han depositado su confianza en mí y han participado en gran parte de los estudios de la presente tesis doctoral.

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	3
RESÚMENES	7
RESUMEN	9
RESUM.....	13
SUMMARY	17
INTRODUCCIÓN.....	21
1. Aspectos generales del carcinoma basocelular	23
1.1. Carcinoma basocelular	23
1.2. Epidemiología del CBC.....	23
1.3. Factores de riesgo	25
1.3.1. Factores de riesgo ambientales.....	25
1.3.2. Factores de riesgo constitucionales	28
1.4. Formas clinicopatológicas del carcinoma basocelular	35
1.4.1. Carcinoma basocelular nodular.....	35
1.4.2. Carcinoma basocelular micronodular	36
1.4.3. Carcinoma basocelular superficial	36
1.4.4. Carcinoma basocelular pigmentado.....	37
1.4.5. Carcinoma basocelular morfeiforme o esclerodermiforme	38
1.4.6. Carcinoma basocelular infiltrante	39
1.4.7. Carcinoma basocelular quístico	39
1.4.8. El fibroepitelioma de Pinkus.....	39
1.4.9. Carcinoma basocelular adenoide.....	40
1.4.10. Carcinoma basocelular metatípico.....	40
1.4.11. Carcinoma basoescamoso.....	41
1.4.12. Carcinoma basocelular tipo “ulcus rodens”	41
1.4.13. Carcinoma basocelular tipo “ulcus terebrans”	42
1.5. Tratamiento del carcinoma basocelular.....	43
1.5.1. Cirugía escisional	43
1.5.2. Cirugía de Mohs.....	44
1.5.3. Crioterapia.....	45
1.5.4. Curetaje y electrocoagulación.....	45
1.5.5. Radioterapia	46

1.5.6.	Láser	46
1.5.7.	5-Fluorouracilo	47
1.5.8.	Imiquimod	47
1.5.9.	Terapia fotodinámica	47
1.5.10.	Vismodegib.....	48
2.	Origen celular del carcinoma basocelular	48
2.1.	Teoría de las células madre del folículo piloso.....	48
2.2.	Teoría del origen celular del carcinoma basocelular en el epitelio intermolecular.....	50
3.	Vías moleculares implicadas en el carcinoma basocelular	51
	HIPÓTESIS	57
	OBJETIVOS	61
	RESULTADOS	65
	CAPÍTULO 1	67
	Estudio del origen celular del carcinoma basocelular mediante la expresión de citoqueratinas	67
1.	Introducción	69
1.1.	Citoqueratinas como marcadores tumorales.....	71
1.2.	Estudio del perfil de expresión de citoqueratinas en una serie de CBC en función del grado de fotoexposición solar y localización anatómica.....	73
2.	Material y métodos.....	75
3.	Resultados	77
4.	Discusión	83
5.	Bibliografía:	87
	CAPÍTULO 2	95
	Estudio de la transición epitelio mesénquima en los carcinomas basocelulares	95
1.	Introducción: Estudio de la transición epitelio mesénquima en los carcinomas basocelulares.....	97
1.1.	Transición epitelio mesénquima	97
1.2.	Fibroblastos peritumorales	100
1.3.	Nestina, marcador de células madre y de TEM.....	101
2.	Material y métodos	102
2.1.	Cultivos celulares.....	102
2.2.	Inmunofluorescencia.....	107
2.3.	Inmunohistoquímica	107
2.4.	Western blot.....	108

3. Resultados	110
3.1. Cultivo celular de CBC.	110
3.2. Efecto de TGF- β en las células en cultivo procedentes de CBC.....	113
3.3. Expresión de nestina en el CBC	115
3.3.1. Determinación de nestina en cultivos celulares de CBC mediante inmunofluorescencia.....	115
3.3.2. Determinación de nestina en el CBC y el estroma tumoral mediante inmunohistoquímica	116
4. Discusión	119
5. Bibliografía	123
CAPÍTULO 3	129
Papel de la inmunidad en el carcinoma basocelular. Caracterización del infiltrado inmunoinflamatorio:	129
1. A. Introducción: Caracterización del infiltrado inmunoinflamatorio en el estudio de la regresión espontánea en el CBC	131
1.1. A. El sistema inmune	131
1.2. A. Respuesta inmune contra el cáncer	132
1.3. A. Respuesta inmune frente al CBC: estudio de la regresión espontánea	135
2. A. Material y métodos	136
3. A. Resultados	142
4. A. Discusión	148
1. B. Introducción: Caracterización del infiltrado inmunoinflamatorio en la respuesta al tratamiento con ingenol mebutato.....	152
1.1. B. Papel de los tratamientos inmunomoduladores en el carcinoma basocelular.	152
1.2. B. Evidencias experimentales del papel de la inmunidad en el tratamiento médico del CBC	153
1.3. B. Estudios de ingenol mebutato y CBC	155
2. B. Material y métodos	156
2.1. B. Reclutamiento y recogida de muestras.....	156
3. B. Resultados	159
3.1. B. Eficacia y seguridad de IM gel al 0.05% bajo oclusión en el CBC	159
3.2. B. Estudio histológico secuencial.....	161
3.3. B. Estudio inmunohistoquímico	162
4. B. Discusión	169
5. A.B. Bibliografía	173
CONCLUSIONES	179

BIBLIOGRAFÍA.....	185
ANEXO	195

ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
AP-1	<i>activating protein-1</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ARN	ácido ribonucleico
ATP	<i>adenosine triphosphate</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2 (gene)</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2(protein)</i>
C10orf11	<i>chromosome 10 open reading frame 11</i>
CASP3	<i>caspase 3</i>
CBC	carcinoma basocelular
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CK	citoqueratina
CTCs	células de tumores circulantes.
CTLA4	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen 4</i>
CXCL9	<i>motif chemokine ligand 9</i>
CXCL10	<i>motif chemokine ligand 10</i>
CXCL11	<i>motif chemokine ligand 11</i>
D α M594	<i>donkey α mouse 594 λ</i>
Dh	<i>desert</i>
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGR	<i>epidermal growth factor</i>
EMA+/Ber-EP4-	<i>epithelial membrane antigen/ epithelial specific antigen</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FoxP3	<i>forkhead box P3</i>
5-FU	5-fluorouracilo
GLI	<i>glioma</i>
GRB2	<i>growth factor receptor binding protein 2</i>
GrzB	<i>granzymeB</i>
GSK3 β	<i>glycogen synthase kinase 3 β</i>
GTP	<i>guanosine triphosphate</i>
hFU	<i>fused</i>
HUAV	Hospital Universitario Arnau de Vilanova
IFN γ	<i>interferon γ</i>
Ih	<i>Indian</i>
IL-12	<i>interleucina- 12</i>
ILK	<i>integrin-linked kinase</i>
IM	ingenol mebutato
JUN/ AP-1	<i>jun proto-oncogene /activator protein 1 transcription factor subunit</i>
Ief/TCF	<i>lymphoid enhancer factor/ T-cell factor</i>
Lgr5	<i>leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5</i>
Lgr6	<i>leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6</i>
Linfocitos NK	<i>linfocitos Natural killer</i>

Lrig1	<i>leucine-rich repeats and immunoglobulin-like domains protein 1</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MAPKKK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MYC	<i>myelocytomatosis oncogene</i>
NKT	<i>natural killer T cell</i>
NT	<i>natural killers</i>
OCA	<i>oculocutaneous albinism</i>
p53	<i>cellular tumor antigen (protein)</i>
P53	<i>cellular tumor antigen (gene)</i>
PBST	<i>phosphate-buffered saline with 0.1% Tween20</i>
PD-1	<i>programmed cell death protein 1</i>
PDGF α	<i>platelet-derived growth factor alpha</i>
PMN	<i>polimorfonucleares</i>
Ptch1	<i>patched1 (protein)</i>
PTCH1	<i>patched1 (gene)</i>
Ptch1	<i>patched 1 (protein)</i>
PTCH1	<i>patch-1 (gene)</i>
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
rap1	<i>Ras-proximate-1</i>
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
RP	<i>regresión parcial</i>
RT	<i>regresión total</i>
RUV	<i>radiación ultravioleta</i>
SD	<i>standard deviation</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Sh	<i>sonic</i>
Shh	<i>vía Sonic hedgehog</i>
SLC24A5	<i>solute carrier family 24 member 5</i>
SLC45A2	<i>solute carrier family 45 member 2</i>
Smad	<i>small mother against decapentaplegic</i>
Smo	<i>smoothened (protein)</i>
SMO	<i>smoothened (gene)</i>
TCF	<i>ternary complex factor</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TEM	<i>transición epitelio mesénquima</i>
TEMED	<i>tetramethylethylenediamine</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
Th1	<i>helper 1 T lymphocyte</i>
Th17	<i>helper 17 T lymphocyte</i>
Th2	<i>helper 2 T lymphocyte</i>
TIA1	<i>T-cell intracellular antigen 1</i>
TIL	<i>tumor infiltrating lymphocytes</i>

TLR-7	<i>toll like receptor nº 7</i>
TNF- α	<i>tumoral necrosis factor α</i>
TNF- β	<i>tumoral necrosis factor β</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand</i>
Treg	<i>regulatory T cells</i>
Tris-HCL	<i>tris (hydroxymethyl) aminomethan-hydrogen chloride</i>
TYR	<i>tyrosinase</i>
TYRP1	<i>tyrosinase related protein 1</i>
UVA	<i>ultraviolet A</i>
UVB	<i>ultraviolet B</i>
UVC	<i>ultraviolet C</i>
VIH	<i>virus de la inmunodeficiencia humana</i>
Wnt	<i>wingless Integration</i>
XP	<i>xeroderma pigmentosum</i>

RESÚMENES

RESUMEN

En este trabajo de tesis hemos estudiado y caracterizado distintos aspectos relacionados con la fisiopatología del carcinoma basocelular (CBC). El CBC se trata de la neoplasia maligna más frecuente de la especie humana, si bien este dato se encuentra muchas veces obviado en los estudios epidemiológicos de cáncer al tratarse de un tumor que produce muy baja mortalidad. El carcinoma basocelular es un tumor invasivo pero de crecimiento lento y raramente deriva en metástasis. El tratamiento de elección sigue siendo hoy en día el tratamiento quirúrgico y en algunos casos se utilizan terapias sistémicas como vismodegib, una molécula capaz de bloquear la principal vía molecular involucrada en la fisiopatogénesis del carcinoma basocelular, la vía Sonic hedgehog (Shh). Es importante destacar que la frecuencia de carcinoma basocelular es muy alta y es un problema de coste sanitario muy elevado en muchos países, por ejemplo en los países del arco mediterráneo o en Oceanía.

A pesar de la altísima prevalencia del carcinoma basocelular a nivel mundial, todavía hay muchas cosas que se desconocen con certeza, por ejemplo su origen celular. La teoría más aceptada sobre el carcinoma basocelular sitúa su origen en las células madre del folículo piloso, por lo que sería de esperar que el carcinoma basocelular no aparezca en áreas desprovistas de folículos pilosos, como las mucosas o semimucosas. Sin embargo, aunque es cierto que el carcinoma basocelular suele encontrarse en zonas donde existen folículos pilosos, como constituye la mayor parte de la superficie cutánea, en esta tesis hemos descrito varios casos en el que el carcinoma basocelular nace en áreas desprovistas de pelo como la semimucosa vulvar. A partir de estos primeros estudios hemos propuesto la existencia de un origen celular alternativo al folículo piloso. Con el objetivo de estudiar el origen celular del carcinoma basocelular, en este trabajo hemos llevado a cabo un estudio inédito en el que hemos determinado la expresión de diferentes citoqueratinas en el carcinoma basocelular en función de su localización anatómica, grado de exposición solar y presencia de folículos pilosos. Los distintos grupos celulares en órganos y tejidos presentan un patrón específico de expresión de citoqueratinas que en muchos casos se mantiene después de la transformación tumoral, lo que permite establecer en que nicho celular se origina el tumor. Sorprendentemente en este estudio observamos que la citoqueratina 7,

presente en epitelio simple con diferenciación glandular, se encontraba altamente expresada en aquellos carcinomas basocelulares situados en semimucosa vulvar y áreas donde existían abundantes glándulas sebo-apocrinas como en las axilas. A partir de estos resultados proponemos que el carcinoma basocelular pueda también originarse a partir de primordios glandulares alternativamente a los folículos pilosos.

En muchos carcinomas su capacidad invasiva se relaciona con procesos de transición de epitelio a mesénquima (TEM). Distintos trabajos muestran la expresión de marcadores de TEM en CBC lo que coincide con la fuerte capacidad invasiva de este tumor, aunque no sea capaz de diseminarse por metástasis. Como parte de esta tesis, hemos estudiado la TEM en cultivos primarios de CBC. Nuestros resultados muestran que en los cultivos de CBC hay activación de la vía de TGF- β y además aparecen un porcentaje elevado de células con morfología fibroblastoide. Estos resultados también coinciden con la posibilidad de activación de la TEM en CBC, pero no son concluyentes ya que la activación de marcadores podría ser debida a los defectos en la vía Shh.

Otro tema interesante en oncología es cómo algunos tumores son capaces de regresar total o parcialmente de manera espontánea, básicamente debido al papel que el sistema inmune juega en combatir el cáncer. En el carcinoma basocelular superficial se observa con cierta frecuencia, como existe regresión central y un borde activo de progresión. En esta tesis hemos estudiado mediante inmunohistoquímica la expresión de diferentes marcadores de la inmunidad innata y adaptativa en la zona de regresión tumoral y del borde activo tumoral. Nuestros datos sugieren una respuesta adaptativa en la zona de regresión tumoral que estaría inhibida en los bordes activos del tumor. El CBC superficial, al tratarse de un tumor de fácil acceso, podría utilizarse como un modelo tumoral para hacer estudios de regresión que permita darnos información sobre este proceso y extrapolar resultados a otros tumores.

Finalmente como último apartado de esta tesis mostramos resultados sobre la eficacia y el mecanismo de acción de ingenol mebutato para el tratamiento del carcinoma basocelular. Observamos que ingenol mebutato consiguió hasta un 80% de curación en los carcinomas basocelulares superficiales de nuestra serie, destacando la importante reacción inflamatoria que presentaron gran parte de los pacientes, con eritema,

ampollas y erosiones que sobrepasaban la zona de aplicación del producto, pero en ningún caso obtuvimos efectos secundarios a nivel sistémico. El estudio del infiltrado inflamatorio sugiere que hay una respuesta innata debida a la inflamación.

Fruto de estos trabajos hemos logrado publicar dos artículos que se encuentran en el anexo de la tesis, y un tercer artículo está siendo revisado. He publicado un capítulo de libro en relación con la temática de la tesis doctoral. Además otros tumores cutáneos que he tenido ocasión de revisar durante mi residencia y publicar también figuran en el anexo de la tesis.

RESUM

En aquest treball de tesi hem estudiat i caracteritzat diferents aspectes relacionats amb la fisiopatologia del carcinoma basocel·lular (CBC). El CBC es tracta de la neoplàsia maligna més freqüent de l'espècie humana, tot i que aquesta dada es troba moltes vegades obviada en els estudis epidemiològics de càncer al tractar-se d'un tumor que produeix molt baixa mortalitat. El carcinoma basocel·lular és un tumor invasiu però de creixement lent i rarament deriva en metàstasi. El tractament d'elecció segueix sent avui en dia el tractament quirúrgic i en alguns casos s'utilitzen teràpies sistèmiques com vismodegib, una molècula capaç de bloquejar la principal via molecular implicada en la fisiopatogènesis del carcinoma basocel·lular, la via Sonic hedgehog (Shh). És important destacar que la freqüència de carcinoma basocel·lular és molt alta i és un problema de cost sanitari molt elevat en molts països, per exemple en els països de l'arc mediterrani o en Oceania.

Tot i l'altíssima prevalença del carcinoma basocel·lular a nivell mundial, encara hi ha moltes coses que es desconeixen amb certesa, per exemple el seu origen cel·lular. La teoria més acceptada sobre el carcinoma basocel·lular situa el seu origen en les cèl·lules mare del fol·licle pilós, pel que seria d'esperar que el carcinoma basocel·lular no aparegui en àrees desproveïdes de fol·licles pilosos, com les mucoses o semimucoses. No obstant, tot i que és cert que el carcinoma basocel·lular sol trobar-se en zones on hi ha fol·licles pilosos, com constitueix la major part de la superfície cutània, en aquesta tesi hem descrit diversos casos en què el carcinoma basocel·lular neix en àrees desproveïdes de pèl com la semimucosa vulvar. A partir d'aquests primers estudis hem proposat l'existència d'un origen cel·lular alternatiu al fol·licle pilós. Amb l'objectiu d'estudiar l'origen cel·lular del carcinoma basocel·lular, en aquest treball hem dut a terme un estudi inèdit en el qual hem determinat l'expressió de diferents citoqueratines en el carcinoma basocel·lular en funció de la seva localització anatòmica, grau d'exposició solar i presència de fol·licles pilosos. Els diferents grups cel·lulars en òrgans i teixits presenten un patró específic d'expressió de citoqueratines que en molts casos es manté després de la transformació tumoral, el que permet establir en quin nínxol cel·lular s'origina el tumor. Sorprenentment en aquest estudi observem que la citoqueratina 7, present en l'epiteli simple amb diferenciació

glandular, es trobava altament expressada en aquells carcinomes basocel·lulars situats en semimucosa vulvar i àrees on existia abundants glàndules sebo-apocrines com en les aixelles. A partir d'aquests resultats proposem que el carcinoma basocel·lular pugui també originar-se a partir de primordis glandulars alternativament als fol·licles pilosos.

En molts carcinomes la seva capacitat invasiva es relaciona amb processos de transició d'epiteli a mesènquima (TEM). Diferents treballs mostren l'expressió de marcadors de TEM en CBC el que coincideix amb la forta capacitat invasiva d'aquest tumor, encara que no sigui capaç de disseminar-se per metàstasi. Com a part d'aquesta tesi, hem estudiat la TEM en cultius primaris de CBC. Els nostres resultats mostren que en els cultius de CBC hi ha activació de la via d'TGF- β i a més apareixen un percentatge elevat de cèl·lules amb morfologia fibroblastoide. Aquests resultats també coincideixen amb la possibilitat d'activació de la TEM en CBC, però no són concloents ja que l'activació de marcadors podria ser deguda als defectes en la via Shh.

Un altre tema interessant en oncologia és com alguns tumors són capaços de presentar regressió tumoral total o parcial de manera espontània, bàsicament a causa del paper que el sistema immune té en combatre el càncer. En el carcinoma basocel·lular superficial s'observa amb certa freqüència, com existeix regressió central i una vora activa de progressió. En aquesta tesi hem estudiat mitjançant immunohistoquímica l'expressió de diferents marcadors de la immunitat innata i adaptativa a la zona de regressió tumoral i de la vora activa tumoral. Les nostres dades suggereixen una resposta adaptativa a la zona de regressió tumoral que estaria inhibida a les vores actives del tumor. El CBC superficial, es tracta d'un tumor de fàcil accés, pensem que podria utilitzar-se com un model tumoral per fer estudis de regressió que permetin donar-nos informació sobre aquest procés i extrapolar resultats a altres tumors.

Finalment com a últim apartat d'aquesta tesi mostrem resultats sobre l'eficàcia i el mecanisme d'acció de ingenol mebutato per al tractament del carcinoma basocel·lular. Observem que ingenol mebutato va aconseguir fins a un 80% de curació en els carcinomes basocel·lulars superficials de la nostra sèrie, destacant la important reacció inflamatòria que van presentar gran part dels pacients, amb eritema, ampolles i

erosions que sobrepassaven la zona d'aplicació del producte, però en cap cas vam obtenir efectes secundaris a nivell sistèmic. L'estudi de l'infiltrat inflamatori suggereix que hi ha una resposta innata deguda a la inflamació.

Fruit d'aquests treballs hem aconseguit publicar dos articles que es troben a l'annex de la tesi, i un tercer article està sent revisat. He publicat un capítol de llibre en relació amb la temàtica de la tesi doctoral. A més altres tumors cutanis que he tingut ocasió de revisar durant la meva residència i publicar també figuren a l'annex de la tesi.

SUMMARY

In this doctoral thesis we have studied and characterized different aspects related to the pathophysiology of basal cell carcinoma (BCC). BCC is the most frequent malignant neoplasm in humans, although this piece of information is often overlooked in epidemiological studies of cancer due to its low mortality rate. BCC is an invasive but slow-growing tumor that rarely results in metastasis. The standard treatment nowadays continues to be surgical excision while in some cases, systemic therapies such as vismodegib, a molecule capable of blocking the main molecular pathway involved in the pathophysiology of BCC, the Sonic hedgehog (Shh) pathway, are used. It is important to note that BCC frequency is very high and has a high cost for the health system in many countries, for example in the Mediterranean countries or in Oceania.

Despite the high prevalence of BCC worldwide, there are still many not well known aspects, for instance the BCC cellular origin. The most accepted theory is that the origin of BCC is in the stem cells of hair follicle, so it would be expected that BCC should not appear in non-hairy areas, such as mucous or semi-mucous. However, although it is true that BCC tends to be found in areas where hair follicles exist, as is the case with almost all the skin surface, in this work we have described several cases of BCC located in non-hairy areas such as the vulvar semimucosa. After this initial data, we have proposed a new cellular origin alternative to that of the hair follicle. In order to study the cellular origin of BCC, in this work we have carried out a novel study in which we have determined the cytokeratin profile of basal cell carcinomas depending on the degree of sun-exposure and on the anatomical localization and the presence of hair follicles. The different cell groups in organs and tissues have a specific pattern of expression of cytokeratins that in many cases is maintained after the tumor transformation, for this reason the cytokeratin profile gives clues to establish in which cellular niche the tumor is originated. Surprisingly, in this study, we observed that cytokeratin 7, present in simple epithelium with glandular differentiation, was highly expressed in basal cell carcinomas located in anatomical areas where sebaceous-apocrine glands are very rich such as the axillae and the vulvar semimucosa. Based on

these results, we propose the sebaceous-apocrine unit for BCC cellular origin as an alternative to the stem cells of hair follicles.

In most carcinomas the invasiveness is associated to their ability to trigger epithelial mesenchymal transition (EMT). Different studies show the presence of EMT markers in BCC according to the strong invasive capacity of this tumor, although it is not capable of spreading by metastasis. As part of this work, we have studied EMT in primary BCC cultures. Our results show that BCC cells have induction of the TGF- β pathway and in addition, there is a high percentage of cells with fibroblastoid morphology. These results also agree with the possibility of activation of EMT in BCC but are inconclusive since the activation of markers could be due to defects in the Shh pathway.

Another interesting topic in oncology is to know how certain tumors can spontaneously undergo either total or partial regression basically by triggering specific immune responses. In superficial basal cell carcinomas spontaneous regression is often observed in the center area while in the active edge we can observe progression. In this work, we have studied by immunohistochemistry different markers representative of innate and adaptive immunity in the area of tumor regression and the tumor active edge. Our data suggest an adaptive response in the area of tumor regression that would be inhibited at the active edges of the tumor. Being an easily accessible tumor, superficial BCC could be used as a tumor model to make regression studies that would provide us with information about this process and extrapolate the results to other tumors.

Finally, as a final section of this thesis, we show results on the efficacy and mechanism of action of mebutate ingenol for the treatment of BCC. We observed that mebutate ingenol achieved up to 80% cure in our series of superficial BCC, highlighting the important inflammatory reaction that a great part of the patients showed, with erythema, blisters and erosions that surpassed the area of application of the product. However, there were no reported side effects at a systemic level. The study of the inflammatory infiltrate suggests that there is an innate response due to inflammation.

As a result of these works I have published two papers which can be found in the annex to this thesis, and a third article is under revision. I have published a book

chapter to the subject of this doctoral thesis. In addition, other skin tumors that I have had the opportunity to review and publish during my residency as a dermatologist also appear in the annex to this doctoral thesis.

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales del carcinoma basocelular

1.1. Carcinoma basocelular

El carcinoma basocelular (CBC) se trata del tumor maligno más frecuente en caucásicos, por lo que constituye un problema médico con un alto factor de impacto en salud pública¹. El incremento de la incidencia y la prevalencia se cree que es debido a los cambios en los estilos de vida producidos durante los últimos 50 años, consistentes en una mayor exposición solar y los deportes al aire libre, la reducción de la capa de ozono y la mayor longevidad de la población².

Afortunadamente, su mortalidad es muy baja, ya que las metástasis son excepcionales y existe buena respuesta al tratamiento³. El hecho de aparecer en la piel, a diferencia de otros cánceres, hace que sea visible por parte del paciente y que la mayor parte consulte en las fases iniciales, pudiendo ser tributario a terapias que aseguren su erradicabilidad. Sin embargo, en aquellos pacientes que presentan formas más agresivas de CBC o formas avanzadas, la cirugía debe ser más agresiva pudiendo resultar mutilante⁴. Las escasas muertes originadas por dicho tumor suelen ser por afectación de estructuras vitales que se afectan por contigüidad, como la invasión del sistema nervioso central o, excepcionalmente, por metástasis.

1.2. Epidemiología del CBC

El cáncer de piel se viene clasificando clásicamente en melanoma y en cáncer cutáneo no melanoma (CCNM), que engloba fundamentalmente el carcinoma basocelular y el carcinoma escamoso como los dos más prevalentes, aunque existen muchos más que representan un porcentaje minoritario frente a los anteriores.

Respecto al CCNM, su alta incidencia en relación con el resto de tumores y las dificultades en su cuantificación hacen que no sean habitualmente incluidos en los diferentes registros oncológicos⁵. El carcinoma basocelular es el tipo de cáncer más frecuente, teniendo una tasa de incidencia global en España de 113.05/100000 personas (contando un solo tumor por persona y diagnóstico histológico) para los estudios que utilizan la metodología de los registros de cáncer⁵⁻⁸. Pero con frecuencia un paciente presenta múltiples CBC, y en algunos casos se trata sin confirmación histológica, no registrándose por los medios oficiales (aproximadamente la

infraestimación de los registros es del 50% del total de CBC, según el estudio citado). Los registros en el Reino Unido estiman 98/100000 casos al año en 2006⁹. Si lo comparamos con Australia 884/100000 habitantes¹⁰ se observa una diferencia abismal en la incidencia, probablemente por el fototipo de piel clara de sus habitantes, la alta irradiación UV y la reducción de la capa de ozono detectada en la proximidad de dicha área.

Como ya hemos comentado, a pesar de que raramente el CBC acabe en muerte o enfermedad metastásica, puede provocar morbilidad importante dado su crecimiento invasivo y destrucción del tejido contiguo¹¹.

La variante nodular es el subtipo clínico más común, constituyendo del 50 al 79% del total de CBC. La variante superficial, es la segunda en frecuencia, llegando a constituir hasta el 15% de los casos. El CBC nodular se localiza preferentemente en la cara y el CBC superficial es típico del tronco. El diagnóstico definitivo de CBC lo aportará la biopsia de la lesión, realizada por múltiples técnicas: biopsia en sacabocados "*punch*", curetaje, afeitado o exéresis en huso de la lesión.

En relación con el abordaje del CBC, el objetivo del tratamiento es la eliminación completa del tumor junto con la máxima preservación cosmética y funcional de la zona tratada. La elección del tratamiento dependerá de diversos factores: el riesgo de recidiva de la lesión, la localización, la extensión, la preservación cosmética y las preferencias del paciente, una vez informado de las ventajas y riesgos de cada una de las opciones. Aunque las características de cada opción terapéutica se explican en el apartado de tratamiento, se puede explicar de manera general que los CBC de bajo riesgo de recurrencia se suelen tratar con curetaje y electrocoagulación o escisión quirúrgica. La cirugía de Mohs, microscópicamente controlada, es el tratamiento con mayor tasa de curación del CBC, y es de elección en los CBC de alto riesgo de recurrencia como el morfeiforme o en caso de CBC localizados en zonas de riesgo (canto interno de los ojos, zona perioral, región periauricular). Otros tratamientos efectivos serían la criocirugía y la terapia fotodinámica, especialmente en CBC superficiales, o la radioterapia y vismodegib en casos de CBC irresecables quirúrgicamente o en los casos metastásicos. Asimismo, se pueden utilizar tratamientos con quimioterápicos tópicos como el 5-fluorouracilo e inmunomoduladores como el imiquimod. Recientemente se ha comercializado un

nuevo citotóxico, ingenol mebutato, que no está aprobado para el tratamiento de los carcinomas basocelulares sino para las queratosis actínicas, pero como presentamos en el tercer capítulo de la presente tesis, hemos realizado un trabajo donde vemos buena respuesta al tratamiento con ingenol mebutato tópico en CBC y cuyos resultados se detallan en ese mismo capítulo.

1.3. Factores de riesgo

Los factores de riesgo pueden dividirse en exógenos como constituyen los factores ambientales y los endógenos como constituyen las genodermatosis.

1.3.1. Factores de riesgo ambientales

Radiación ultravioleta

La radiación ultravioleta (RUV) es el factor carcinogénico ambiental más importante en el carcinoma basocelular, al igual que en el resto de cánceres cutáneos. Si bien los cánceres de piel que tienen una relación más directa con la RUV son el carcinoma escamoso y el melanoma, sobretodo el subtipo conocido como léntigo maligno melanoma¹².

La RUV se divide en tres clases en función de la longitud de onda: A, B y C. Los UVA son los UV menos energéticos con una longitud de onda de 315 a 400 nm, los UVB presentan una energía intermedia con una longitud de onda de 280 a 315 nm y los UVC son los más energéticos con una longitud de onda de 100 a 280nm, figura 1.

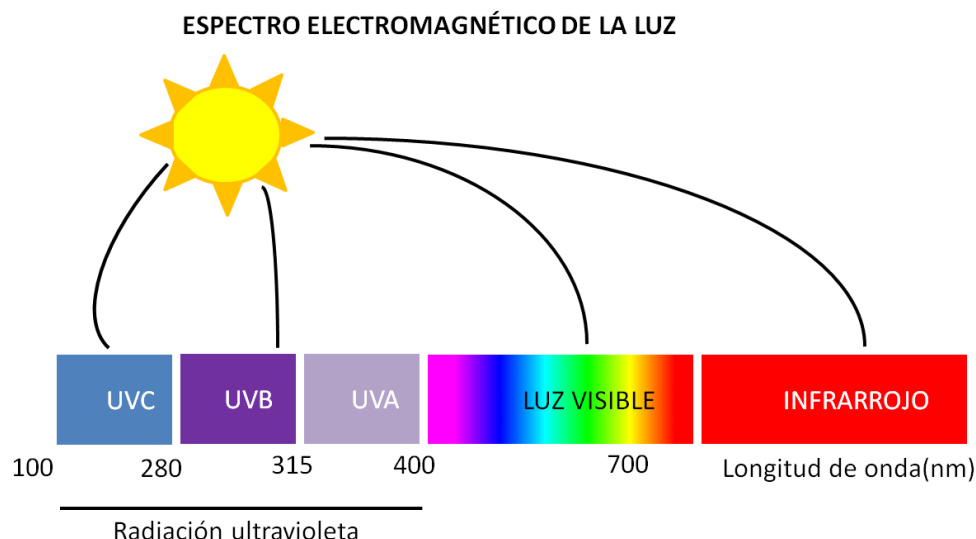


Figura 1. Obsérvese que la radiación ultravioleta presenta una longitud de onda más pequeña que la luz visible, lo que quiere decir que es más energética.

Sin embargo, los UVC no llegan a la corteza terrestre, al ser absorbidos por la capa de ozono no interaccionando con la piel. Los UVA y los UVB alcanzan la superficie terrestre y por tanto son capaces de interactuar con nuestra piel, donde ejercen sus efectos. Entre los efectos beneficiosos encontramos la síntesis de vitamina D como consecuencia de someter la piel a los UVB. Los UVB no son capaces de atravesar el cristal a diferencia de los UVA. Por otro lado, los UVB son los responsables del eritema y la quemadura solar inmediatas y asimismo de las *sunburn cells* (queratinocitos espinosos apoptóticos) y, a largo plazo, el principal causante de cáncer cutáneo, aunque los UVA también actuarían como cocarcinógeno y además serían los responsables del fotoenvejecimiento cutáneo. Se cree que las quemaduras solares intermitentes en la infancia y la adolescencia son uno de los factores determinantes para el desarrollo de CBC y melanoma. El adelgazamiento de la capa de ozono, principal filtro de los UVB, explicaría en parte el aumento de la incidencia de cáncer de piel¹³.

Radiación ionizante

La radiación ionizante se ha relacionado con el desarrollo de CBC, que aparece unos 20 a 30 años después de haberse sometido a la terapia, aunque se han descrito latencias más cortas. Los CBC aparecen en la piel que se ha sometido a la radiación, ya que la radiación produciría daños en el material genético de los queratinocitos. Esto se traduciría en la formación de CBC, bien porque se altera propiamente la vía molecular

implicada, bien porque se alteran los genes implicados en la síntesis de proteínas que reparan el genoma, lo que facilitaría el desarrollo de cáncer de piel^{14, 15}.

Exposición al arsénico

El arsénico, además de producir cáncer cutáneo como el carcinoma escamoso (CEC) o también conocido como carcinoma espinocelular, es capaz también de originar CBC¹⁶.

Las principales fuentes de exposición al arsénico son las aguas subterráneas contaminadas junto a los cultivos regados con dichas aguas y los animales alimentados con cultivos contaminados aunque en menor grado. También está presente en el tabaco y se utiliza en diferentes procesos industriales como en el tratamiento de la madera, el curtido de pieles en la industria peletera, en la fabricación de plaguicidas y otros productos.

Inmunosupresión

La inmunosupresión se puede clasificar en primaria y secundaria. Se considerará primaria cuando se trate de una inmunodeficiencia congénita, y secundaria cuando sea adquirida por infecciones como el VIH o por un tratamiento inmunosupresor, siendo estas mucho más frecuentes. Los pacientes trasplantados, bajo tratamiento inmunosupresor, tienen un riesgo más elevado de padecer cáncer de piel. El 95% de las neoplasias malignas desarrolladas en pacientes trasplantados corresponden a CCNM, principalmente carcinoma escamoso y CBC. El carcinoma escamoso puede aumentar de 65 a 250 veces respecto a la población general mientras que el CBC también estaría aumentado hasta 10 veces. De este modo la relación carcinoma basocelular/epidermoide de 4:2 que se encuentra en población general se invierte en los pacientes trasplantados^{17, 18}. En pacientes con enfermedades autoinmunes tratados con inmunosupresores y los pacientes que presentan una inmunosupresión constitucional también habría un aumento de la incidencia de CBC aunque la epidemiología no está tan bien estudiada como en el caso de los pacientes trasplantados.

Úlceras, quemaduras y cicatrices (daño crónico).

La piel sometida a un daño crónico tiene mayor riesgo de desarrollar un carcinoma escamoso, lo que se conoce como úlcera de Marjolin. Sin embargo, aunque no sea tan frecuente como el carcinoma escamoso, también se han visto casos de carcinoma

basocelular sobre zonas donde se había producido una quemadura o una úlcera¹⁹, figura 2.



Figura 2. CBC infiltrante en brazo en antigua cicatriz de vacuna.

1.3.2. Factores de riesgo constitucionales

Fototipo

El fototipo condiciona la susceptibilidad del individuo a la RUV. Los individuos con fototipos bajos, piel clara con cabellos y ojos claros, son más vulnerables a los daños del sol y por tanto tienen mayor riesgo de desarrollar un cáncer de piel incluyendo el CBC²⁰. Los fototipos I y II de Fitzpatrick, se caracterizan por su escasa capacidad de broncearse y sufrir quemaduras solares ante mínimas fotoexposiciones. Entre los factores de riesgo constitucionales este sería uno de los más importantes.

Tumores benignos

Existen algunos tumores benignos y hamartomas sobre los cuales puede asentar un CBC. Esto puede pasar con el nevus sebáceo de Jadassohn, que se presenta como una placa congénita ligeramente amarilla o anaranjada, de superficie papilomatosa con predilección a ubicarse en el cuero cabelludo. Este hamartoma cutáneo suele adquirir una superficie verrucosa al llegar a la adolescencia. Sobre la misma pueden desarrollarse ciertos tumores benignos derivados del folículo pilosebáceo, como el tricoblastoma, o de la glándula sudorípara, como el siringocistoadenoma papilífero²¹. También pueden dar lugar a tumores malignos como el CBC²¹ o el carcinoma

espinocelular²². La incidencia de CBC sobre el nevus de Jadassohn se calcula que pueda llegar a ser de hasta el 5% según las series²³.

Genodermatosis

Varias genodermatosis presentan un riesgo aumentado de desarrollar CBC^{24, 25}, a continuación, revisamos las más importantes:

-Xeroderma pigmentosum (XP): Se trata de una genodermatosis de herencia autosómica recesiva. Existen 8 variedades de XP, categorizadas desde la letra "A" hasta la "G", y una variedad diferenciada del resto categorizada por la letra "V". En todas las formas de XP existe una alteración en los mecanismos de reparación del ADN. Las formas XPA-G están causadas por mutaciones en los genes involucrados en el sistema de reparación por escisión de nucleótidos, mientras que la forma XPV presenta mutaciones en la ADN polimerasa, participando en la reparación del ADN por un mecanismo llamado síntesis de translesión²⁶. El principal carcinógeno al que está sometido nuestro organismo en los primeros años de vida es la RUV. Las mutaciones en el ADN causadas por la radiación solar no son reparadas y, por tanto, se van acumulando y aumenta el riesgo de desarrollar CBC, carcinoma escamoso (CEC) y melanoma²⁷. Es importante que estos pacientes se protejan del sol ya desde pequeños para evitar daños en el ADN que pueda condicionar la aparición de cáncer de piel.

-Albinismo oculocutáneo (OCA): Esta enfermedad se produce por mutaciones en los genes de la vía de la síntesis de melanina, principalmente OCA I y II²⁸. Están causados por mutaciones en el gen de la tirosinasa (TYR), y comportaría la pérdida parcial o total de la actividad catalítica de la tirosinasa. Se reduce la síntesis de melanina, por lo que la piel esta desprotegida ante el sol y aumenta la incidencia de cáncer de piel²⁹, figura 3.



Figura 3. Albinismo.

-OCA1 o tirosinasa negativo: Se trata de la forma más frecuente de albinismo. Siendo la forma de OCA que afecta principalmente a la población europea y americana. Está producido por mutaciones o alteraciones en el gen TYR, situado en el brazo largo del cromosoma 11 humano y conlleva una pérdida total de la enzima tirosinasa. También existe una forma más leve en la que existen mutaciones puntuales en el gen, llamada tipo 1b para así diferenciarla de la forma más severa que sería la 1a.

-OCA2 o tirosinasa positivo: Se trata de la forma más frecuente de albinismo en la población africana. Está producido por mutaciones o alteraciones en el gen OCA2, localizado en el brazo largo del cromosoma 15, 15q. Presenta cierta actividad tirosinasa lo que se traduce en una pequeña producción de melanina, figura 4.

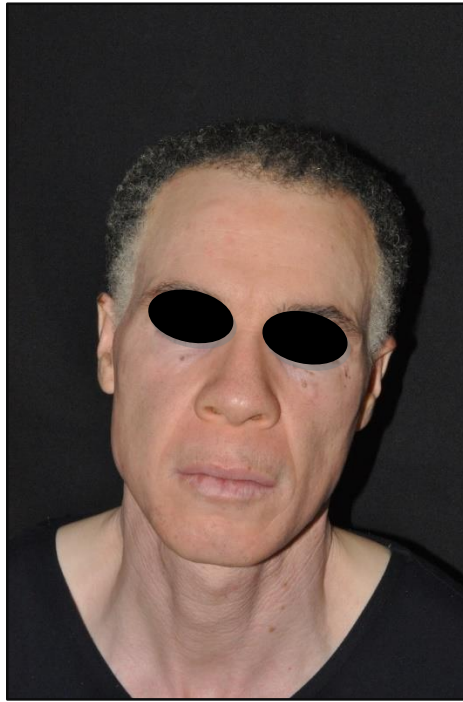


Figura 4. Albinismo oculocutáneo tipo 2.

-OCA3: Se asocia a mutaciones o alteraciones del gen de la proteína relacionada con la tirosinasa de tipo 1 (TYRP1), otra de las enzimas componentes de la síntesis de melanina. Se caracteriza por un albinismo rojizo o marrón, que ocurre principalmente en la población africana. La piel presenta un color rojo bronce, iris azul o marrón y pelo rojizo. El otro fenotipo sería el marrón, en la que el cabello es marrón claro, y la piel es de color marrón claro a oscuro. Por lo que se trata de formas más leves de albinismo. El nistagmo en esta forma es casi indetectable.

-OCA4: Se trata de un albinismo oculocutáneo en la que existen grados variables de hipopigmentación de la piel y el pelo. Existen afectación ocular y alteración en la decusación de los nervios ópticos en el quiasma, y suele existir estrabismo. El nistagmo puede desarrollarse en los primeros meses de vida, incluso en algunos casos al nacimiento. Puede existir hipoplasia foveal que comporta una reducción de la agudeza visual. Al nacer el color del pelo suele ser blanco plateado o amarillo claro, pero puede oscurecerse con el tiempo. La piel suele ser de un blanco cremoso. Se trata de la forma más frecuente de albinismo en la población japonesa. Está causado por mutaciones en el gen de la proteína transportadora asociada a la membrana (SLC45A2) y que participa

en la síntesis de melanina. Existe producción de melanina pero está disminuida y la pigmentación es a expensas de la feomelanina, que presenta una coloración amarillenta. Con la exposición solar suelen desarrollar CBC y carcinomas escamosos, sin embargo, los melanomas no son frecuentes.

-OCA5: corresponde a mutaciones o alteraciones en un gen, todavía desconocido, asociado a la región cromosómica 4q24 del genoma humano. Ha sido detectado por vez primera en familias de origen paquistaní.

-OCA6: corresponde a mutaciones o alteraciones del gen SLC24A5, que codifica para una proteína de transporte que ya había sido asociada a variaciones en la pigmentación humana. Aunque fue descrito por vez primera en familias de origen chino ya ha sido detectado también en Europa.

-OCA7: corresponde a mutaciones o alteraciones del gen C10orf11, que codifica para una proteína involucrada en la diferenciación de los melanocitos. Este nuevo tipo de albinismo fue detectado por vez primera en familias danesas, de las islas Feroe.

Algunas formas de OCA pueden presentar ciertamente dificultades para clasificarse correctamente ya que tienen características solapadas y pueden confundirse también con otras formas de albinismo ocular ligado al X, así como síndromes con albinismo como rasgo, como los síndromes de Hermansky-Pudlak 1-7, de Chediak-Higashi, de Griscelli, y de Waardenburg tipo II.

-Síndrome de Bazex-Dupré-Christol: Genodermatosis con herencia dominante ligada al cromosoma X, el locus se encuentra en el cromosoma Xq24-27 donde se localiza el gen mutado BZX³⁰. Clínicamente se caracteriza por presentar hipotricosis, hipohidrosis, atrofodermia folicular, múltiples quistes de milium y CBC. La hipotricosis afecta aproximadamente al 85% de los pacientes y puede comprometer el cuero cabelludo, las cejas, las pestañas, las axilas, el pubis, entre otras áreas del cuerpo. Por lo general, se presenta en la infancia precoz y mejora con la edad. El cabello es delgado, irregular, de color marrón claro y, dentro de las alteraciones del tallo piloso, se encuentran descritos el *pili torti* y la tricoloris nodosa. La hipohidrosis se ha descrito en alrededor del 55% de los pacientes. La atrofodermia folicular consiste en pequeñas depresiones puntiformes centradas en el infundíbulo del folículo piloso, localizadas con más frecuencia en el dorso de las manos y los pies, en la superficie de extensión de los

codos y las rodillas, y ocasionalmente, en la cara. Se presenta en alrededor del 85% de los pacientes y puede observarse desde el nacimiento o más tardíamente. Si bien la atrofodermia folicular es muy característica, no es específica de este síndrome, ya que ha sido también asociada a la atrofodermia vermiculata, condrodiasplasia punctata, síndrome de Rombo y síndrome del carcinoma de células basales nevoide, entre otros. Los quistes de milium suelen afectar a la cara y, con menor frecuencia, las extremidades y el tronco, y pueden ser de aparición congénita o durante la infancia. Los CBC se presentan en alrededor del 40% de los pacientes durante la segunda o tercera década de la vida y se localizan, en su mayoría, en áreas fotoexpuestas, como la cara y el cuello. Se debe examinar periódicamente a los pacientes con este síndrome, con el fin de detectar de forma precoz la aparición de este tipo de tumores. Puede afectar solamente a la cara o ser generalizada. Se suele hacer el diagnóstico diferencial con el síndrome de Gorlin, la condrodiasplasia punctata y el Síndrome de Rombo.

Existe una variante de este síndrome que se conoce como síndrome de Oley y consiste en la asociación de hipotricosis congénita y milium que regresan espontáneamente durante la adolescencia, con predisposición a la aparición de CBC. Según Andreani V. y colaboradores, el síndrome de Bazex-Dupré-Christol y el síndrome de Oley son dos variantes de una misma patología³¹.

-Síndrome de Rombo: La etiología permanece desconocida. El síndrome de Rombo se caracteriza por atrofodermia vermiculada, milia, hipotricosis, tricoepiteliomas, vasodilatación periférica con cianosis y carcinomas basocelulares²⁵. Fue descrito en cuatro generaciones de una misma familia y en dos casos esporádicos adicionales. Las lesiones cutáneas aparecen entre los 7 y 10 años de edad y son más pronunciadas en la cara. Los CBC son frecuentes y se desarrollan alrededor de los 35 años de edad.

-Síndrome de Gorlin o síndrome del carcinoma basocelular nevoide: Se trata de una enfermedad autosómica dominante poco frecuente, afecta a 1 de 57000 personas, lo que representa el 0.0018%³². En estos pacientes se encuentra una mutación en el gen patched1 (PTCH1), localizado en el brazo largo del cromosoma 9, locus 9q22.3-q31. El gen PTCH1 se trata de un gen que codifica una proteína transmembrana que está involucrada en la vía molecular de Sonic hedgehog (Shh). Esta vía molecular, como se explicará más adelante, está reprimida en condiciones normales en la mayor parte de

células del individuo adulto a excepción de las células madre del folículo piloso. Su activación por mutación en el gen PTCH1 conlleva la expresión de genes involucrados en la proliferación del ciclo celular y en la carcinogénesis del CBC. Los pacientes con síndrome de Gorlin presentarán carcinomas basocelulares desde edades muy tempranas, aparte de ser más susceptibles a la aparición de otras neoplasias como los meduloblastomas. Los pacientes también presentarán otras lesiones características de dicho síndrome como los quistes odontogénicos, pits palmoplantares, calcificaciones intracraneales, alteraciones congénitas del desarrollo y trastornos en costillas y en otros huesos. Además estos pacientes presentan un fenotipo característico con una frente abombada, raíz nasal ancha, en ocasiones estrabismo, en algunos casos pueden asociar retraso mental pero no siempre³², figuras 5-7.



Figura 5. Facies característica en el síndrome de Gorlin.



Figura 6. Síndrome de Gorlin. Carcinomas basocelulares superficiales en tronco.



Figura 7. Síndrome de Gorlin. Depresiones o pits palmares.

1.4. Formas clinicopatológicas del carcinoma basocelular

Existen varios subtipos de CBC atendiendo a la clasificación clínica e histopatológica, a la vez que existen distintas clasificaciones. A continuación realizaré una breve descripción de los subtipos más relevantes atendiendo a su importancia y frecuencia así como la presencia de algunos subtipos en distintos capítulos de la tesis que conviene conocer previamente³³.

1.4.1. Carcinoma basocelular nodular

Se trata del subtipo más frecuente, y representa entre el 60% al 70% de todos los casos. Generalmente se manifiesta como una pápula que puede presentar el color de la piel, o ser ligeramente eritematosa, de superficie lisa y brillante, de tamaño variable en función del tiempo de evolución, figura 8 (a). Suele contener algunas telangiectasias arboriformes en superficie y acompañarse de alguna costra o pequeña erosión. No es raro que contenga en su interior trazas de pigmento y suele presentar un brillo perlado característico. Presenta una consistencia dura al tacto. Se localizan frecuentemente en la cara, zona de exposición solar crónica. Histológicamente se observan islotes de células tumorales redondeadas que recuerdan a las células basales de la epidermis de ahí que también se las describa como células basaloides, las células tumorales más externas del nido tumoral se distribuyen en empalizada y se pueden extender desde la epidermis a la dermis reticular o incluso sobrepasarla. El estroma que está

inmediatamente en contacto con los islotes de las células tumorales puede presentar una retracción característica, figura 8 (b).

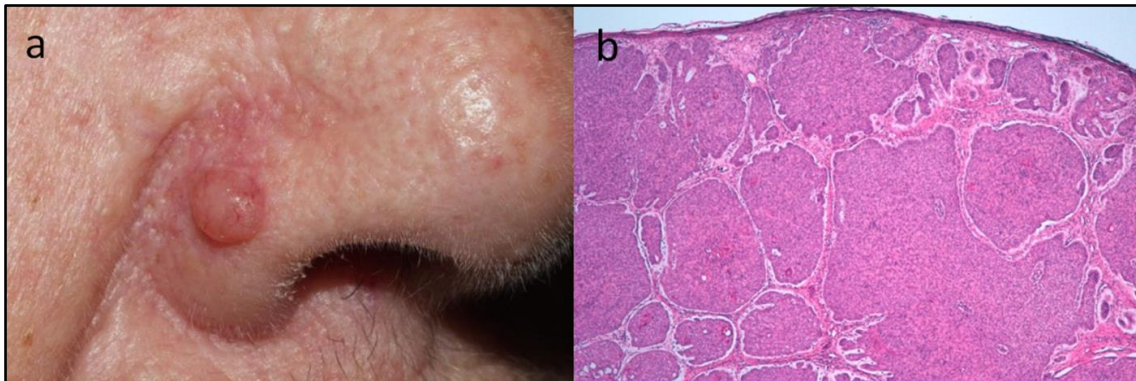


Figura 8. Imagen clínica (a) e histológica (b) de un carcinoma basocelular nodular

1.4.2. Carcinoma basocelular micronodular

El CBC micronodular no se puede distinguir a nivel clínico de la variante nodular clásica, pero histológicamente los islotes de células tumorales son menores, la empalizada periférica no siempre está desarrollada y son más uniformes que en el CBC nodular, figura 9. Tienen mayor tendencia a la recurrencia que los CBC nodulares.

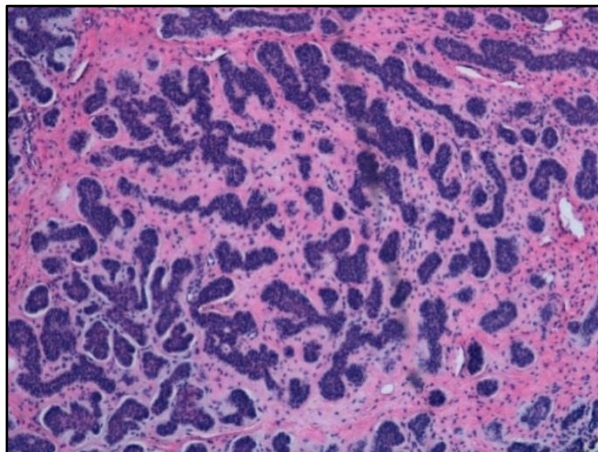


Figura 9. Imagen histológica de un CBC micronodular.

1.4.3. Carcinoma basocelular superficial

Es el segundo subtipo más frecuente, llegando a representar entre el 10% al 15 % de todos los carcinomas basocelulares. Se trata de una placa eritematocostrosa rodeada de pequeñas pápulas que presentan un brillo perlado, figura 10 (a). En ocasiones se

pueden observar telangiectasias en superficie. Suelen localizarse en tronco y a veces pueden plantear el diagnóstico diferencial con otras placas eritematocostrosas como el eccema o la psoriasis. En su evolución suele presentar una zona central atrófica, cicatricial, que representa regresión tumoral. Se trata de un tumor poco invasivo.

A nivel histológico el CBC superficial es una lesión amplia, compuesta por una epidermis atrófica salpicada de pequeños lóbulos incipientes de células tumorales, que se extienden desde la epidermis a la dermis papilar, figura 10 (b). Con frecuencia se decía que estas yemas eran multifocales (de ahí la antigua denominación de CBC superficial multifocal), pero los estudios tridimensionales demuestran que estas yemas se conectan entre ellas a modo de red, sugiriendo un origen unicéntrico.

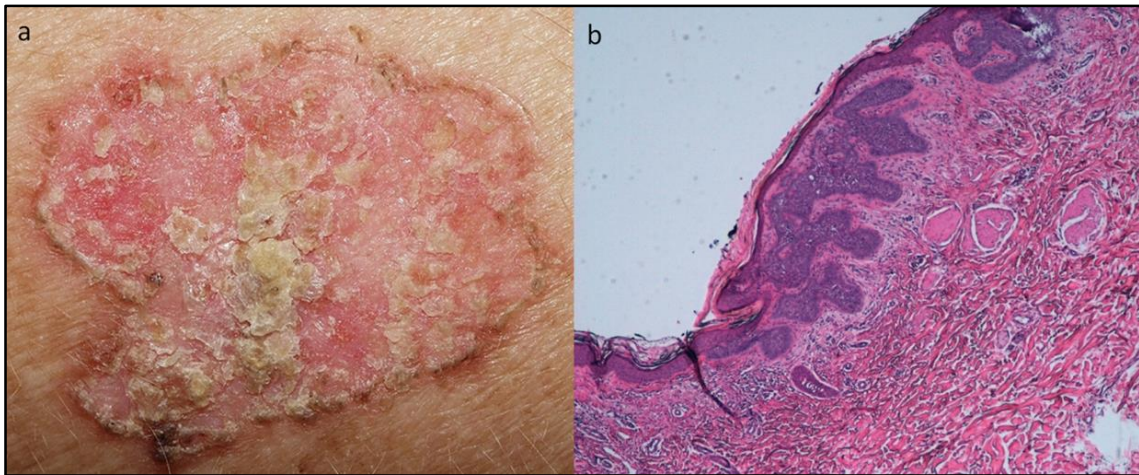


Figura 10. Imagen clínica (a) e histológica (b) de un carcinoma basocelular superficial.

1.4.4. Carcinoma basocelular pigmentado

Muchos carcinomas basocelulares contienen restos de pigmento en su interior. Ahora bien, denominamos pigmentado a aquel CBC que es uniformemente marrón pizarra o negro, figura 11 (a), por lo que nos plantea el diagnóstico diferencial con las queratosis seborreicas u otras lesiones melánicas y el melanoma³⁴. También se caracteriza por presentar brillo perlado, consistencia dura y telangiectasias en superficie. El tratamiento es el mismo que el resto de carcinomas basocelulares, aunque son preferibles las modalidades con las que se pueda confirmar el diagnóstico histológico y diferenciarlo de las otras entidades con las que se puede confundir.

En el estudio anatomopatológico observamos melanocitos dispersos en las islas tumorales y numerosos melanófagos en el estroma, figura 11 (b).

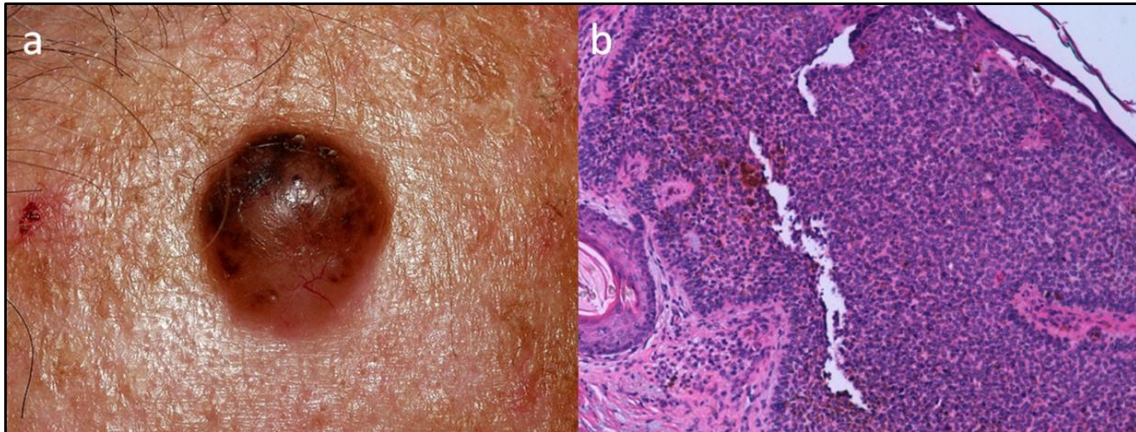


Figura 11. Imagen clínica (a) e histológica (b) de un carcinoma basocelular pigmentado.

1.4.5. Carcinoma basocelular morfeiforme o esclerodermiforme

Representa hasta el 5 % de todos los CBC. También pueden recibir otros nombres como fibrosante, desmoplásico o tipo cicatricial. Suelen ser más frecuentes en la cabeza y cuello de pacientes añosos. Se manifiesta como una placa del color de la piel o nacarada, en ocasiones puede presentar costras y telangiectasias. A la palpación se nota la superficie cutánea indurada. Sus límites no suelen estar bien definidos. A menudo tiene un aspecto cicatricial, figura 12 (a).

Histológicamente se caracteriza por la presencia de pequeños islotes de células basaloides, irregulares y especuladas, que invaden todo el espesor dérmico. Las células tumorales realizan una disección de los haces de colágeno esclerótico de la dermis, figura 12 (b).

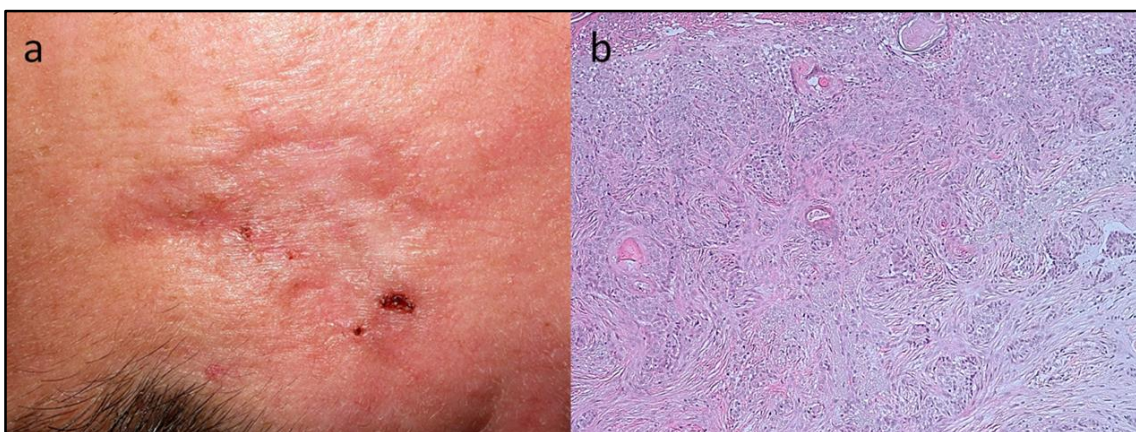


Figura 12: Imagen clínica (a) e histológica (b) de un carcinoma basocelular esclerodermiforme.

1.4.6. Carcinoma basocelular infiltrante

Representa aproximadamente el 5 % de todos los CBC. Suele localizarse en cabeza y cuello de adultos mayores. A nivel clínico no se caracteriza por presentar ningún rasgo distintivo, a veces puede manifestarse como una placa o una pápula aplanada con márgenes mal definidos que recuerda al subtipo morfeiforme, figura 13 (a). A nivel histológico se caracteriza por la presencia de pequeños islotes de células basaloides, irregulares que hacen proyecciones invadiendo todo el espesor dérmico, determinando la disección de los haces de colágeno esclerótico de la dermis, figura 13 (b). Puede existir un ligero aumento de fibroblastos. Se caracteriza por un comportamiento más agresivo que la mayoría de carcinomas basocelulares.

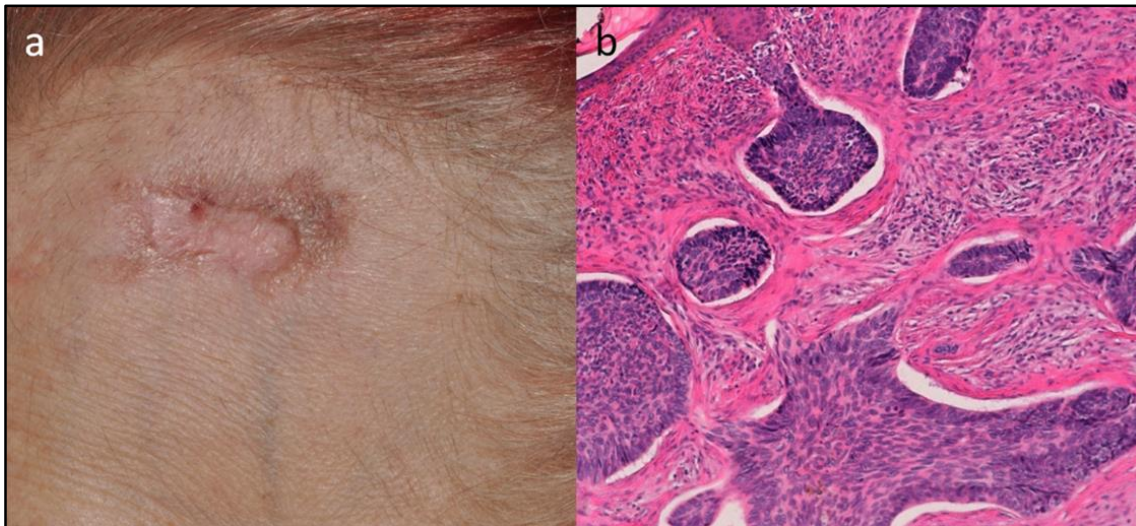


Figura 13. Imagen clínica (a) e histológica (b) de un carcinoma basocelular infiltrante, con desmoplasia estromal moderada, localizado en la frente.

1.4.7. Carcinoma basocelular quístico

Se trata de una definición histológica, en la que se puede encontrar uno o más espacios en el centro de algunos nidos tumorales como consecuencia de la degeneración tumoral en la parte central, asociado a un incremento de mucina entre el tumor y el espacio quístico.

1.4.8. El fibroepitelioma de Pinkus

Se trata de un subtipo muy infrecuente de CBC. Cursa como una pápula, placa o nódulo liso, sésil, en forma de cúpula o pediculado y de color rosado, figura 14 (a). Más frecuente en tórax y extremidades. El fibroepitelioma de Pinkus es una variante única

de CBC con unos rasgos histológicos muy definidos. Se caracteriza por múltiples ramificaciones delgadas, alargadas y anastomosadas de células basaloides, que se originan en la epidermis y se encuentran incluidas en el seno de un estroma laxo fibromixoide, figura 14 (b).

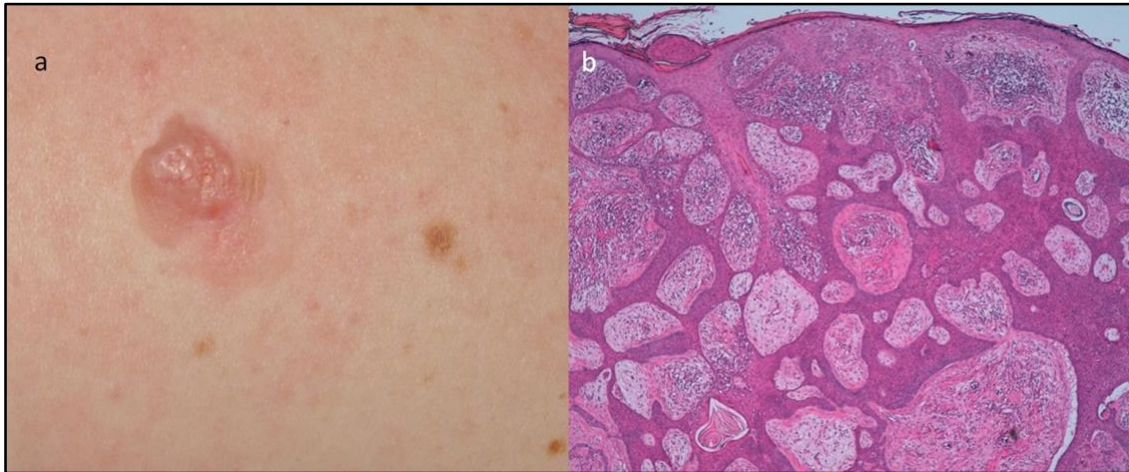


Figura 14. Imagen clínica (a) e histológica (b) de un fibroepitelioma de Pinkus localizado en la espalda.

1.4.9. Carcinoma basocelular adenoide

Se trata de una variante muy poco frecuente como entidad pura sino que suele darse en combinación con otras formas de CBC. Se caracteriza por la presencia de células basaloides con un patrón reticulado. La presencia de mucina estromal es frecuente y prominente.

1.4.10. Carcinoma basocelular metatípico

Se trata de una forma rara de CBC con rasgos de CBC y CEC. Se suele reservar esta clasificación para los CBC compuestos por nidos e hileras de células maduras más grandes y pálidas. La empalizada periférica a menudo no está presente. Las células tumorales expresan en menor frecuencia citoqueratina (CK) 17 y CK8 que la mayor parte de células de CBC. Suele presentar un estroma prominente y tiene potencial metastásico. La incidencia ha descendido considerablemente desde que el uso de la radioterapia haya disminuido hoy en día en el tratamiento del CBC, ya que este subtipo de CBC se solía encontrar en lesiones recidivadas de CBC que habían recibido tratamiento con radioterapia.

1.4.11. Carcinoma basoescamoso

Se trata de una entidad controvertida que puede definirse como un carcinoma basocelular con diferenciación hacia carcinoma escamoso, a veces es difícil de diferenciar del CBC metatípico. Está compuesto por diferentes tipos celulares, observándose tanto células basaloides como escamosas. Se caracteriza por un comportamiento más agresivo con potencial metastásico, pudiendo presentar invasión perineural hasta el 10% de los casos. Se caracteriza por ser siempre EMA⁺/Ber-EP4⁻, se asemeja más al CBC que al CEC, figura 15.

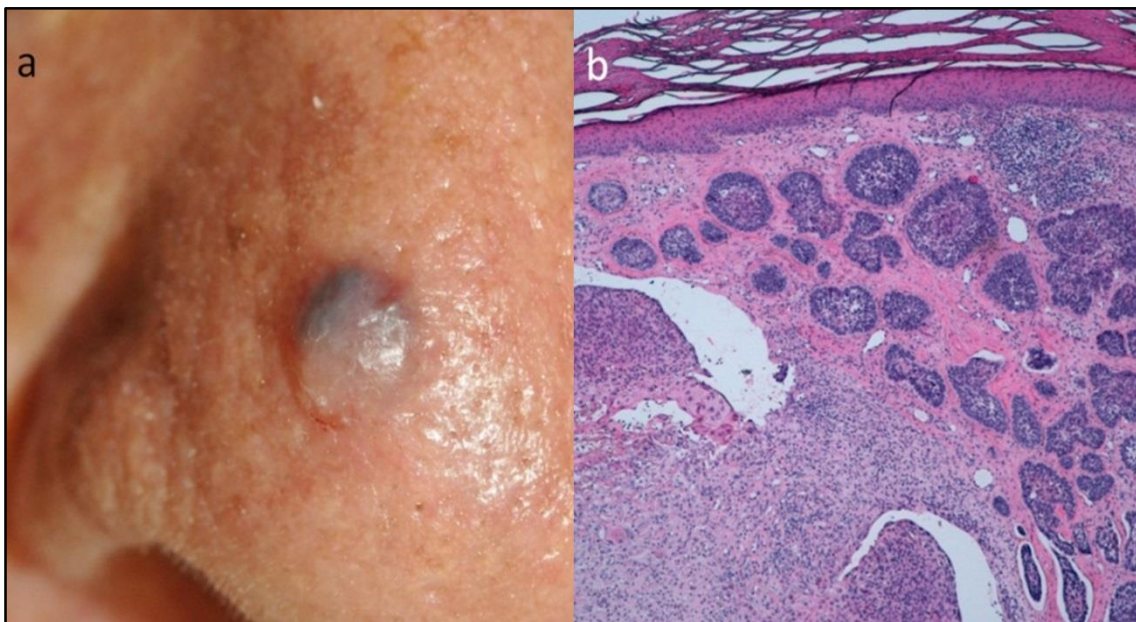


Figura 15. Imagen clínica (a) e histológica (b) de un carcinoma basoescamoso.

1.4.12. Carcinoma basocelular tipo “ulcus rodens”

Se trata de una clasificación clínica del carcinoma basocelular con un comportamiento muy agresivo que se caracteriza por ulcerarse desde etapas iniciales y cuyos bordes con frecuencia no están bien definidos, figura 16. Cuando afecta a estructuras críticas como el globo ocular debe tratarse urgentemente. El tratamiento de elección será la exéresis quirúrgica.



Figura 16. Carcinoma basocelular “ulcus rodens”.

1.4.13. Carcinoma basocelular tipo “ulcus terebrans”

Se trata de la etapa evolucionada o final de cualquier CBC pero sobretodo de aquellos CBC con un comportamiento más agresivo y rápido crecimiento, figura 17. El tumor puede afectar a grandes áreas e infiltrar estructuras como hueso o cartílago, globo ocular y senos paranasales. Se trata de un CBC tan avanzado que puede resultar letal. Los escasos casos que se dan de “ulcus terebrans” son en su mayoría en pacientes añosos, muchos demenciados con poco soporte social y familiar. También se da en aquellos pacientes con formas más agresivas de CBC que no han respondido a las distintas terapias. El tratamiento quirúrgico no siempre es posible al afectar a grandes áreas y/o infiltrar a órganos vitales. Un tratamiento que puede proponerse a estos pacientes muchas veces con finalidad paliativa más que curativa, es un tratamiento oral del que disponemos recientemente con inhibidores de la principal vía molecular alterada en el CBC, la vía Sonic hedgehog^{35, 36}.



Figura 17. Carcinoma basocelular tipo “ulcus terebrans”³⁷.

En resumen, el comportamiento biológico de los CBC de tipo micronodular, infiltrante, basoescamoso y morfeiforme, es más agresivo que el de las formas nodular o superficial. Los subtipos de CBC que presentan un comportamiento más agresivo se caracterizan por un patrón de crecimiento infiltrante con límites clínicos mal definidos. La reacción del estroma tiende a ser esclerótica más que fibrótica o mixoide. En estos tipos agresivos es más común la invasión perineural, que aparece en al menos el 3% de estos tumores. Los elementos histológicos que caracterizan a los CBC nodulares o los superficiales, como la disposición en empalizada periférica de los núcleos o las hendiduras peritumorales, se advierten en menor medida en los CBC más agresivos.

1.5. Tratamiento del carcinoma basocelular

El tratamiento de elección del CBC es la cirugía, sin embargo, existen otras opciones terapéuticas con muy buena respuesta como veremos a continuación. Cabe destacar que algunas opciones terapéuticas tienen mejor o peor respuesta en función del subtipo de CBC.

1.5.1 Cirugía escisional

Se trata del tratamiento de elección del CBC. Es la opción terapéutica que permite mayor porcentaje de curaciones en comparación con otros tratamientos y permite el

control histológico de los márgenes del tumor. La mayor parte de CBC presenta curación completa cuando se realiza la escisión quirúrgica con márgenes de 3 a 5 mm.

1.5.2. Cirugía de Mohs

Se trata de una técnica descrita por Frederic Mohs en el año 1941. Consiste en realizar una exéresis quirúrgica convencional añadiendo el control histológico de los márgenes, de este modo podemos analizar el 100% de los márgenes, respetando el máximo de tejido sano, ya que limitamos la exéresis a la zona tumoral. La técnica quirúrgica consiste en extirpar el tumor tangencialmente, en forma de plato con poco espesor y que este sea homogéneo. Una vez extirpada la pieza quirúrgica se realiza un mapeo de la muestra. Para ello se debe dibujar la pieza extirpada a tamaño real sobre una figura que represente la zona en la que se localizaba el tumor. Se utilizan fotocopias de diseños anatómicos en las que debe constar la identificación del enfermo, la fecha y el número del estadio o pase. Sobre el dibujo de la pieza tumoral, se pintan las secciones que se van a cortar posteriormente. La muestra, tras realizar marcas orientadoras en el quirófano, se divide en secciones de aproximadamente 1 cm de lado. Cada sección es marcada con colorante negro y verde en los bordes no cutáneos y se coloca en la placa de Petri o sobre un papel de filtro humedecido en el que consta un número de localización que coincide con el número del mapa de la figura. En el mapa se le asigna al colorante negro (tinta china) un punteado y al colorante verde un trazo continuo. En cada pase se realiza un nuevo mapa. La pieza es cortada con el criostato que se prepara a una temperatura entre 25 y 30 °C con cortes de 6 µm de espesor. Cada una de las secciones es invertida de forma que el fondo de la pieza quede en la parte de arriba. El tejido es colocado sobre OCT y presionado ligeramente con el extractor de calor, para obtener una superficie lisa y uniforme. Al cortar cada una de las secciones debe intentarse que los primeros cortes sean útiles ya que, si se profundiza mucho, se obtienen falsos positivos. Se realiza la tinción de las secciones con hematoxilina-eosina y/o azul de toluidina y se realiza el estudio microscópico. Si se comprueba que queda tumor, se pinta de rojo en el mapa la zona con persistencia tumoral y se realiza un nuevo pase de la zona afectada hasta conseguir el plano libre de tumor tanto lateralmente como en profundidad. Si por el contrario se comprueba que no queda tumor se pinta de azul las zonas en el mapa y se realiza el cierre del defecto quirúrgico

bien sea por segunda intención, cierre directo, colgajo o injerto³⁸. Esta técnica no está disponible en todos los hospitales españoles. La cirugía de Mohs está indicada en CBC localizados en párpados, orejas, nariz, pliegue nasolabial y en general en zonas de fusión de pliegues embrionarios en las cuales el tumor tiene más capacidad de diseminación a su través. Los subtipos histológicos esclerodermiformes o infiltrantes son los que suelen presentar un comportamiento más agresivo, especialmente los de más de 2 cm de tamaño y localizados en las zonas previamente comentadas, muchas veces sus márgenes cuestan delimitar clínicamente por lo que serían los mejores candidatos a cirugía de Mohs. Como principales inconvenientes de esta técnica, destacaríamos un mayor tiempo quirúrgico, la debida formación por parte del especialista y el coste del procedimiento.

1.5.3. Crioterapia

Mediante la aplicación de nitrógeno líquido, que se encuentra a una temperatura de -195,8°C. Se aplica sobre el tumor bien sea en aerosol o mediante la crisonda, consiguiéndose la necrosis tisular por el mecanismo de congelación – descongelación de la piel. Es una técnica válida para tumores menores de 2 cm preferiblemente, bien circunscritos, como los CBC superficiales. Es una opción terapéutica válida en pacientes no candidatos a tratamientos quirúrgicos o pacientes con comorbilidades o añosos³⁹. Se suele realizar entre 2 y 3 ciclos de congelación-descongelación profunda de 10 a 20 segundos de duración, en función del tamaño del tumor. Es un tratamiento coste-efectivo con buenos resultados estéticos. El inconveniente de esta técnica además de la inflamación local es que no permite obtener material tumoral para su análisis histopatológico.

1.5.4. Curetaje y electrocoagulación

Se trata de eliminar mediante una cureta el tumor y seguidamente electrocoagular el lecho tumoral para control hemostático y asegurar la erradicación del tumor. Este procedimiento se puede repetir 2 veces seguidas para mejorar el porcentaje de curaciones. Se trata de una buena opción terapéutica en CBC de bajo riesgo, como el CBC superficial o nodular bien delimitado y menores de 1 cm, localizados fuera de las zonas de peligro como el área centro facial. Es una técnica coste-efectiva con buenos

resultados estéticos y funcionales. El principal inconveniente es que no nos permite tener el control histológico de los márgenes. La herida cierra por segunda intención. Con esta técnica se pueden alcanzar porcentajes de curación de hasta el 97% en las indicaciones correctas. Los resultados no son tan buenos en CBC recidivantes o localizados en áreas de alto riesgo^{38, 40}.

1.5.5. Radioterapia

Es una opción terapéutica válida en pacientes no candidatos a tratamiento quirúrgico, en pacientes añosos con tumores primarios o recurrentes tras una cirugía. También es una buena opción en tumores localizados en zonas de alto riesgo y mayores de 15 mm de diámetro o en tumores mayores de 20 mm de diámetro en zonas de riesgo intermedio. Asimismo, se puede contemplar como un tratamiento adyuvante cuando existe invasión perineural en la histología y existen dudas de que haya podido quedar tumor residual. Sin embargo, esta técnica está contraindicada en pacientes con condiciones genéticas que predispongan a otros tumores como el xeroderma pigmentosum o el síndrome de Gorlin. Tampoco tiene sentido aplicar este tratamiento en zonas de bajo riesgo como extremidades y tronco. Los CBC esclerodermiformes presentan resistencia parcial a este tratamiento por lo que no suele indicarse. Normalmente se administra en dosis fraccionadas, esto hace que los pacientes deban acudir al centro sanitario durante varias semanas. Los resultados cosméticos a los 4 años suelen ser mejores en pacientes tratados con cirugía⁴¹.

1.5.6. Láser

El láser consiste en la aplicación de una fuente de luz coherente o no coherente para la destrucción tumoral. Existen varios tipos de láser utilizados para este fin como son el láser PDL, láser ND: YAG, y el CO₂, aunque existen pocos estudios amplios acerca del porcentaje de curación con este tratamiento. Se pueden utilizar diferentes tipos de láseres tanto los ablativos como los selectivos. Este tratamiento estaría indicado en tumores de bajo riesgo. La principal ventaja sería el resultado estético y su desventaja es la falta de obtención de material tumoral para su análisis histopatológico⁴².

1.5.7. 5-Fluorouracilo

Quimioterápico tópico cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición de la enzima timidilato sintetasa bloqueando de este modo la síntesis de ADN. El 5-fluorouracilo (5-FU) tópico al 5% está aprobado para el tratamiento del CBC superficial. La posología recomendada es la aplicación de dos veces al día durante 6 semanas, alcanzando una tasa de curación aproximada del 93 %⁴³. Como efectos secundarios del tratamiento resaltar la importante inflamación local. El 5-FU es una opción terapéutica en los CBC superficiales de pequeño tamaño, localizados en zonas de bajo riesgo y en pacientes que no son buenos candidatos al tratamiento quirúrgico⁴⁴.

1.5.8. Imiquimod

Se trata de un modulador de la respuesta inmune, agonista del toll-like receptor 7 (TLR-7). Actúa induciendo la liberación local de interferón- α , factor de necrosis tumoral- α y otras citocinas. Además de inducir la apoptosis de las células tumorales, Imiquimod tiene actividad antitumoral y antivírica. Imiquimod tópico al 5% está aprobado para el tratamiento de los CBC superficiales. La posología recomendada consiste en la aplicación de 5 días a la semana durante 6 semanas. Con esta posología se alcanza aproximadamente un 90% de respuestas⁴⁵. Al igual que el 5-FU, el efecto secundario más importante es la inflamación local que se produce en la zona tratada y debe advertirse al paciente antes de iniciar el tratamiento.

1.5.9. Terapia fotodinámica

Esta técnica se basa en la aplicación de una sustancia fotosensibilizante, el metilaminolevulinato o el ácido 5- α -aminolevulínico, seguida de la iluminación posterior de la lesión con luz ultravioleta o visible para producir moléculas de oxígeno activado y destruir las células diana. Se trata de un tratamiento válido para CBC superficiales extensos o multifocales. El tratamiento requiere 2 sesiones en el caso de los CBC⁴⁶. Los resultados cosméticos suelen ser muy buenos. El principal inconveniente es que no permite obtener material histológico para ver la afectación de los márgenes, por lo que se aconseja seguimiento de los pacientes para descartar recidivas. Esta técnica no está indicada en CBC morfeiformes ni pigmentados⁴⁷.

1.5.10. Vismodegib

Inhibidor oral de la vía molecular Sonic hedgehog (Shh). Se trata de una vía molecular importante durante el desarrollo embrionario que se ha visto involucrada en la carcinogénesis de una serie de tumores, entre ellos el carcinoma basocelular. Con los inhibidores de dicha vía se puede conseguir la curación de CBC irresecables o metastásicos. El tratamiento consiste en la administración diaria por vía oral de un comprimido de 150 mg de vismodegib. Está aprobado en CBC localmente avanzado en pacientes no candidatos a cirugía ni a radioterapia, o bien si estos tratamientos han fracasado. También está aprobado en los casos de CBC metastásico. Los efectos secundarios más frecuentes de este tipo de tratamiento son la alopecia, la disgeusia y la pérdida de peso, todos ellos reversibles al suspender el fármaco, sin que esto suponga resistencias a su reintroducción en caso de recidiva⁴. Se trata del tratamiento más novedoso aprobado en España para CBC, constituyendo una alternativa terapéutica para aquellos casos de CBC irresecables o recidivantes en los que se hayan agotado todas las opciones de tratamiento anteriormente explicadas y con el que existen muy buenas expectativas.

2. Origen celular del carcinoma basocelular

En la biología del cáncer resulta fundamental conocer la célula que origina el tumor. En el caso del carcinoma basocelular hay cierta controversia. La teoría más aceptada en la actualidad fue la propuesta por Lever⁴⁸ en 1948, posteriormente apoyada por Ackerman⁴⁹, en la que se postula que el CBC proviene de las células madre del folículo piloso. Sin embargo, existe otra teoría no tan aceptada que entraría en confrontación con la anterior y sería la teoría del epitelio interfolicular.

2.1. Teoría de las células madre del folículo piloso

En primer lugar, debemos comentar que el folículo piloso es la principal reserva de células madre epiteliales y células progenitoras, especialmente la región de la protuberancia. Como se observa en la figura 18, la protuberancia se localiza por debajo de la desembocadura de la glándula sebácea y de la inserción del músculo *erector pili*. Sus células se caracterizan por expresar CK15 y CD34. Existe otro nido de células madre aunque menos importante en la zona juntural, que se localiza por encima de la

protuberancia y cercana a la glándula sebácea. En este caso las células expresan Lgr6 y Lrig1⁵⁰. El tercer grupo de células madre se localiza en la matriz germinal del pelo y se caracteriza por expresar Lgr5, durante la fase anágena. Estas células se localizarán asimismo en la protuberancia en la fase telógena y en la vaina externa de la raíz del pelo en el inicio de la fase anágena. En referencia al ciclo de crecimiento del folículo piloso, explicar brevemente que se clasifica en 3 fases. La primera fase es la anágena, en la cual el pelo está en proceso de crecimiento por lo tanto las mitosis son muy altas en los distintos grupos celulares del folículo piloso. La segunda fase es la catágena, en esta fase el cabello está en una fase de latencia en el que no crece pero todavía permanece anclado al folículo piloso. La tercera fase sería la telógena, en el que el cabello se desprende del folículo piloso y cae, iniciándose de nuevo el ciclo. En función de la región corporal las diferentes fases tienen diferentes tiempos de duración, lo que determinará la longitud del cabello.

Hoy en día la teoría de las células madre del folículo piloso es la más aceptada y la que tiene mayor consistencia. Esta teoría se basa en diferentes evidencias que se han constatado y resumo a continuación⁵¹.

1. Tumores que derivan del folículo piloso como los tricoblastomas, aparecen al mismo tiempo que los CBC tras irradiar el cuero cabelludo con radiaciones ionizantes.
2. La vía Sonic hedgehog, como veremos más adelante, se trata de una vía con una alta actividad durante la vida embrionaria. Sin embargo, durante la vida adulta dicha vía permanece inactiva a excepción del folículo piloso en la cual se mantiene activa en condiciones normales y también encontramos activación de la vía en procesos patológicos como los CBC.
3. El perfil de citoqueratinas de los CBC es muy similar al de la vaina externa de la raíz del pelo.

En modelos murinos se ha observado que estimulando la vía Shh en las células madre de la protuberancia del folículo piloso se desarrollaban CBC nodulares, mientras que si se irradiaba la epidermis interfolicular se desarrollaban CBC superficiales según los trabajos de Grachtchouk *et al*⁵².

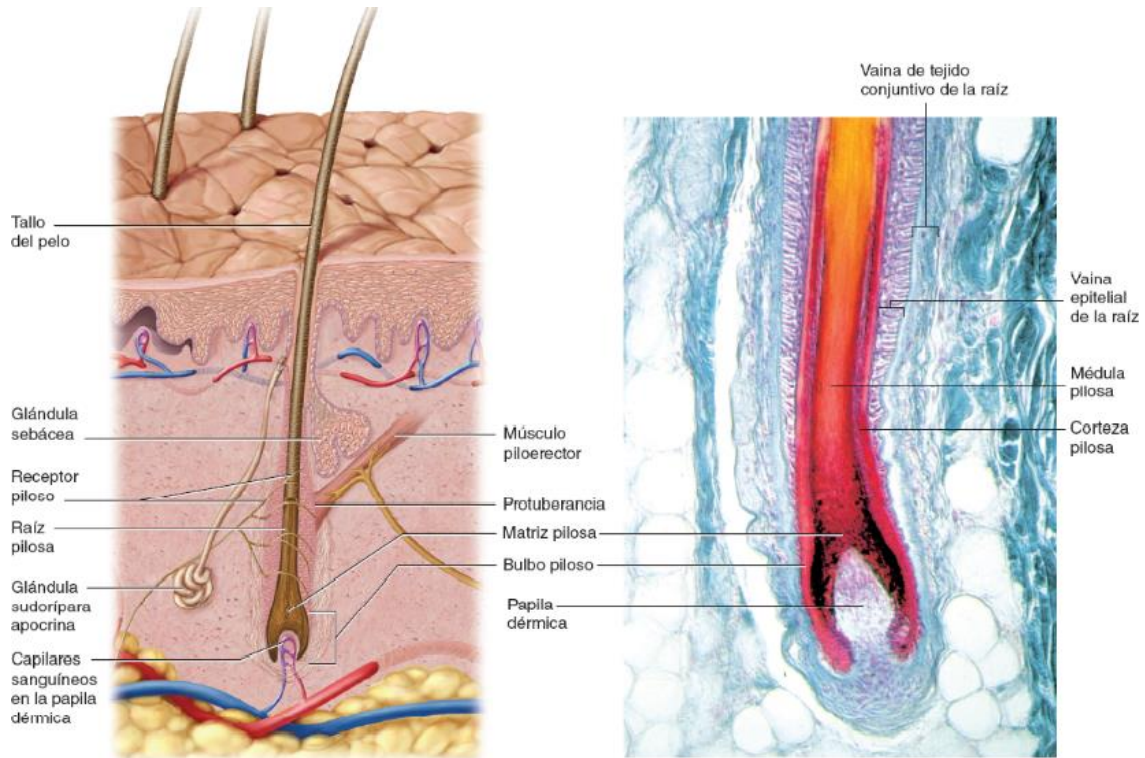


Figura 18. Estructura del folículo piloso, sobre el esquema podemos encontrar la ubicación de la zona de la protuberancia⁵³.

2.2. Teoría del origen celular del carcinoma baso celular en el epitelio intermolecular

Esta hipótesis está menos contrastada que la anterior. El principal fundamento fue el resultado del trabajo de Youssef *et al.*⁵⁴, en el que consiguieron modelos murinos de CBC superficial con la vía Sonic hedgehog hiperactiva da en el epitelio intermolecular. Sin embargo, en el epitelio intermolecular no se conoce la existencia de células madre, aunque existe una heterogeneidad proliferativa. Se cree que pudieran considerarse células madre aquellas células que expresan integrinas $\beta 1$ y Lrig1, con un índice de proliferación bajo, quedando agrupadas en la zona más inferior de la unión dermoepidérmica, donde parece que hay un microambiente específico que protege de los estímulos de la diferenciación⁵⁵.

Una de las críticas a esta hipótesis es que se cree que los carcinomas basocelulares que se originan en el epitelio interfolicular provienen de las células madre del folículo piloso, a través de la migración celular, como sucede en el mecanismo de reparación de las heridas. Un mecanismo similar daría lugar a los carcinomas basocelulares.

En la piel, al recibir una agresión externa como la radiación ultravioleta o una agresión física, como serían las úlceras crónicas, daría lugar a una respuesta de las células

madre de los folículos pilosos vecinos, sobretodo en las células Lgr5 (+), lo que originaría la repoblación del epitelio interfolicular dañado para reepitelizarlo⁵⁰. Grachtchouk *et al.*⁵² apoyan esta explicación en defensa del hallazgo de CBC tras irradiar el epitelio interfolicular. Además, las vías moleculares implicadas en el CBC, como son principalmente la vía Shh y la vía Wnt, son las que controlan el comportamiento de las células madre durante la reparación de las heridas y no las células que constituyen el epitelio interfolicular. Sin embargo, los defensores de la teoría del origen celular del CBC en el epitelio interfolicular postulan que, como consecuencia de la irradiación ultravioleta del epitelio interfolicular, se produciría una mutación de P53 en los queratinocitos que conduciría a la hiperactivación de Shh y consecuentemente produciría la formación de CBC en la misma zona⁵¹. Hoy en día la teoría del origen del CBC en el epitelio interfolicular tiene menos peso y parece que los argumentos que apoyan su origen en el folículo piloso son más evidentes.

3. Vías moleculares implicadas en el carcinoma basocelular

La vía molecular principalmente afectada en el CBC es la vía Sonic hedgehog (Shh). Esta vía se vio que estaba involucrada en el CBC gracias al estudio genético de pacientes con síndrome de Gorlin. El 100% de los pacientes afectados por el síndrome de Gorlin presentan alteración en esta vía molecular. Igualmente, los CBC esporádicos, presentan en la mayoría de los casos alteración de la vía Shh en las muestras tumorales analizadas⁵⁶.

Los primeros estudios descriptivos de la vía se realizaron en la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, en este modelo animal se observó que dicha vía era crucial para el correcto desarrollo embrionario determinando la polaridad segmentaria y la morfogénesis. Dicha vía también es importante en el desarrollo embrionario de múltiples especies, incluidos los humanos. Sin embargo, en individuos adultos, la vía Shh está inhibida en la mayor parte de células y tejidos. En condiciones normales, solo permanece activa en el folículo piloso.

La vía Shh está constituida por la proteína transmembrana Patched 1 (Ptch1). Se trata de una proteína con 12 dominios transmembrana, a la cual pueden unirse tres ligandos diferentes en vertebrados, que corresponden a Sonic (Sh), Desert (Dh) e Indian (Ih). Sh

interviene en el desarrollo del sistema nervioso central, los ojos, los músculos y establece la simetría izquierda-derecha. Dh interviene en el desarrollo de las células germinales masculinas e lh es un importante regulador del crecimiento óseo y del desarrollo del cartílago.

Ptch1 interacciona con otra proteína transmembrana que se denomina Smoothened (Smo). Se trata de una proteína G que actúa como un transductor de señal obligatorio en la vía Shh. En ausencia de ligando, Ptch1 está reprimiendo a Smo, pero, si el ligando se une a Ptch1, desaparece la inhibición sobre Smo y consecuentemente Smo inicia la fosforilación de los factores de transcripción asociados a glioma (GLI) intracitoplasmáticos que resultan activados. En condiciones normales los factores de transcripción (GLI) están unidos a un grupo de proteínas denominados *fused* (hFU), pero cuando son fosforilados son capaces de liberarse y entrar en el núcleo. En el núcleo los factores de transcripción GLI son capaces de activar la transcripción de los genes diana que en su mayoría están involucrados en la proliferación celular como ciclina D1, ciclina E, PATCH1, MYC, PDGFR α o Wnt, entre otros muchos. La alteración de la vía Shh se ha visto involucrada en la carcinogénesis de varios tumores como el meduloblastoma, el rabdomiosarcoma, el melanoma, el cáncer de páncreas, el cáncer de mama, el cáncer de pulmón, el cáncer de hígado, el cáncer de estómago y el CBC.

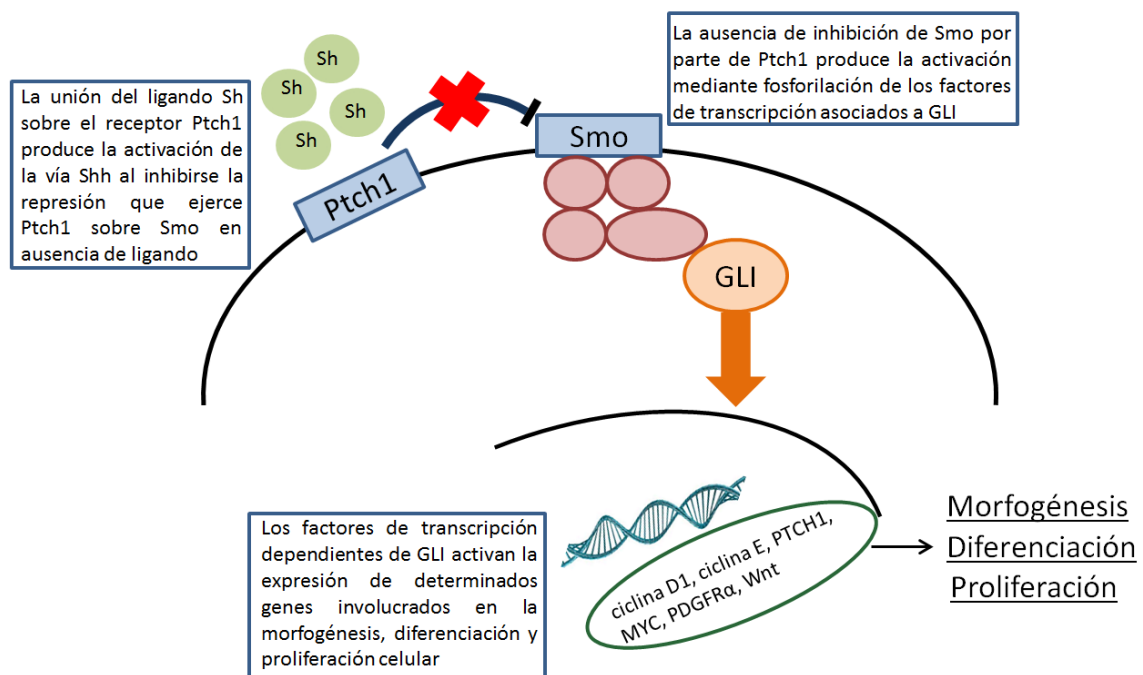


Figura 19. Esquema de la vía Sonic hedgehog.

En cerca del 90% de los CBC esporádicos se han encontrado mutaciones en el gen PTCH1, localizado en el brazo largo del cromosoma 9, y hasta un 10% de mutaciones en el gen SMO, según las series revisadas^{57,58}. Cuando el gen PTCH1 está mutado, la proteína Ptch1 pierde la capacidad de inhibir a Smo y por tanto Smo queda activado. Smo activado, como hemos explicado anteriormente, fosforila una serie de factores de transcripción intracitoplasmáticos que les permitiría entrar en el núcleo y activar la transcripción de determinados genes implicados en la proliferación celular y en la carcinogénesis del CBC. Por otro lado, cuando Smo está mutado, sería incapaz de ser inhibido por Ptch1 y existiría una activación constante de la vía que del mismo modo produciría la transcripción de los genes involucrados en la carcinogénesis del CBC. De este modo el gen que codifica a Ptch1 actuaría como un gen supresor tumoral, necesitando mutaciones en ambos alelos para manifestarse, y el gen que codifica a Smo actuaría como un protooncogén, bastaría con una mutación en uno de los dos alelos para manifestarse.

Tal y como se ha explicado anteriormente, en el apartado de tratamiento 1.5.10, existe un fármaco capaz de inhibir la vía Shh denominado vismodegib. Este fármaco actuaría inhibiendo a Smo por lo tanto todos los CBC que tengan alterada la vía Shh, bien sea por mutación a nivel de PTCH1 o de SMO, tendrán un bloqueo de la vía que evitaría la activación de los factores de transcripción involucrados en la carcinogénesis del CBC.

El CBC también se puede originar por mutación en otros genes. El gen que se ha descrito en mayor número de cánceres es la mutación del gen P53. El gen P53 es conocido como “el guardián del genoma”. Se trata de un gen supresor tumoral codificado en el brazo corto del cromosoma 17. Su función es primordial para evitar que el daño sobre el ADN pueda ser transmitido a las células hijas tras la mitosis. Lo que hace p53, al detectar daño en el ADN, es detener el ciclo celular para permitir que los mecanismos de reparación del ADN enmienden el daño. Si no es posible reparar el daño, p53 facilita que la célula entre en apoptosis para que la mutación no sea transferida a las células hijas. En cuanto al CBC, se han detectado hasta un 56% de casos, mutaciones en el gen P53⁵⁹. Muchas veces estas mutaciones son concomitantes con otras mutaciones que conducen a la génesis del CBC como las mutaciones en Shh. En ambos casos, la exposición a la RUV puede ser el mutágeno responsable^{59, 60}.

Otras vías moleculares implicadas en la carcinogénesis del CBC serían la vía Wnt, la vía de la β -catenina y la vía ERK, aunque en menor medida que la vía Shh. La proteína β -catenina, además, se ha involucrado en diversos tumores como el cáncer de páncreas y el cáncer de próstata⁶¹. La proteína β -catenina tiene diversas funciones tanto en el citoplasma como en el núcleo. En el citoplasma, β -catenina tiene una función estructural, ejerciendo un efecto de puente entre el citoesqueleto y las cadherinas. Cuando la proteína β -catenina se encuentra libre en el citoplasma, esta sufre una degradación proteolítica constante por parte del complejo de proteínas GSK3 β , APC y axina. La vía Shh estaría relacionada también con β -catenina, ya que inhibe el complejo proteolítico que la degrada aumentando de este modo su concentración intracitoplasmática mediante la inducción de la vía Wnt (no se conoce el mecanismo por el cual se activa). De este modo al aumentar la concentración de β -catenina libre en el citoplasma esta entrará en el núcleo y hará de mediadora de la vía Wnt/ TCF⁶².

Por lo tanto, la vía Shh ejercería una doble acción sobre la proteína β -catenina. Por un lado, inhibiría el complejo proteolítico formado por GSK3 β , APC y axina, lo que conduce a un aumento citoplasmático de β -catenina. Y por otro lado, se daría la transcripción de Snail, que se encargaría de disminuir la transcripción de E-cadherina⁶³. El hecho de no poder unirse la β -catenina con la E-cadherina, aumentaría la concentración de β -catenina, que entraría en el núcleo y activaría la transcripción de *lef*/TCF que permite la transcripción de genes que participan en el ciclo celular como MYC, ciclina D1 y metaloproteinasas^{64,65}.

Por otro lado, la vía de señalización MAPK/ERK también se ha relacionado con la carcinogénesis del CBC. La vía MAPK/ERK se activa por una gran variedad de receptores implicados en el crecimiento y la diferenciación celular, incluyendo receptores de la tirosina quinasa (RTKs), como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), integrinas y canales de iones. Los componentes específicos de la cascada varían ampliamente según los diferentes estímulos, pero la arquitectura de la vía normalmente incluye un conjunto de adaptadores (Shc, GRB2, Crk, entre otros) y se traduce la señal a pequeñas proteínas de unión a GTP (Ras, Rap1) las cuales activan la unidad central de la cascada compuesta por diferentes quinasas: MAPKKK (raf), MAPKK (MEK1/2) y MAPK (Erk, del inglés *extracellular signal-regulated kinase*). El

dímero ERK activo puede regular proteínas tanto en el citosol como en el núcleo, donde fosforila una gran variedad de factores de transcripción, implicados en múltiples funciones celulares como adhesión, progresión en el ciclo celular, migración, supervivencia, diferenciación, proliferación y metabolismo. El tipo de respuesta celular promovida para la activación de Erk es compleja, ya que depende de diferentes circunstancias, como el nivel de proteína fosforilada y el tiempo de activación, una señal sostenida promueve la diferenciación, mientras que una señal transitoria favorece la proliferación⁶⁶. En el cáncer de páncreas y en el melanoma también está implicada esta vía y se conoce su funcionamiento. En el caso del CBC sabemos que también participa pero no se conoce completamente de qué manera participa. Lo único que se conoce de momento es que la vía Erk actúa de forma sinérgica con la vía Shh en el inicio y el crecimiento del CBC. La activación de esta vía conduce a la unión de un complejo proteico conocido como JUN/AP-1 que se une al ADN y coopera con GLI para inducir la transcripción de aquellos genes que promoverán la transformación oncogénica⁶⁷. Además, también se sugiere que existe un sistema de retroalimentación entre las dos vías (Erk-Shh), de manera que los productos resultantes de la activación de la vía Erk son capaces de modular la estabilidad, la localización subcelular y la expresión de las proteínas GLI, de forma independiente a Shh⁶⁷ y por el otro lado, la activación del PDGF α producido por activación de la vía Shh induciría la vía Erk⁶⁸. Como podemos observar, las interacciones de las diferentes vías son complejas y todavía no se conoce con detalle cada una de las interacciones que tienen lugar.

HIPÓTESIS

1. La teoría más aceptada sobre el origen del carcinoma basocelular es que deriva de las células madre de la vaina radicular externa o del promontorio del folículo piloso bajo el estímulo mutagénico de la radiación ultravioleta. Esta teoría no explicaría el origen de los carcinomas basocelulares ubicados en zonas no fotoexpuestas como las axilas o el pubis ni el de áreas no pilosas como el pezón o la semimucosa vulvar, regiones con abundantes glándulas apocrinas y sebáceas. Los carcinomas basocelulares de estas localizaciones podrían derivar de células madre más evolucionadas, que ya han perdido el folículo piloso, las células madre sebáceas o apocrinas. El estímulo mutagénico podría ser hormonal como el de los carcinomas glandulares.
2. En múltiples tumores cutáneos se han detectado transición epitelio mesénquima (TEM) como en el carcinoma espinocelular y el melanoma. En el carcinoma basocelular la TEM no ha sido descrita. Diferentes grupos de investigación han descrito la presencia de marcadores de transición epitelio mesénquima en células de CBC. Además, tanto nuestro grupo como otros, han observado en cultivos celulares procedentes de CBC células con morfología fibroblastoide. Considerando todos estos resultados, nuestra hipótesis es que también podría existir TEM en el CBC.
3. Existen evidencias crecientes de la respuesta inmune innata y adquirida frente a múltiples carcinomas internos, como el cáncer de mama y el de colon. El cáncer en el que está más estudiada la inmunidad sería el melanoma. En el melanoma, existen tratamientos como vacunas y los nuevos fármacos anti-PD1 que consiguen en muchos casos la remisión temporal de las lesiones al reactivar la respuesta inmune del paciente. Este fenómeno se ha estudiado en pocas ocasiones en el carcinoma basocelular. La regresión en algunos casos de carcinoma basocelular, en especial el subtipo superficial, creemos que es debida a la respuesta inmune.
4. Un 60-70% de los carcinomas basocelulares superficiales responden al tratamiento con quimioterápicos tópicos como imiquimod o 5-fluorouracilo. Ingenol mebutato, un nuevo antineoplásico tópico, también debe ser eficaz. Estudiaremos su efectividad, seguridad y mecanismo de acción.

OBJETIVOS

1. Determinar el perfil de citoqueratinas de carcinomas basocelulares de distintas localizaciones: zonas de fotoexposición crónica (cara), de fotoexposición intermitente (tronco) y áreas no fotoexpuestas (axilas y genitales). Se incluirán también carcinomas basocelulares de áreas no pilosas (semimucosa vulvar y pezón). Las citoqueratinas se utilizan en dermatopatología para precisar el origen de tumores diferenciados o de metástasis de procedencia indeterminada.
2. Realizar cultivos *in vitro* de células procedentes de carcinoma basocelular para poder determinar mediante diferentes técnicas de biología molecular y celular la presencia de marcadores de transición epitelio mesénquima.
3. Para determinar la respuesta inmune frente al carcinoma basocelular pretendemos caracterizar el infiltrado inmunoinflamatorio de este tipo de carcinomas, observando las diferencias entre la zona de regresión tumoral y la zona tumoral.
4. Estudiar la eficacia y seguridad de ingenol mebutato tópico (0.05% en oclusión) en el carcinoma basocelular localizado en zonas de bajo riesgo (tronco y extremidades). Determinar el mecanismo de acción secuencial mirando las variaciones en la composición del infiltrado inmunoinflamatorio desde la biopsia antes del tratamiento, muestras controles, con las de los días 3, 10 y 30 tras el tratamiento.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

**Estudio del origen celular
del carcinoma basocelular
mediante la expresión de
citoqueratinas**

1. Introducción

Las citoqueratinas (CK) son el grupo mayor de filamentos intermedios y su principal función es asegurar la integridad de los tejidos epiteliales en condiciones de fuerza mecánica y de estrés no mecánico. Ello se consigue gracias a los mecanismos de adhesión célula-célula y célula-matriz, formados por los desmosomas y los hemidesmosomas que se acoplan al citoesqueleto celular de los filamentos intermedios¹. Gracias a esta adhesión se asegura la integridad mecánica de la barrera epidérmica. Las CK también son importantes en los procesos de migración celular, diferenciación y polarización de las células epiteliales y para la curación de las heridas, lo que se consigue gracias a un reordenamiento dinámico de la red de filamentos de queratina^{2,3,4,5}.

Las CK se expresan en los tejidos epiteliales y en los anejos cutáneos como el pelo y los apéndices epidérmicos. En los humanos las CK están codificadas en 54 genes y se subclasifican en tipo I (CK9–CK40) y tipo II (CK1–CK8, CK71–CK86)⁶. Forman heteropolímeros obligados de manera dependiente del contexto y la diferenciación. Comparten una estructura tripartida característica con un dominio central en forma de bastón α -helicoidal y 2 dominios terminales N/C cabeza/cola^{2,3}, Figura 1. Su dinámica, solubilidad y asociación con proteínas de unión está regulada por múltiples modificaciones post-traduccionales⁷. En términos de organización espacial, la red de queratinas se localiza en la región perinuclear y se extiende hasta la periferia. Normalmente están ancladas a los complejos de unión celular (desmosomas, uniones focales) que se establecen entre las células vecinas, pero también entre la célula y la matriz extracelular (hemidesmosomas) a través de proteínas de unión⁸.

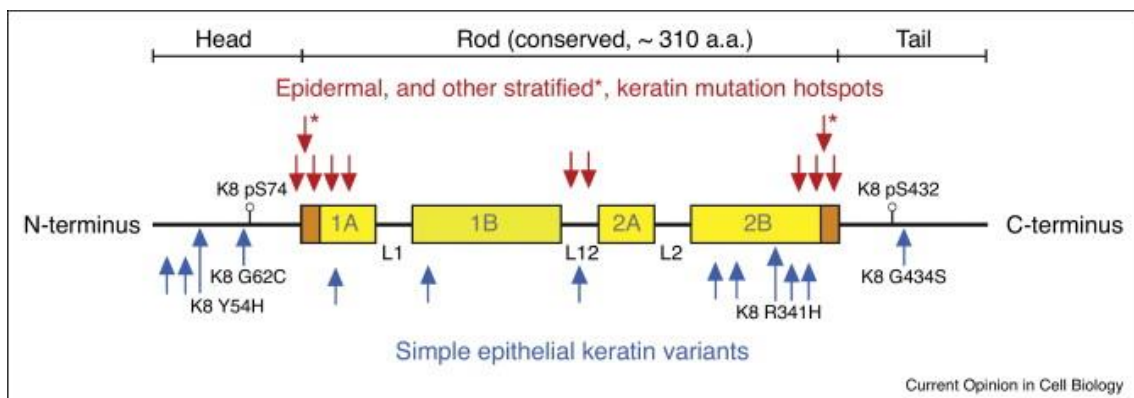


Figura 1. Esquema de la estructura tripartida de las citoqueratinas⁸.

Las células tumorales retienen la expresión de citoqueratinas específicas de la célula epitelial de la que proceden durante el proceso de dediferenciación tumoral^{5,9}, pero por otra parte, en ciertas enfermedades y en situaciones de estrés celular, puede producirse una neoexpresión. Debido a este hecho, las citoqueratinas son utilizadas como marcadores para establecer el diagnóstico y la subclasificación de tumores y sus metástasis, así como también pueden ser marcadores de otras enfermedades no neoplásicas^{10,11,12}.

Existen más de 60 queratinopatías que están ligadas a cambios hereditarios de las queratinas. Las mutaciones en las citoqueratinas epidérmicas (CK1/CK5/CK10/CK14) suelen ocurrir en las regiones más conservadas de las citoqueratinas (inicio y final del dominio en bastón) y son causantes de enfermedades cutáneas raras, mientras que los defectos en CK3/CK12 y CK4/CK13 causan las queratinopatías corneales y orales, respectivamente, figura 2. Por el contrario, cambios en CK8/CK18 se encuentran en áreas menos conservadas, figura 1, y son factores de riesgo para enfermedades hepáticas, figura 2. Se discute una asociación entre variantes de CK19 y CK8/CK18 con la enfermedad inflamatoria intestinal^{4,5,13-15}. En un estudio también se implicó una variante frecuente de la CK5 como un factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma basocelular¹⁶. La complejidad de las modificaciones genéticas en las queratinopatías es tal que incluso mutaciones en el mismo gen de queratina, o incluso en el mismo residuo, pueden producir diferentes patologías, por ejemplo la mutación en CK5 da lugar a la epidermólisis ampollosa, a la enfermedad de Dowling Degos o a la enfermedad de Galli-Galli, mientras que diversas mutaciones en CK1 subyacen en diferentes síndromes de hiperqueratosis, lo que significa que la susceptibilidad individual sería un codeterminante a la hora de desarrollar una enfermedad u otra ante una misma mutación^{4,17}.

En enfermedades no tumorales las CK pueden resultar de utilidad como por ejemplo en la cirrosis biliar primaria donde se observa una expresión aberrante de la CK7. Otro ejemplo sería en el pulmón, donde las citoqueratinas podrían servir para definir el subtipo de fibrosis pulmonar idiopática⁸.

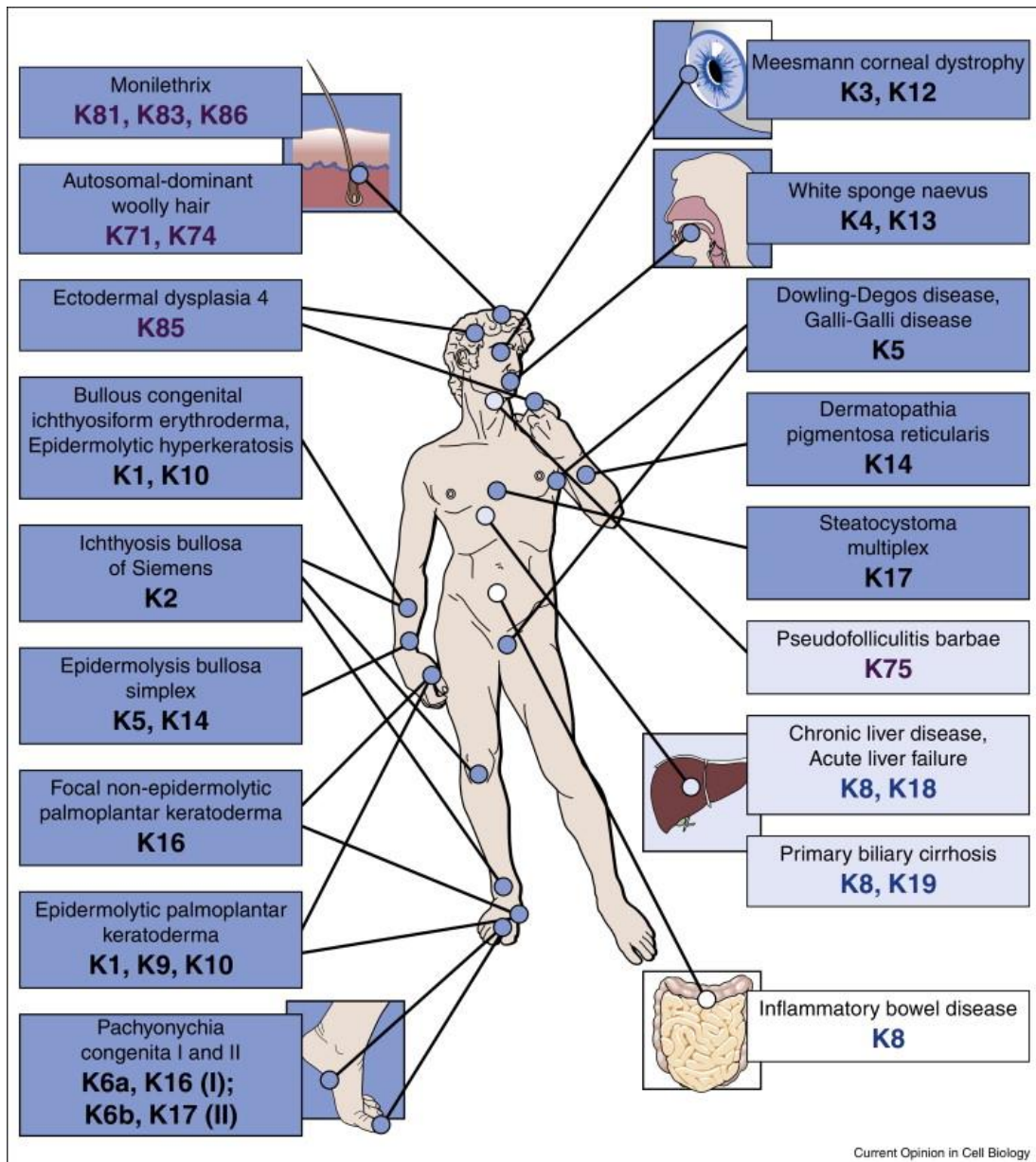


Figura 2. Principales enfermedades producidas por alteraciones en las citoqueratinas⁸.

1.1. Citoqueratinas como marcadores tumorales

Además del papel de marcador de cáncer, las citoqueratinas actúan como reguladores activos multifuncionales de la carcinogénesis¹⁰. Como hemos comentado, existen mecanismos moleculares por los que ciertas queratinas regulan la adhesión, la migración y la inflamación, procesos cruciales para la carcinogénesis y las metástasis. Por ejemplo, la CK17 promueve el crecimiento tumoral al polarizar la respuesta inmune en la piel¹⁸. La pérdida de la fosforilación de la CK8 confiere un mayor potencial metastásico al carcinoma epidermoide oral y al carcinoma colorrectal^{19,20}. Otros estudios muestran que la depleción de CK8/CK18 conduce a un aumento de la

migración colectiva y la invasividad de las células de cáncer de mama, en concordancia con la pérdida de citoqueratinas durante la transición epitelio mesénquima (TEM)^{21,22}, mientras que la expresión de CK19 en los carcinomas hepatocelulares humanos se correlaciona con el aumento de la invasividad y las metástasis²³.

La detección mediante inmunohistoquímica de CK se ha convertido en una técnica de rutina en los servicios de anatomía patológica para la caracterización de muestras tumorales. Por ejemplo, en el cáncer de vejiga la expresión de CK5, CK14 y CK20 distinguen 3 subtipos diferentes de tumores, los que expresan CK14 serían los más indiferenciados y con peor pronóstico²⁴. En el cáncer de mama, la positividad de CK5/6, CK14 y CK17 es característica del subtipo basaloide de comportamiento agresivo y de mal pronóstico²⁵. El marcador basal CK16 se ha asociado con peor pronóstico en el cáncer de mama triple negativo²⁶. La expresión de CK17 puede sugerir un mal pronóstico en el cáncer de cérvix²⁷ y en los adenocarcinomas gástricos²⁸.

Las citoqueratinas también permiten detectar la diseminación de los tumores. Por ejemplo, en cáncer de mama el uso de determinadas citoqueratinas en la biopsia de ganglio centinela se utiliza para saber si existe afectación ganglionar, ya que eso repercutirá en el estadiaje. Las CK también son los marcadores más útiles para detectar células de tumores circulantes (CTCs) en sangre^{29,30} ya que sus fragmentos se liberan en sangre con el daño celular⁵. Las concentraciones séricas de TPS/M65, un fragmento derivado de la CK18, refleja la carga tumoral y puede predecir el pronóstico de pacientes con cáncer de mama o de colon^{31,32}. Del mismo modo, CYFRA 21-1 (fragmento soluble de la CK19) estima la respuesta al tratamiento y la supervivencia en pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña³³.

Por otro lado, el cáncer metastásico de origen desconocido es una de las 10 causas más prevalentes de cáncer y generalmente se acompaña de muy mal pronóstico, al no poder dirigir el tratamiento contra una diana terapéutica conocida. Sin embargo, los pacientes con cáncer metastásico cuyo tumor primario es conocido pueden someterse a terapias dirigidas que se acompañan de mejor pronóstico que los pacientes con cáncer metastásico de origen desconocido. Los patólogos utilizan de rutina una batería de inmunohistoquímica en la que se determinan una serie de citoqueratinas para poder averiguar el origen celular de las células tumorales de metástasis cuyo tumor

primario es desconocido^{9,34} y así determinar de qué órgano procede y poder dirigir la terapia contra la enfermedad.

1.2. Estudio del perfil de expresión de citoqueratinas en una serie de CBC en función del grado de fotoexposición solar y localización anatómica

Como ya hemos comentado, la teoría de las células madre del folículo piloso sería la más aceptada hoy en día. Sin embargo, la observación de 4 CBC vulvares, en el servicio de dermatología del Hospital Universitario Arnau de Vilanova, 3 de los cuales localizados en la semimucosa vulvar, área no pilosa³⁵, nos hizo plantear si en determinadas localizaciones y/o situaciones el CBC podría derivar de otras estructuras de la piel. Tras una revisión de la literatura al respecto³⁶⁻³⁸ vimos que algunos autores hipotetizaban un origen celular diferente. Por ejemplo, Alessi *et al.*³⁶ proponen que el CBC con diferenciación glandular podría derivar de células de la unidad sebáceo-apocrina. Para estudiar esta hipótesis determinamos en las 4 muestras de CBC de vulva la expresión de CK7 y CK19, citoqueratinas expresadas en el epitelio simple con diferenciación glandular como podemos encontrar en las glándulas sebáceas o las glándulas apocrinas. Encontramos que los 4 casos de CBC vulvar expresaban CK7, con intensidad máxima en 2 de ellos y moderada en los otros 2, y CK19, con intensidad moderada en 3 de los 4 casos y baja en 1 de los casos³⁵. Concluimos que los CBC de localización vulvar, área no fotoexpuesta y no pilosa, podrían tener origen en las células madre del epitelio glandular, CK7 positivo, como son las glándulas sebáceas o la unidad apocrina y que los agentes causantes que lo originarían deberían ser diferentes a los de la RUV³⁵.

Este estudio preliminar dio origen a un segundo trabajo que ha sido publicado³⁹, con una muestra más amplia, en el que estudiamos una serie de CBC de diferentes localizaciones anatómicas, incluyendo áreas fotoexpuestas y no fotoexpuestas y ampliamos el número de citoqueratinas a estudiar. La hipótesis de partida fue que los CBC de zonas anatómicas fotoprotectidas, como la zona genital o la axilar, figura 3, y de zonas no pilosas, como el pezón o la semimucosa vulvar derivarían de células madre glandulares, sebáceas o apocrinas como hemos mencionado anteriormente, figura 4 (a,c). Para ello seleccionamos un grupo de 30 CBC nodulares con fotoexposición crónica localizados en la cara, 22 CBC superficiales con fotoexposición intermitente

localizados en el tronco (incluyendo un CBC del pezón de un varón, zona no pilosa), y los comparamos con 15 CBC de zonas no fotoexpuestas (región genital y axilar) que comprendían diferentes subtipos histológicos (superficial, infiltrante y nodular). El objetivo era constatar si aquellos CBC localizados en regiones no fotoexpuestas presentaban un perfil de expresión de CK diferentes al resto que pudiera orientar a un origen glandular, ya que tanto la zona genital como la zona axilar se caracterizan por la presencia de un gran número de glándulas apocrinas y sebáceas.

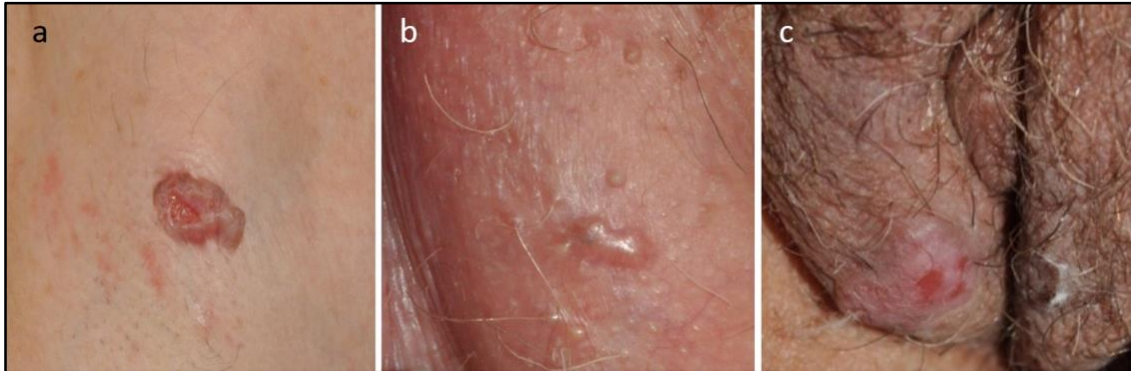


Figura 3. (a) CBC localizados en axila. (b y c) CBC localizados en región genital. Zonas anatómicas fotoprotegidas con abundante número de glándulas sebáceas y apocrinas.

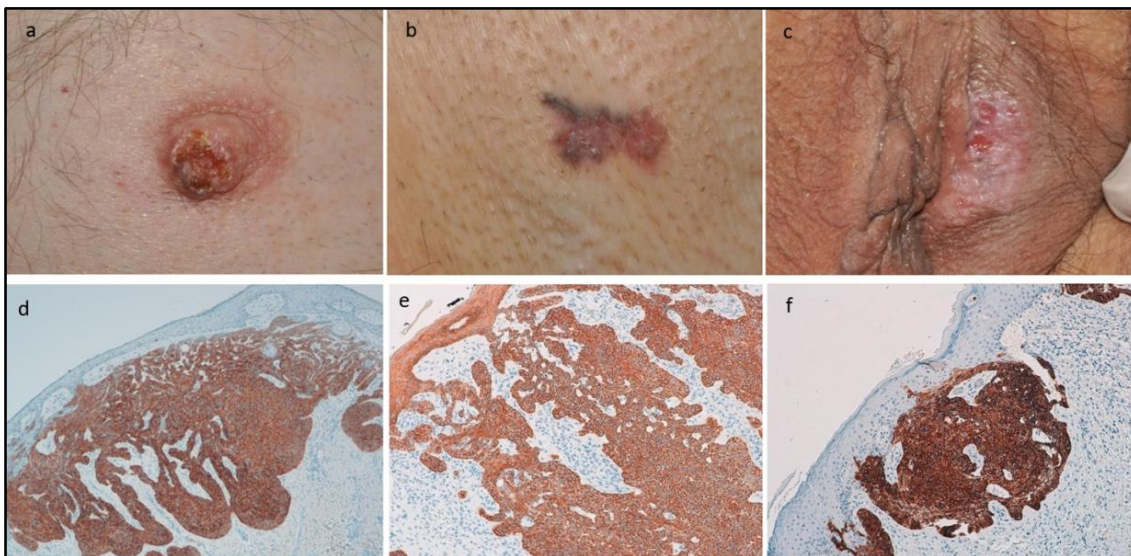


Figura 4. (a,d) Imagen clínica de un CBC localizado en el pezón de un varón con alta expresión de CK7. (b,e) Imagen clínica de un CBC localizado en axila con alta expresión de CK7. (c,f) Imagen clínica de un CBC localizado en cara interna del labio mayor de una mujer con intensa expresión de CK7.

Se han llevado a cabo varios estudios para evaluar la expresión de citoqueratinas en el CBC^{36,40-43}, comparando el perfil de CK en diferentes variantes clínicas e histopatológicas de CBC sin que se hayan constatado diferencias significativas entre los diversos subtipos³⁶. Ahora bien, no hemos encontrado ningún estudio que haya evaluado el perfil de expresión de CK en el CBC en relación con el grado de exposición a la luz solar y la localización anatómica.

2. Material y métodos

El estudio comprendía un total de 67 muestras de biopsias cutáneas obtenidas de los archivos de anatomía patológica del Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida y el Biobanco del Instituto Biomédico de Investigación "IRBLleida" (inscrita en el Registro Nacional de Biobancos del Instituto de Salud Carlos III de Madrid con el número de referencia B.0000682 y autorizada por el Departamento de Salud de la Generalitat de Cataluña a partir del 29 de abril de 2013). El Biobanco garantiza la trazabilidad y calidad de las muestras, el proceso de consentimiento realizado de acuerdo con los protocolos aprobados por el Comité Ético Local siguiendo los principios básicos de respeto al individuo, gestión del riesgo operacional, del riesgo-beneficio y las directrices de Buenas prácticas clínicas de la Declaración de Helsinki (Asociación Médica Mundial, 1964).

Las muestras incluidas en el estudio se seleccionaron en función de la zona anatómica en la que había aparecido el CBC, incluyendo 30 muestras de CBC nodulares de áreas de fotoexposición crónica como la cara (Grupo 1), 22 CBC superficiales de áreas de fotoexposición intermitente (tronco) incluyéndose en este grupo un caso de CBC en el pezón de un hombre (Grupo 2) y 15 CBC en áreas no fotoexpuestas como axilas y genitales, incluyendo 5 CBC vulvares (zona pilosa), 4 CBC localizados en la parte interna de los labios mayores (zona no pilosa), 1 CBC en el perineo, 1 CBC en el pubis femenino, 1 CBC en el seno femenino y 3 CBC en las axilas (Grupo 3). Se registraron los siguientes datos de los pacientes de los que obtuvimos muestra de CBC: sexo, edad, elastosis solar, diferenciación tumoral, subtipo tumoral y localización anatómica.

Siguiendo un protocolo sistemático, se evaluó un panel de rasgos histopatológicos ciegamente por dos observadores independientes. Los CBC se clasificaron como CBC superficial, nodular o infiltrante. Los bloques de tejido se seccionaron con un grosor de

3 μm , se secaron durante 1 hora a 65° antes del tratamiento previo de desparafinización, rehidratación y recuperación de epítipo en el Módulo de Pretratamiento, PT-LINK (DAKO) a 95°C durante 20 min en 50 x Tris/EDTA, pH 9. Antes de teñir las secciones, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena. Se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-citoqueratina contra CK5/6 (DAKO, Glostrup, Dinamarca), CK7 (DAKO, Glostrup, Dinamarca), CK14 (Leica, Newcastle, Reino Unido), CK15 (Leica, Newcastle, Reino Unido), CK17 (Glostrup, Dinamarca) y CK19 (DAKO, Glostrup, Dinamarca)⁴⁴, tabla 1. Después de la incubación, la reacción se visualizó con el Kit de Detección EnVision™ FLEX (DAKO, Glostrup, Dinamarca) usando cromógeno de diaminobenzidina como sustrato. Las secciones se contrastaron con hematoxilina. Los resultados inmunohistoquímicos se evaluaron siguiendo criterios uniformes preestablecidos. La inmunoexpresión se clasificó semicuantitativamente mediante el cálculo del *Histoscore* considerando el porcentaje de células teñidas (0%, 25%, 50%, 75% y 100%) e intensidad de la tinción (negativa: 0, leve: 1, moderada: 2; intensa: 3). El *Histoscore* era el resultado de la multiplicación del porcentaje de células teñidas por la intensidad, siendo el valor máximo de 300 y el mínimo de 0. Los resultados de este *Histoscore* fueron sometidos a análisis estadístico. La media y la desviación estándar se calcularon para definir los niveles de inmunoexpresión. Los test de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis se utilizaron convenientemente para evaluar las diferencias entre los tipos de muestra. También se utilizó un modelo lineal para ajustar las variables potencialmente confusas (sexo y edad). Se ajustó un modelo de regresión logística multivariante para determinar el perfil molecular asociado a la fotoexposición. Se realizó un análisis de sensibilidad y especificidad para evaluar su reproducibilidad, calculando el área bajo la curva ROC. Todos los análisis se realizaron utilizando el paquete estadístico R y el umbral de significación se estableció en el 5% ($\alpha = 0.05$). Se analizaron como objetivo secundario otros datos histopatológicos como la diferenciación tumoral (folicular, apocrina/ecrina o sebácea) y el subtipo de carcinoma basocelular para correlacionarlo con la expresión de CK. El grado de elastosis solar fue evaluado por un patólogo y los referidos como positivos se clasificaron como elastosis leve, la presencia de fibras elastóticas sueltas, sin formar agregados y como elastosis severa, la presencia de agregados de fibras elastóticas.

Antígeno	Clon (Anticuerpo)	Dilución	Fuente	Dianas cutáneas
CK 5/6	D5/16 B4	Ready to Use	DAKO, Glostrup, Denmark	Epidermis (Capa basal y suprabasal), folículo piloso (excepto la vaina interna), glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas (excepto las células secretoras)
CK 7	OV-TL 12/30	Ready to Use	DAKO, Glostrup, Denmark	Glándulas sebáceas (sebocitos y células indiferenciadas) y glándulas sudoríparas (células secretoras)
CK 14	LL002	1:100	Leica, Newcastle, United Kingdom	Epidermis (excepto la capa córnea), folículo piloso (excepto la vaina interna), glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas (excepto las células secretoras)
CK 15	LHK15	1:100	Leica, Newcastle, United Kingdom	Folículo piloso (en la protuberancia y las células germinativas), glándulas sebáceas (en las células indiferenciadas) y glándulas sudoríparas (solo en las células secretoras)
CK 17	E3	Ready to Use	DAKO, Glostrup, Denmark	Folículo piloso (Istmo y vaina externa) y glándulas sebáceas (solo los ductos sebáceos)
CK 19	RCK108	Ready to Use	DAKO, Glostrup, Denmark	Folículo piloso (protuberancia y células germinativas) y glándulas sudoríparas (solo las células secretoras)

Tabla 1. Perfil de expresión de CK en piel normal y anticuerpos usados en la inmunohistoquímica⁴⁴.

3. Resultados

La expresión de CK5/6 mostró diferencias significativas dependiendo de la localización anatómica del CBC (valor de p-ajustado = 0.0002), tabla 2. Se detectaron niveles de expresión más altos para CK5/6 en las lesiones faciales (Grupo 1), en el tronco (Grupo 2) la expresión fue más baja, mientras que los CBC de zonas no fotoexpuestas

mostraron un nivel intermedio de expresión de CK5/6. La expresión de CK7 mostró también diferencias estadísticamente significativas dependiendo de la localización del CBC (valor de p-ajustado = 0.009) tabla 2. La mayoría de las muestras de CBC de zonas anatómicas no fotoexpuestas (Grupo 3) mostraron altos niveles de expresión de CK7, mientras que los tumores localizados en cara (Grupo 1) y tronco (Grupo 2) mostraron escasa o nula expresión de CK7, figura 5: a,b,d,e. Curiosamente, en 5 de las 30 muestras faciales, se detectaron niveles máximos de CK7, lo que sugiere que pueden existir diferentes subconjuntos de CBC faciales nodulares con respecto a la expresión de CK7, figura 5: c,f. En los 4 casos de CBC localizados en semimucosa vulvar, cara interna de labios mayores, un área no fotoexpuesta carente de folículos pilosos, la expresión de CK7 fue positiva, figura 4: c, f, como también lo fue en el CBC del pezón, otra área sin pelo derivada de una glándula apocrina, aunque situada en un zona de fotoexposición intermitente, figura 4: a, d. Además, en la axila, una zona no fotoexpuesta donde hay abundancia de glándulas apocrinas, la expresión de CK7 también fue altamente positiva, figura 4: b, e. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de CK14, CK15, CK17 y CK19 entre los tres grupos.

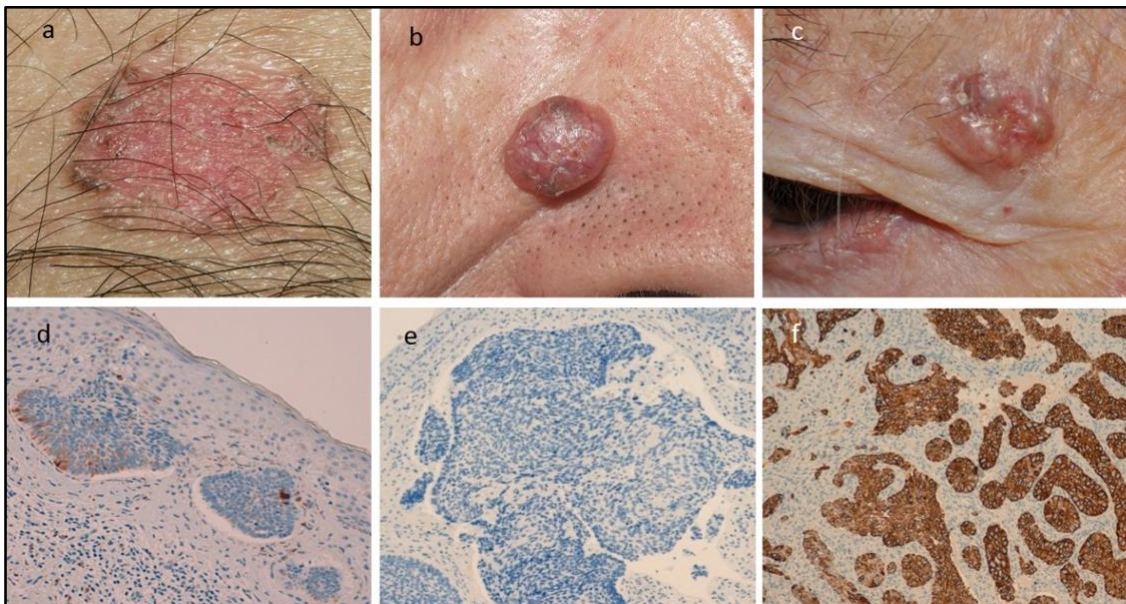


Figura 5. (a,d) CBC superficial localizado en tronco con baja expresión de CK7. (b,e) CBC nodular de localización facial sin expresión de CK7. (c,f) CBC nodular de localización facial con intensa expresión de CK7.

CK	Total	Clasificación de los grupos			p-valor	p-valor ajustado
	n=67 (100%)	Cara n=30 (44.78%)	No fotoexpuesto n=15 (22.39%)	Tronco n=22 (33.84%)		
CK7	107.46(109.15)	91.67(114.7)	181.67(104.57)	78.41(82.48)	0.005	0.009
CK5/6	158.21(68.17)	192.50(36.64)	150.00(88.14)	117.05(63.80)	0.0001	0.0002
CK19	47.39(66.02)	47.50(67.71)	66.67(78.87)	34.09(52.64)	0.25	0.34
CK14	215.67(51.65)	223.33(43.02)	203.33(81.21)	213.64(35.13)	0.6	0.43
CK17	209.33(65.83)	214.17(54.81)	196.67(76.69)	211.36(73.49)	0.65	0.69
CK15	24.22(42.72)	25.00(49.10)	42.86(51.36)	10.71(14.94)	0.2	0.10

Tabla 2. Expresión diferencial de CK en relación a la localización tumoral. Media y desviación estándar para cada marcador, evaluado con el test de Kruskal-Wallis. P-valor ajustado por sexo y edad obtenido con test de ANOVA.

Posteriormente, con el fin de evaluar las posibles diferencias en la expresión de citoqueratinas entre las zonas foto expuestas y las no foto expuestas, se reagruparon los Grupos 1 y 2 como un solo grupo (grupo de CBC foto expuestos) y se compararon los resultados con el Grupo 3 (grupo no foto expuesto), tabla 3. No se detectaron diferencias en cuanto a la expresión de CK5/6 teniendo en cuenta el grado de foto exposición solar. Solo se detectaron diferencias significativas para el *Histoscore* de CK7 (valor de p-valor ajustado = 0.002). Los niveles de *Histoscore* fueron de 86.06 (\pm 101.63) en áreas fotoexpuestas, mientras que en áreas no fotoexpuestas fueron de 181.67 (\pm 104.57). Por otra parte, como el grado de elastosis solar es una forma indirecta de medir la exposición solar y la exposición solar está relacionada con la localización anatómica del tumor, tal y como se esperaba, observamos los mismos resultados comparando la expresión de CK en función del grado de elastosis solar y la expresión de CK con la localización anatómica del tumor, tabla 4. Asimismo, para evaluar si los resultados obtenidos en el perfil de citoqueratinas de nuestra serie de CBC eran lo suficientemente robustos en cuanto a su relación con el grado de fotoexposición, determinamos la curva ROC, obteniendo un área bajo la curva de un 95% (AUC 0.95), lo que indica que el perfil de citoqueratinas estudiado permite predecir para un determinado CBC si se localiza en una zona fotoexpuesta o no fotoexpuesta en el 95 % de los casos, figura 6.

CK	Total n=67 (100%)	Fotoexpuesto n=52 (77.61%)	No fotoexpuesto n=15 (22.39%)	p-valor	p-valor ajustado
CK7	107.46(109.15)	86.06(101.63)	181.67 (104.57)	0.001	0.002
CK5/6	158.21(68.17)	160.58 (62.10)	150.00 (88.14)	0.58	0.60
CK19	47.39(66.02)	41.83 (61.58)	66.67 (78.87)	0.11	0.20
CK14	215.67(51.65)	219.23 (39.80)	203.33 (81.21)	0.51	0.28
CK17	209.33(65.83)	212.98 (62.72)	196.67 (76.69)	0.44	0.40
CK15	24.22(42.72)	19.00 (38.98)	42.86 (51.36)	0.08	0.06

Tabla 3. Inmunoexpresión de CK en relación a la localización del tumor. Media y desviación estándar presentada para cada marcador, evaluación de las diferencias con el test de Kruskal-Wallis. P-valor ajustado por sexo y edad obtenido con test de ANOVA.

CK	Total	Elastosis solar + /++ /+++	No elastosis	p-valor
CK7	107.46(109.15)	81.58(98.93)	145.24(102.35)	0.007
CK5/6	158.21(68.17)	166.45(61.04)	125.00(75.00)	0.02
CK19	47.39(66.02)	40.79(58.82)	59.52(78.05)	0.45
CK14	215.67(51.65)	226.32(44.63)	192.86(59.76)	0.02
CK17	209.33(65.83)	221.05(67.67)	191.67(72.17)	0.18
CK15	24.22(42.72)	18.75(37.02)	26.25(36.70)	0.31

Tabla 4. Asociación entre elastosis solar y niveles de expresión de citoqueratinas. Se muestran la media y la desviación estándar. Los valores de P del test de Mann-Whitney se muestran para evaluar la relación.

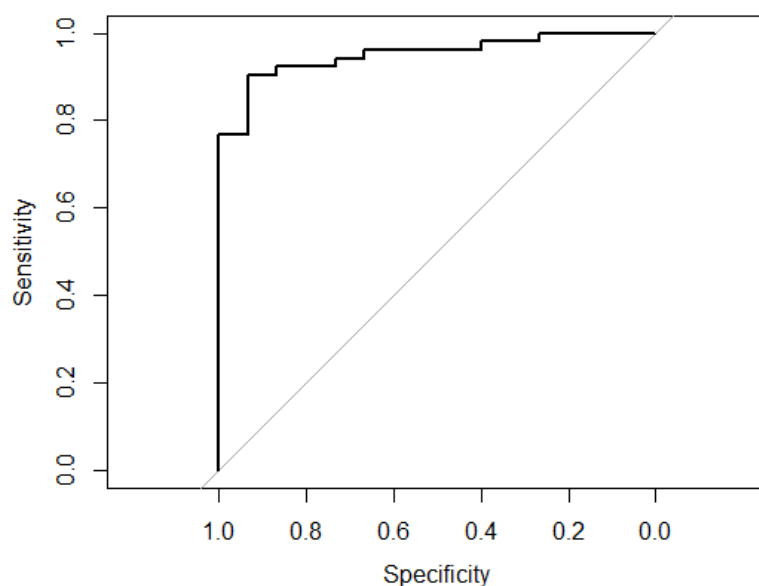


Figura 6. Curva ROC para evaluar el valor predictivo del modelo de regresión logística multivariante para discriminar las muestras correspondientes a zonas fotoexpuestas frente a zonas no fotoexpuestas. Estimación del área bajo la curva (AUV) = 0.9513. Este modelo matemático permite predecir correctamente para un determinado carcinoma basocelular si se localiza en una zona fotoexpuesta o en una zona no-fotoexpuesta, según el perfil de citoqueratinas (CK5/6, CK7, CK14, CK17, CK19) en el 95,13% de los casos.

Entre otros objetivos secundarios, se miró si el perfil de CK se correlacionaba con el sexo o también con la edad. Como era de esperar, no se detectó ninguna relación entre esos factores excepto para CK14. Curiosamente, la CK14 muestra una diferencia estadísticamente significativa cuando se compara el perfil de expresión de CK con el sexo, tabla 5. El *Histoscore* medio de CK14 fue ligeramente mayor en las mujeres, pero no encontramos una explicación a este resultado.

Además hemos evaluado la correlación de citoqueratinas con el subtipo histológico de CBC con independencia de la localización anatómica. Hemos observado una asociación estadísticamente significativa de la expresión de CK5/6 y el subtipo histológico. El *Histoscore* medio de la CK5/6 fue mayor en los CBC nodulares en comparación con los superficiales, tabla 6.

CK	Total	Sexo		p-valor
		Mujer	Varón	
CK7	107.46 (109.15)	117.50(109.66)	92.59(108.71)	0.18
CK5/6	158.21 (68.17)	159.38(71.77)	156.48(63.77)	0.94
CK19	47.39(66.02)	44.38(65.16)	51.85(68.26)	0.74
CK14	215.67(51.65)	226.25(60.96)	200.00(27.74)	0.02
CK17	209.33(65.83)	216.25(64.69)	199.07(67.40)	0.35
CK15	24.22(42.72)	27.70(50.27)	19.44(29.69)	0.9

Tabla 5. Asociación de sexo con la expresión de citoqueratinas. Se muestran la media y la desviación estándar. Los valores de P se obtuvieron con el test de Mann-Whitney.

CK	Total	Subtipo CBC			p-valor
		Nodular	Superficial	Infiltrante	
CK7	107.46 (109.15)	103.68 (120.94)	108.33 (94.99)	141.67 (137.69)	0.46
CK5/6	158,21 (68,17)	196.32 (46.11)	115.00 (64.53)	158.33 (72.17)	<0.00001
CK19	47.39 (66.02)	46.32 (64.59)	48.33 (70.69)	50.00 (50.00)	0.89
CK14	215.67 (51.65)	222.06 (51.04)	206.67 (52.08)	233.33 (57.74)	0.52
CK17	209.33 (65.83)	219.12 (53.68)	199.17 (79.73)	200.00 (0.00)	0.81
CK15	24.22 (42.72)	25.76 (48.20)	18.75 (29.36)	58.33 (80.36)	0.55

Tabla 6. Asociación de subtipo de CBC con nivel de expresión de citoqueratinas. Se muestran la media y la desviación estándar. Los valores de P se obtuvieron con el test de Mann-Whitney. Obsérvese que la CK5/6 alcanza la significación estadística, siendo su expresión más intensa en los CBC nodulares.

Finalmente, hemos evaluado la relación entre la expresión de CK con el patrón de diferenciación tumoral. Las muestras, analizadas junto al patólogo, se clasificaron en 3 grupos de diferenciación tumoral: folicular (11 muestras), apocrina/ecrina (11 muestras) y sebácea (3 muestras). En total, el 37% de las muestras mostraron diferenciación anexial. Nuestros datos muestran que la CK7 está altamente expresada en CBC con diferenciación apocrina/ecrina, tabla 7. Sin embargo, se necesitaría mayor tamaño muestral para mejorar los resultados del análisis estadístico.

CK	Total	Diferenciación tumoral				p-valor
		Apocrina/Ecrina	Folicular	Sebácea	Ausencia diferenciación	
CK7	107.46(109.15)	206.82(88.81)	68.18(90.20)	41.67(14.43)	96.43(108.42)	0.007
CK5.6	158.21(68.17)	143.18(86.67)	175.00(55.90)	200.00(0.00)	154.76(67.90)	0.36
CK19	47.39(66.02)	72.73(89.76)	18.18(31.80)	83.33 (76.38)	45.83 (63.42)	0.21
CK14	215.67(51.65)	190.91(83.12)	236.36(50.45)	200.00(0.00)	217.86(41.06)	0.34
CK17	209.33(65.83)	195.45(90.70)	220.45(40.03)	266.67(57.74)	205.95(63.87)	0.34
CK15	24.22(42.72)	42.50(45.72)	45.45(61.05)	0.00(0.00)	15.62(34.29)	0.04

Tabla 7. Asociación de diferenciación tumoral con nivel de expresión de citoqueratinas. Se muestran la media y la desviación estándar. Los valores de P se obtuvieron con el test de Mann-Whitney.

4. Discusión

Las similitudes histológicas entre algunos tumores foliculares y el CBC junto con la baja frecuencia de CBC localizados en zonas no pilosas^{45,46} y el hallazgo de la expresión de CK15, marcador de células madre foliculares⁴¹, en la mayoría de CBC, parecen apoyar la teoría que ubica al origen celular del CBC en las células madre de la vaina radicular externa y de la protuberancia del folículo piloso. Aunque también se ha hipotetizado un posible origen en el epitelio interfolicular, esta teoría no está tan aceptada ni existe tanta evidencia⁴⁷⁻⁴⁹.

Se han estudiado extensamente las alteraciones moleculares que subyacen en el CBC tal y como se ha explicado en el apartado de la introducción de la presente tesis doctoral. En el síndrome de Gorlin, un trastorno genético autosómico dominante caracterizado por el desarrollo temprano de CBC múltiples, se ha observado una mutación constitutiva de la vía Shh junto con la pérdida de la función inhibitoria del receptor de membrana Ptch1. En función de las series revisadas, entre el 40 al 60 % de todos los CBC esporádicos, presentan alteración de la vía Shh. Del 20 al 40% de los casos es debido a una doble mutación en el gen supresor tumoral PTCH1 y entre el 10 al 20% sucede por una sola mutación en el oncogén SMO⁵⁰⁻⁵³. La RUV puede inducir mutaciones deletéreas en uno o ambos alelos dando lugar a la activación de la vía Shh. En raros casos, se han encontrado alteraciones de la vía Wnt, y la participación de β -catenina o la vía ERK (MAPK)⁵⁴⁻⁵⁵.

Pero el CBC también puede aparecer en áreas no expuestas al sol, como la axila o la región genital, y el papel etiopatogénico único de la RUV quedaría en entredicho. Además, en raras ocasiones, se observa que el CBC se desarrolle en áreas sin pelo, como la semimucosa vulvar o el pezón, originando algunas controversias respecto a su origen folicular.

El perfil de citoqueratinas se ha utilizado para establecer el origen tisular del tumor, ya que se conserva comúnmente durante la transformación cancerosa. En este trabajo, el perfil de CK que encontramos sugiere un origen glandular de los CBC ubicados en áreas no fotoexpuestas y no pilosas. Hemos comparado los patrones de expresión de las citoqueratinas en una serie de CBC que surgen en zonas de fotoexposición crónica, CBC que se desarrollan en zonas de fotoexposición aguda e intermitente y CBC que surgen en áreas no fotoexpuestas. No hemos encontrado estudios anteriores publicados que comparen la expresión de CK en el CBC respecto a la localización anatómica o el grado de exposición a la luz solar.

La CK7 se trata de una CK que se expresa principalmente en las células secretoras de las glándulas apocrinas y de las glándulas sebáceas⁴⁴. Muestra una mayor expresión en zonas anatómicas no expuestas a la luz solar y específicamente en áreas ricas en glándulas apocrinas como las regiones genitales, axilares y el pezón. La expresión de CK7 se observa generalmente en epitelios glandulares tales como el epitelio ductal mamario, el pancreático y el urotelial. La CK7 se expresa también en tumores derivados de las glándulas apocrinas y sebáceas^{36,44} y se considera un marcador de la enfermedad de Paget mamaria y extra-mamaria^{56,57}. Podría especularse la posibilidad de que el CBC que se desarrolla en zonas ricas de glándulas apocrinas como la axila y la zona púbica pueda tener un origen común en las células madre de la unidad apocrina. Se han publicado menos de cien casos de CBC axilares en la literatura^{58,59}, pero en ninguno de ellos se ha evaluado el perfil de CK. Una situación similar se da en el caso del CBC del complejo areola-pezón³⁷, una zona rica en glándulas apocrinas y carente de folículos pilosos⁶⁰ en la que también hemos observado una intensa expresión de CK7, figura 4 (a,d). Entre otras regiones no fotoexpuestas, los CBC desarrollados en la parte interna de los labios mayores vulvares, otra zona no pilosa con abundantes glándulas sebáceas no canónicas y sin rastro de glándulas apocrinas, también se ha observado

una alta expresión de CK7, figura 4 (c,f), una característica que también puede sugerir un posible origen en la célula madre de la glándula sebácea^{35, 61}.

Por otro lado, en nuestra serie, 14 de los 30 CBC nodulares faciales fueron CK7 negativos, mientras que 5 de 30 mostraron una expresión de CK7 máxima (*Histoscore* de 300). Sugerimos que estos CBC faciales podrían originarse de células con diferenciación sebácea. Alessi *et al.*³⁶ realizaron un análisis de una serie de CBC mostrando que solo un subgrupo de CBC, los CBC con diferenciación anexial, mostraron una alta positividad de CK7 (88%), mientras que en los otros subgrupos la positividad para CK7 fue de solo el 42%. Estos autores postularon un posible origen glandular de algunos CBC. Congruentemente con estos resultados, nosotros hemos observado diferenciación apocrina/ecrina en algunos CBC de zonas no expuestas al sol y diferenciación folicular en CBC faciales, fotoexposición crónica. Hemos obtenido significación estadística en relación a la expresión de CK7 y la diferenciación tumoral, apocrina/ecrina en los CBC de nuestra serie. Estos resultados apoyan nuestra propuesta, pero creemos que la compilación de muestras adicionales (es decir, CBC expuestos al sol con diferenciación ecrina o sebácea) será requerida en trabajos futuros para confirmar estos resultados, tabla 7.

En nuestro estudio no hemos sido capaces de detectar una correlación entre la CK7 y la CK19. Este hecho ha sido descrito previamente por otros autores⁴⁴. Hemos observado niveles bajos de CK15, un marcador potencial de las células madre del promontorio del pelo⁴¹, en todos los CBC estudiados. Resultados similares se han descrito en estudios previos^{41,44}. Sin embargo, los niveles de *Histoscore* de CK15 y 19 fueron mayores en las regiones no fotoexpuestas, aunque ello no fue estadísticamente significativo, tabla 3. Ambas citoqueratinas se expresan en las células secretoras de las glándulas sudoríparas⁴⁴ y en la protuberancia del folículo piloso. Como se informó en otros estudios, la CK17 fue positiva en todos los CBC estudiados^{36,42,62-64}. La CK17 es un marcador de diferenciación folicular y su expresión es débilmente positiva en la parte superior de la vaina externa de la raíz del folículo piloso y también se expresa en la porción profunda. La expresión de CK14 también fue positiva en todos los CBC estudiados^{42,62-65}. La CK14 se expresó principalmente en la región de la envoltura externa subinfundibular del folículo piloso³⁶. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos evaluados con respecto a la expresión de esta CK.

Como objetivo secundario se han estudiado las diferencias en el perfil de CK en los diversos subtipos histopatológicos de CBC (CBC nodular, CBC superficial y CBC infiltrante). Hemos encontrado diferencias en la expresión de CK5/6 en el CBC nodular. Los CBC nodulares faciales mostraron niveles de CK5/6 superiores al resto de los grupos, pero esta asociación no se corroboró cuando se reagruparon y compararon los CBC en función del grado de fotoexposición, localizados en zonas fotoexpuestas y los CBC de localizaciones no fotoexpuestas, tabla 3. Puesto que hemos obtenido casi todos los CBC nodulares de la cara y la mayoría de los superficiales del tronco, se observa la misma asociación significativa con la expresión de CK5/6 y la localización anatómica y subtipo de CBC tabla 2 y 6. A partir de nuestros datos no podemos por tanto concluir si la asociación es debida a la localización anatómica o al subtipo histológico. Sin embargo, Alessi *et al* 2008³⁶ no encontraron ninguna asociación entre la expresión de CK5/6 y el subtipo histológico. Teniendo en cuenta estos datos, se abre la posibilidad de una expresión diferente de CK5/6 dependiendo de la localización anatómica y grado de exposición solar.

5. Bibliografía:

1. Osmani N, Labouesse M. Remodeling of keratin-coupled cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 32:30-8.
2. Haines RL, Lane EB: Keratins and disease at a glance. *J Cell sci* 2012; 125: 3923-3928.
3. Pan X, Hobbs RP, Coulombe PA: The expandint significance of keratin intermediate filaments in normal and diseased epithelia. *Curr Opin Cell Biol* 2013; 25:47-56.
4. McLean WH, Moore CB: Keratin disorders: from gene to therapy. *Hum Mol Genet* 2011; 20: R189-R197.
5. Strnad P, Paschke S, Jang KH, Ku NO: Keratins: markers and modulators of liver disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2012, 28: 209-216.
6. Loschke F, Seltmann K, Bouameur JE, Magin TM. Regulation of keratin network organization. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 32: 56-64.
7. Snider NT, Omary MB: Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15: 163-177.
8. Toivola DM, Boor P, Alam C, Strnad P. Keratins in health and disease. *Curr Opin Cell Biol* 2015; 32: 73-81.
9. Reyes García-De La Fuente M, Sanmartín-Novell V, Casanova-Seuma JM. Cutaneous metastasis from a pancreatic adenocarcinoma as a form of presentation of tumoral recurrence. *Gastroenterol Hepatol* 2014; 37: 299-301.
10. Karantza V: Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 2011; 30: 127-138.
11. Moll R, Divo M, Langbein L: The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 2008; 129: 705-733.

12. Ordonez NG: Broad-spectrum immunohistochemical epithelial markers: a review. *Hum Pathol* 2013; 44: 1195-1215.
13. Homberg M, Magin TM. Beyond expectations: novel insights into epidermal keratin function and regulation. *Int Rev Cell Mol Biol* 2014; 311: 265-306.
14. Omary MB, Ku NO, Strnad P, Hanada S. Toward unraveling the complexity of simple epithelial keratins in human disease. *J Clin Invest* 2009; 119: 1794-1805.
15. Coulombe PA, Lee CH. Defining keratin protein function in skin epithelia: epidermolysis bullosa simplex and its aftermath. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 763-775.
16. Stacey SN, Sulem P, Masson G, Gudjonsson SA, Thorleifsson G, Jakobsdottir M, Sigurdsson A, Gudbjartsson DF, Sigurgeirsson B, Benediktsdottir KR et al.: New common variants affecting susceptibility to basal cell carcinoma. *Nat Genet* 2009; 41: 909-914.
17. Arnold AW, Kiritsi D, Happle R, Kohlhase J, Hausser I, Bruckner-Tuderman L, Has C, Itin PH. Type 1 segmental Galli-Galli disease resulting from a previously unreported keratin 5 mutation. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 2100-2103.
18. Depianto D, Kerns ML, Dlugosz AA, Coulombe PA. Keratin 17 promotes epithelial proliferation and tumor growth by polarizing the immune response in skin. *Nat Genet* 2010; 42: 910-4.
19. Alam H, Gangadaran P, Bhate AV, Chaukar DA, Sawant SS, Tiwari R et al. Loss of keratin 8 phosphorylation leads to increased tumor progression and correlates with clinico-pathological parameters of OSCC patients. *PLoS One* 2011; 6:e27767.
20. N.Khapare, S.T. Kundu, L. Sehgal, M. Sawant, R. Priya, P. Gosavi, N. Gupta, H. Alam, M. Karkhanis, N.Naik, et al. Plakophilin3 loss leads to an increase in PRL3 levels promoting K8 dephosphorylation, which is required for transformation and metastasis. *PLoS One* 2012; 7:e38561.

21. A.M. Fortier, E. Asselin, M. Cadrin. Keratin 8 and 18 loss in epithelial cancer cells increases collective cell migration and cisplatin sensitivity through claudin1 up-regulation. *J Biol Chem* 2013; 288: 11555-11571.
22. Lyer SV, Dange PP, Alam H, Sawant SS, Ingle AD, Borges AM *et al.* Understanding the role of keratins 8 and 18 in neoplastic potential of breast cancer derived cell lines. *PLoS One* 2013; 8: e53532.
23. Govaere O, Komuta M, Berkers J, Spee B, Janssen C, de Luca F *et al.* Keratin 19: a key role player in the invasion of human hepatocellular carcinomas. *Gut* 2014; 63: 674-85.
24. Volkmer JP, Sahoo D, Chin RK, Ho PL, Tang C, Kurtova AV *et al.* Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109: 2078-2083.
25. Valentin MD, da Silva SD, Privat M, Alaoui-Jamali M, Bignon YJ. Molecular insights on basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134: 21-30.
26. Yu KD, Zhu R, Zhan M, Rodriguez AA, Yang W, Wong S *et al.* Identification of prognosis-relevant subgroups in patients with chemoresistant triple-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2013; 19: 2723-2733.
27. Escobar-Hoyos LF, Yang J, Zhu, Cavallo JA, Zhai H, Burke S *et al.* KR. Keratin 17 in premalignant and malignant squamous lesions of the cervix: proteomic discovery and immunohistochemical validation as a diagnostic and prognostic biomarker. *Mod Pathol* 2014; 27: 621-630.
28. Ide M, Kato T, Ogata K, Mochiki E, Kuwano H, Oyama T. Keratin 17 expression correlates with tumor progression and poor prognosis in gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2012; 19: 3506-3514.
29. Alix-Panabieres C, Pantel K. Circulating tumor cells: liquid biopsy of cancer. *Clin Chem* 2013; 59: 110-118.

30. Weissenstein U, Schumann A, Reif M, Link S, Toffol-Schmidt UD, Heusser P. Detection of circulating tumor cells in blood of metastatic breast cancer patients using a combination of cytokeratin and EpCAM antibodies. *BMC Cancer* 2012; 12: 206.
31. Ahn SK, Moon HG, Ko E, Kim HS, Shin HC, Kim J *et al.* Preoperative serum tissue polypeptide-specific antigen is a valuable prognostic marker in breast cancer. *Int J Cancer* 2013; 132: 875-881.
32. Greystoke A, Dean E, Saunders MP, Cummings J, Hughes A, Ranson M *et al.* Multi-level evidence that circulating CK 18 is a biomarker of tumour burden in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2012; 107: 1518-1524.
33. Schneider J. Tumor markers in detection of lung cancer. *Adv Clin Chem* 2006; 42: 1-41.
34. Conner JR, Hornick JL. Metastatic carcinoma of unknown primary: diagnostic approach using immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol* 2015; 22: 149-67.
35. García-de-la-Fuente MR, Santacana M, Vilardell F, Pujol RM, Gari E, Casanova JM. Vulvar Basal Cell Carcinoma: Four Case Reports With Immunohistochemical Study. *J Cutan Med Surg* 2017; 21: 457-9.
36. Alessi E, Venegoni L, Fanoni D, Berti E. Cytokeratin profile in basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 2008; 30: 249-55.
37. Chun KA, Cohen PR. Basal Cell Carcinoma of the Nipple-Areola Complex: A Comprehensive Review of the World Literature. *Dermatol Ther* 2016; 6: 379-95.
38. Cohen PR. Axillary basal cell carcinoma in patients with Goltz-Gorlin syndrome: report of basal cell carcinoma in both axilla of a woman with basal cell nevus syndrome and literature review. *Dermatol Online J* 2014; 20: 13030.
39. García de la Fuente MR, Santacana M, Valls J, Vilardell F, Fernández-Armenteros JM; Pujol R, Garí E, Casanova JM. Cytokeratin Profile of Basal Cell Carcinomas

- According to the Degree of Sun Exposure and to the Anatomical Localization. *Am J Dermatopathol* 2017; Nov 1. doi: 10.1097/DAD.0000000000001042. (Epub ahead of print).
40. Sellheyer K. Basal cell carcinoma: cell of origin, cancer stem cell hypothesis and stem cell markers. *Br J Dermatol* 2011; 164: 696-711.
 41. Abbas O, Bhawan J. Expression of stem cell markers nestin and cytokeratin 15 and 19 in cutaneous malignancies. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 311-6.
 42. Kurzen H, Esposito L, Langbein L, Hartschuh W. Cytokeratins as markers of follicular differentiation: an immunohistochemical study of trichoblastoma and basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 2001; 23: 501-9.
 43. Hida T, Saga K, Kimura T. Cytokeratin expression patterns in multiple infundibulocystic basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 2011; 38: 309-13.
 44. Ansai S, Arase S, Kawana S, Kimura T. Immunohistochemical findings of sebaceous carcinoma and sebaceoma: retrieval of cytokeratin expression by a panel of anti-cytokeratin monoclonal antibodies. *J Dermatol* 2011; 38: 951-8.
 45. Donovan J. Review of the hair follicle origin hypothesis for basal cell carcinoma. *Dermatol Surgery* 2009; 35:1311–23.
 46. Grachtchouk M, Pero J, Yang SH, Ermilov AN, Michael LE, Wang A et al. Basal cell carcinomas in mice arise from hair follicle stem cells and multiple epithelial progenitor populations. *J Clin Invest* 2011; 121:1768–81.
 47. Zackheim, HS. Origin of the human basal cell epithelioma. *J Invest Dermatol* 1963; 40: 283-97.
 48. Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y et al. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat cell Biol* 2010; 12: 299-305.

49. Panteleyev AA, Rosenbach T, Paus R, Christiano AM. The bulge is the source of cellular renewal in the sebaceous gland of mouse skin. *Arch Dermatol Res* 2000; 292: 573-6.
50. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol* 2006; 19 Suppl 2: S127-47.
51. Lacour JP. Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms. *Br J Dermatol* 2002; 146 Suppl 61: 17-19.
52. Wicking C, Smyth I, Bale A. The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene* 1999; 18: 7844-51.
53. Daya-Grosjean L, Couvé-Privat S. Sonic hedgehog signalling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett* 2005; 225: 1814-92.
54. Aguayo RS, Rafel M, Santacana M, Fernández RM, Sanmartín V, Casanova JM *et al.* β -catenin and cyclin D1 expression in Gli1-independent basal cell carcinomas. *Eur J Dermatol* 2013; 23: 734-6.
55. Aguayo RS, Rafel M, Santacana M, Fusté NP, Garí E. Erk 1/2 activation in stromal fibroblasts from sporadic basal cell carcinomas. *Dermatol Surg* 2015; 41: 677-84.
56. Böer-Auer A, August C, Falk TM, Jung JE, Kohl K, Metze D. Benign mucinous metaplasia of the genital mucosa: histomorphological and immunohistochemical features and criteria for differentiation from extramammary Paget disease. *Br J Dermatol* 2011; 165: 1263-72.
57. Hendi A, Perdakis G, Snow JL. Unifocality of extramammary Paget disease. *J Am Acad Dermatol* 2008; 59: 811-13.
58. Wani GM, Ahmad SM, Qayoom S, Khursheed B. Neglected Basal cell carcinoma in axilla. *J IMA* 2012; pii: 44-1-9224. doi: 10.5915/44-1-9224.

59. Betti R, Crosti C, Moneghini L, Crespi E, Menni S. Axillary basal cell carcinoma: additional 25 patients and considerations. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 858-60.
60. Zucca-Matthes G, Urban C, Vallejo A. Anatomy of the nipple and breast ducts. *Gland Surg* 2016; 5: 32-6.
61. Reuter k, Niemann C. The Sebaceous Gland Stem Cell Niche. In "Stem cell Biology and Regenerative Medicine". Springer International Publishing Switzerland; 2015. pp. 27-43.
62. Asada M, Schaart FM, de Almeida HL Jr, Korge B, Kurokawa, Asada Y et al. Solid basal cell epiteloma (BCE) possibly originates from the outer root sheath of the hair follicle. *Acta Derm Venereol* 1993; 73: 286-292.
63. Schirren CG, Rütten A, Kaudewitz P, Diez C, McClain S, Burgdorf WH. Trichoblastoma and basal cell carcinoma are neoplasms with follicular differentiation sharing the same profile of cytokeratin intermediate filaments. *Am J Dermatopathol* 1997; 19:341-350.
64. Apaydin R, Gürbüz Y, Bayramgürler D, Bilen N. Cytokeratin contents of basal cell carcinoma, epidermis overlying tumour, and associated stromal amyloidosis: an immunohistochemical study. *Amyloid* 2005; 12:41-47.
65. Krüger K, Blume-Peytavi U, Orfanos CE. Basal cell carcinoma possibly originates from the outer root sheath and/or the bulge region of the vellus hair follicle. *Arch Dermatol Res* 1999; 291: 253-259.

CAPÍTULO 2

**Estudio de la transición
epitelio mesénquima en los
carcinomas basocelulares**

1. Introducción: Estudio de la transición epitelio mesénquima en los carcinomas basocelulares

1.1. Transición epitelio mesénquima

La transición epitelio mesénquima (TEM) es el proceso mediante el cual una célula diferenciada como es la célula epitelial se transforma en una célula indiferenciada adoptando una morfología fibroblastoide y adquiriendo unos patrones de expresión génica propios de las células mesenquimales.

Las células que han experimentado la TEM, gracias a los cambios morfológicos son capaces de aumentar su movilidad y su diseminación a otros territorios anatómicos. Estos cambios morfológicos en la célula tienen lugar gracias a la pérdida de E-cadherina y a la reorganización de las citoqueratinas, aumentando la expresión de proteínas mesenquimales como la fibronectina y la vimentina. La célula cada vez presenta mayor facilidad en su movilización y por lo tanto aumenta su capacidad migratoria¹.

La TEM constituye un proceso fisiológico durante el desarrollo embrionario y en la vida adulta durante la reparación de las heridas. Sin embargo, es un proceso que también tiene lugar durante la carcinogénesis y el desarrollo de metástasis a partir de neoplasias de estirpe epitelial, figura 1.

Los tumores cuyas células son capaces de realizar TEM presentan una mayor progresión tumoral, incrementándose su capacidad invasiva y metastásica. Las células que experimentan TEM presentan mayor resistencia a diferentes tratamientos como la quimioterapia, la radioterapia y algunas terapias contra dianas moleculares².

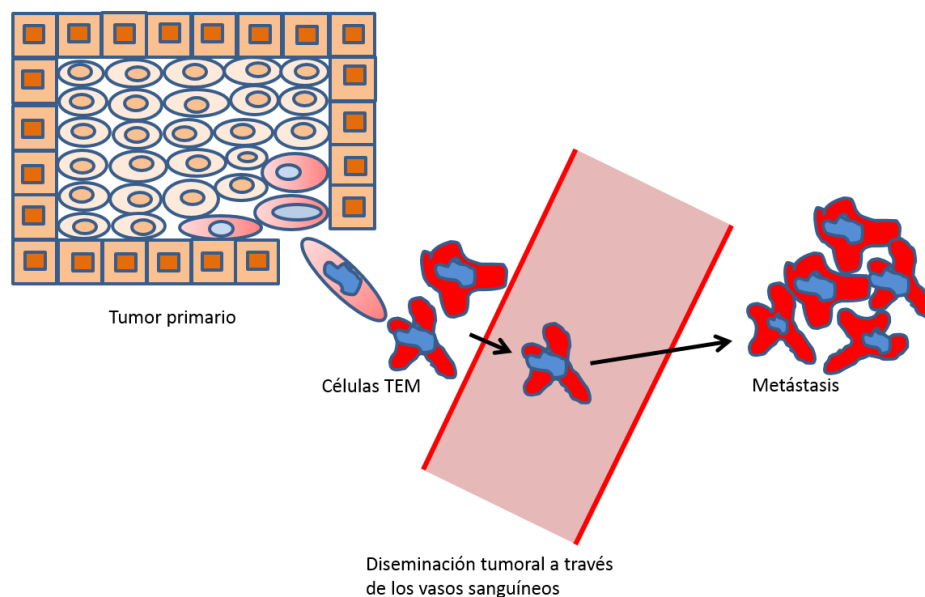


Figura 1. Esquema TEM. Obsérvese como las células del tumor primario son capaces de desdiferenciarse adoptando un fenotipo fibroblastoide y diseminarse a través de la circulación a otros órganos produciendo metástasis.

Los propios fibroblastos del estroma tumoral, fibroblastos asociados a cáncer, las células endoteliales y las células cancerosas son capaces de secretar un conjunto de mediadores bioquímicos que facilitan que se establezca la TEM¹. El principal factor estimulante de la TEM es el TGF- β . Todo este conjunto celular que permite la TEM se conoce como secretoma tumoral asociado a TEM. El TGF- β es una citocina multifuncional, que actúa como supresor tumoral en las células epiteliales normales y en las fases iniciales del crecimiento tumoral, pero resulta ser un potente factor promotor del tumor en fases avanzadas y en la fase metastásica aumentando la angiogénesis, reclutando fibroblastos e inmunocitos, suprimiendo la respuesta inmune antitumoral, aumentando la secreción de proteasas extracelulares como las metaloproteasas, promoviendo el remodelado de la célula tumoral, induciendo la migración y la invasión, en definitiva induciendo la TEM³.

La TEM se establece a partir de una cascada de regulación transcripcional inducida por TGF- β . En una primera etapa la presencia de TGF- β induce la fosforilación y translocación al núcleo del complejo regulador Smad. Posteriormente Smad activa la transcripción del represor Snail que a su vez inhibe la transcripción de E-cadherina que se trata de una proteína que compone las uniones adherentes, figura 2. La inhibición de E-cadherina tiene dos consecuencias principales, por un lado se pierden las uniones adherentes que caracterizan el tejido epitelial, y por otro lado se libera la β -catenina

que está asociada a las uniones intercelulares. Finalmente, la β -catenina libre en el citoplasma es capaz de translocarse al núcleo formando un complejo con las proteínas Irf/TCF que inducen la transcripción de genes que regulan entre otros el ciclo celular, como MYC, ciclina D1 y metaloproteinasas de matriz extracelular, implicadas en la degradación estromal. La consecuencia global es una reorganización del citoesqueleto y la adquisición de movilidad celular, que justificaría la migración y la invasión tumoral. Es importante tener en cuenta que otras señalizaciones a través de las rutas del TNF- β o Sonic hedgehog también inducen la transcripción del represor Snail, y por tanto también ayudarían en la activación de la TEM o a una respuesta similar. Por ejemplo, se ha detectado sinergias entre TGF- β y TNF- α en la inducción de la TEM en cultivos de queratinocitos humanos⁴. La sola adición de TGF- β provoca la TEM en queratinocitos normales pero los cambios morfológicos y la presencia de marcadores son mucho más exacerbados con la adición conjunta de TNF- α .

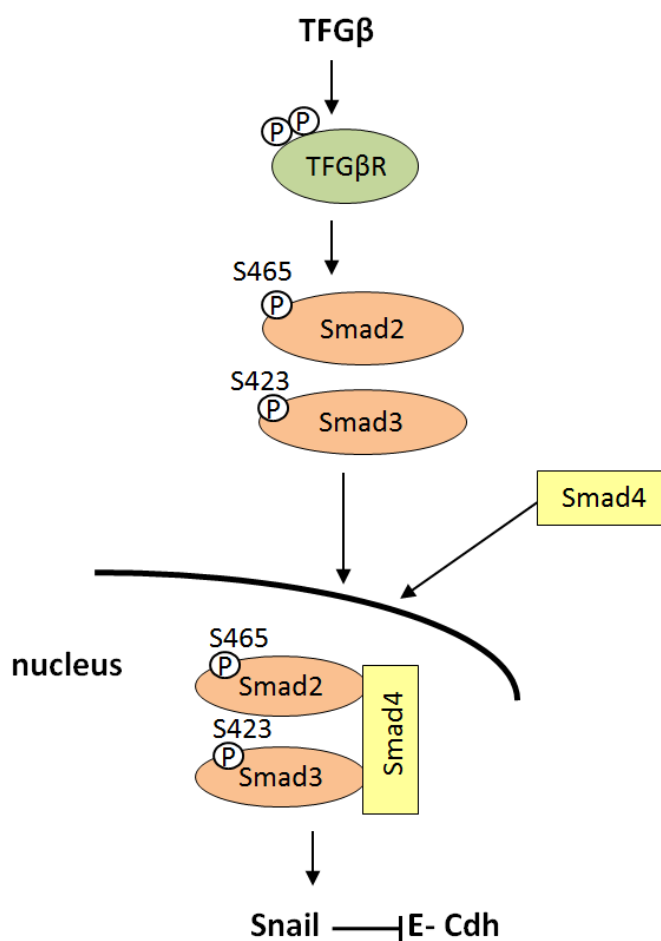


Figura 2. Esquema de la vía activadora de la transición epitelio mesénquima.

La transición epitelio mesénquima se ha descrito en algunos cánceres de piel como el melanoma^{5,6}, y el carcinoma escamoso⁷. En el CBC no existe consenso sobre la TEM, al igual que hay trabajos en los que se ha observado mediadores de la TEM mediante inmunohistoquímica, como Snail⁸, existen otros trabajos donde destacan que no se detecta este mismo marcador de TEM⁹. Esto indica la controversia sobre la TEM en el CBC, sin que de momento exista evidencia.

1.2. Fibroblastos peritumorales

Los fibroblastos son unas células de estirpe mesenquimal que se encuentran en el tejido conectivo y son las responsables de la síntesis de proteínas como el colágeno, la elastina, las fibras reticulares, y los glucosaminoglicanos que forman parte de la matriz extracelular de la mayor parte de tejidos. Entre otras funciones los fibroblastos son fundamentales en los procesos de curación de las heridas⁹.

Hasta hace poco se pensaba que los fibroblastos eran unas células que no participaban en el proceso de la carcinogénesis, sin embargo, esto no es así. Se ha comprobado que los fibroblastos participan activamente en la carcinogénesis mediante síntesis de diferentes quimiocinas y citocinas en el ambiente tumoral. El tumor, consistente en un conjunto de células que se reproducen incontroladamente y por lo tanto son consumidoras de oxígeno y nutrientes, hace que se origine un ambiente tumoral anóxico y pobre en nutrientes donde solo las células tumorales son capaces de sobrevivir e incluso multiplicarse. La célula tumoral y el estroma tumoral donde encontramos los fibroblastos son capaces de secretar una serie de señales paracrinas y autocrinas que resultan en la síntesis de unos factores de crecimiento que permiten el proceso de la neoangiogénesis. Gracias a la neoangiogénesis el tumor tiene asegurado el aporte de oxígeno y nutrientes para seguir creciendo. Cabe destacar que a la vez que se asegura el aporte de nutrientes y oxígeno a través de los nuevos vasos sanguíneos formados, estos mismos constituyen el canal por el cual algunas de las células tumorales se pueden escapar y llegar a órganos lejanos de donde se ha originado el tumor primario formando las metástasis.

Cada vez más, se le da importancia al fibroblasto en el proceso de la carcinogénesis denominándolos fibroblastos asociados a cáncer. Los fibroblastos asociados a cáncer no son más que aquellos fibroblastos situados alrededor del tumor que en un

momento determinado, condicionados por el ambiente tumoral y las señales químicas emitidas por las células cancerígenas, se transformarían en fibroblastos asociados a cáncer y sintetizarían una serie de factores que promoverían la carcinogénesis como se ha explicado anteriormente¹⁰.

Existen estudios que han caracterizado los fibroblastos asociados al carcinoma basocelular y se ha podido comprobar que presentan algunas características que los hace diferentes al resto de fibroblastos del tejido sano como veremos más adelante. Existe un trabajo en el que describen fibroblastos asociados a cáncer en el CBC¹⁰. Sin embargo, no se han llegado a definir las diferencias entre fibroblastos asociados a cáncer y las células de transición epitelio mesénquima, simplemente se puede afirmar que los fibroblastos localizados alrededor de los nidos tumorales presentan unas características diferenciales al resto de fibroblastos en el caso del CBC, como luego veremos.

1.3. Nestina, marcador de células madre y de TEM.

La nestina consiste en una proteína, concretamente se trata de un filamento intermedio que se expresa en el citoplasma de las células neuroepiteliales¹¹. La nestina funciona como marcador de célula madre mesenquimal y en la piel postnatal la nestina se expresa casi exclusivamente en el mesénquima perifolicular y en el citoplasma de las células endoteliales de los pequeños vasos que la irrigan^{12, 13}. Clásicamente había sido reconocida como marcador de célula progenitora del sistema nervioso central¹⁴⁻¹⁶. Recientemente este marcador ha ayudado a identificar a las células madre derivadas de la cresta neural presentes en el bulbo del folículo piloso en modelos murinos¹⁷⁻²⁰. Diversos estudios han demostrado poblaciones celulares de células madre en el bulbo folicular y en la vaina del tejido conectivo, en las glándulas sudoríparas y en menor grado en la dermis interfolicular. En las neoplasias cutáneas, se ha demostrado expresión de nestina en el melanoma, en tumores cutáneos de la vaina nerviosa periférica, como el tumor maligno de la vaina del nervio periférico, y también los tumores mesenquimales como el dermatofibrosarcoma protuberans²¹⁻²⁴. En la piel normal nestina se expresa en el citoplasma de las células endoteliales²⁵. Aunque en un principio se utilizó nestina como marcador de células madre del bulbo folicular en modelos murinos, no se ha podido utilizar en piel humana. En humanos, nestina se

expresa en el componente mesenquimal del folículo piloso del tejido conectivo de la vaina papilar²⁶⁻³⁰. Al parecer en piel humana, nestina no estaría relacionada con las células madre de los queratinocitos sino con las células madre del tejido mesenquimal. Lo que puede significar que nestina esté involucrada en el desarrollo del estroma de los CBC, pero no sería marcadora de célula madre de CBC ni tampoco sería marcador del bulbo del folículo piloso.

También se ha visto que nestina es un marcador de mal pronóstico en muchos tumores sólidos en humanos. Nestina regula la invasión celular en cáncer de próstata³¹ y la transición epitelio-mesénquima en adenocarcinoma de páncreas³². Actualmente se considera un buen marcador para determinar células desdiferenciadas y TEM.

2. Material y métodos

2.1. Cultivos celulares

Hasta ahora no existe un protocolo establecido para el cultivo de las células tumorales procedentes del CBC. Nosotros utilizamos el siguiente protocolo, considerándolo el más adecuado para las características de la muestra.

Los CBC se obtenían del quirófano del servicio de dermatología del Hospital Universitario Arnau de Vilanova de Lleida, previo consentimiento de cada uno de los pacientes y con la aprobación del comité ético del hospital.

Las muestras eran obtenidas mediante curetaje de la parte más superficial del tumor y guardadas en medio de cultivo para queratinocitos (*Defined Keratinocyte-SFM GIBCO-Invitrogene with Gentamicine 5 µg/ml and Growth supplement (10 µg/ml)*) a 4°C hasta su procesamiento en los laboratorios del “Institut de Recerca Biomèdica” de Lleida (IRBLleida). Todas las muestras fueron identificadas con la abreviación de carcinoma basocelular en mayúsculas (CBC) seguido del número de muestra obtenida, de tal modo que obtuvimos 25 cultivos celulares, enumerados desde el CBC1 al CBC25. Se recogieron los principales datos epidemiológicos como la edad, el sexo, la localización anatómica y el tamaño de la pieza quirúrgica obtenida tras la exéresis tumoral. Previamente hicimos 5 cultivos de prueba para poner a punto la técnica que no fueron registrados. Todos estos datos están recogidos en la tabla 1.

Muestra	Subtipo histológico	Edad (años)	Sexo	Localización	Tamaño ^(a)
CBC1	Nodular	80	Varón	Región laterocervical izquierda	8 mm x 8 mm
CBC2	Nodular	74	Varón	Sien derecha	8 mm x 5 mm
CBC3	Infiltrante, desmoplasia estromal leve	77	Mujer	Región interiliar	13 mm x 8 mm
CBC4	Infiltrante, desmoplasia estromal leve	73	Varón	Dorso nasal	13 mm x 11 mm
CBC5	Nodular	59	Varón	Temporal izquierda	35 mm x 15 mm
CBC6	Nodular	80	Mujer	Margen interno ojo izquierdo	12 mm x 10 mm
CBC7	Superficial	89	Varón	Región laterocervical izquierda	35 mm x 25 mm
CBC8	Superficial	89	Varón	Región laterocervical derecha	20 mm x 10 mm
CBC9	Infiltrante, desmoplasia estromal moderada	93	Mujer	Región temporal derecha	25 mm x 20 mm

CBC10	Infiltrante, desmoplasia estromal leve	68	Mujer	Región frontal izquierda	20 mm x 10 mm
CBC11	Infiltrante, desmoplasia estromal leve	88	Varón	Región periocular izquierda	21 mm x 13 mm
CBC12	Nodular	94	Varón	Surco nasogeniano izquierdo	18 mm x 11 mm
CBC13	Nodular	82	Varón	Sien izquierda	21 mm x 9 mm
CBC14	Nodular	47	Mujer	Escápula izquierda	22 mm x 10 mm
CBC15	Infiltrante, desmoplasia estromal moderada	87	Mujer	Sien derecha	33 mm x 21 mm
CBC16	Nodular	67	Mujer	Ala nasal	11 mm x 13 mm
CBC17	Nodular	73	Varón	Región auricular derecha	26 mm x 9 mm
CBC18	Infiltrante, desmoplasia estromal leve	88	Mujer	Canto interno ojo derecho	15 mm x 15 mm
CBC19	Infiltrante, desmoplasia estromal	73	Varón	Región retroauricular izquierda	20 mm x 30 mm

	moderada				
CBC20	Nodular	85	Varón	Maxilar inferior	16 mm x 6 mm
CBC21	Infiltrante, desmoplasia estromal leve	87	Mujer	Sien derecha	32 mm x 20 mm
CBC22	Piel sana control de la muestra CBC21	87	Mujer	Sien derecha	32 mm x 20 mm
CBC23	Nodular	64	Varón	Sien derecha	13 mm x 13 mm
CBC24	Nodular	73	Mujer	Cuero cabelludo	10 mm x 12 mm
CBC25	Nodular	76	Varón	Periocular izquierda	12 mm x 11 mm

- (a) Tamaño de la cuña cutánea extirpada mediante cirugía que contenía el CBC del cual se extrajo muestra mediante curetaje: valor del mayor diámetro longitudinal en (mm) X el mayor diámetro transversal en (mm).

Tabla 1. Datos epidemiológicos de los CBC utilizados en los cultivos celulares.

Las muestras fueron procesadas en la campana de bioseguridad II, al tratarse de muestras humanas. En la campana de bioseguridad se lavaban las muestras 3 veces con solución PBS-EDTA (0.2g/L EDTAX2Na sin calcio ni magnesio). Posteriormente si las muestras tumorales procedían de una biopsia en sacabocados, se procedía a retirar la hipodermis de la masa tumoral, las muestras procedentes de curetaje superficial no requerían dicho paso al tratarse exclusivamente de masa tumoral. Habitualmente trabajábamos con muestras obtenidas por curetaje superficial del tumor, ya que nos permitía plantar la mayor cantidad de células y evitar contaminar los cultivos con fibroblastos dérmicos, obteniendo mejores resultados. Posteriormente sobre la masa tumoral obtenida se añadía 2 ml de dispasa (SIGMA, disuelto en medio 2.5 U/ml) a 37°C durante 15 minutos. Acto seguido la muestra volvía a ser lavada en PBS-EDTA 0.2g/L EDTAX2Na sin calcio ni magnesio. En este punto se procedía a arrancar la

epidermis de la dermis con pinzas para así quedarnos solo con el tumor, este paso solo se realizó en las escasas muestras que utilizamos procedentes de biopsia ya que las muestras obtenidas por curetaje no era necesario, al disponer solo de tumor. Una vez obtenida la masa tumoral, esta era traspasada a una placa de cultivo celular. En el pocillo se había añadido 300 μ l de tripsina (0.25% trypsin, 0.53 mM EDTAx4Na) y se dejaba incubar 15 minutos a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente pipeteábamos para ayudar a disgregar la epidermis (P1000). La muestra era pasada por un colador de 70 μ m a un tubo FALCON. Se paraba la reacción añadiendo al tubo FALCON 3 ml de inhibidor de tripsina (GIBCO-Invitrogene). Pasábamos la muestra a un tubo de ensayo y centrifugábamos a 1000 rpm durante 5 minutos. Aspirábamos el sobrenadante con pipeta Pasteur y añadíamos 1 ml de medio de queratinocitos para resuspender el pellet, previamente calentado a 37°C. Plantábamos 500 μ l de medio en placas de 4 pocillos. Las placas utilizadas presentaban colágeno como matriz extracelular, también se probaron placas con laminina pero no proporcionaron ventajas respecto a las placas con colágeno. Se observaba el aspecto de las células obtenidas en el microscopio óptico y se dejaba incubar a 37°C 5% CO₂ durante toda la noche, figura 3.

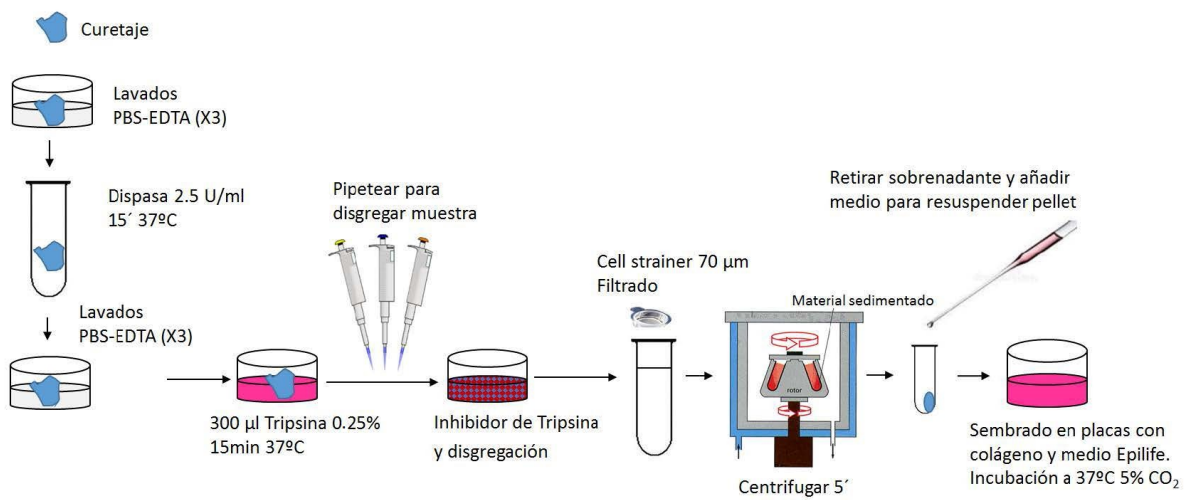


Figura 3. Esquema del protocolo utilizado para realizar el cultivo celular.

2.2. Inmunofluorescencia

Las células se lavaban en PBS y se fijaban con paraformaldehído a temperatura ambiente durante 15 minutos. Después, se lavaba cada pozo dos veces con PBS, se permeabilizaban las células con tritón al 0.2% durante 3 minutos a temperatura ambiente y se bloqueaban con BSA al 3% (Sigma) durante 30 minutos. El anticuerpo primario contra nestina era, Nestin BD611558, y se combinaba adecuadamente con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con D α M594. Se incubaban 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad, junto con Hoechst (Sigma) para teñir los núcleos. Se añadía Slow Fade para evitar que disminuyera la fluorescencia. Las imágenes se obtuvieron con el objetivo 10X y 20X del microscopio invertido Olympus IX71 y el programa DP Controller. Las imágenes confocales se obtuvieron con los objetivos 40X y 60X del microscopio FV1000i.

2.3. Inmunohistoquímica

Para estudiar el estroma tumoral, seleccionamos una serie de CBC del archivo histórico del Hospital Arnau de Vilanova de Lleida y determinamos mediante inmunohistoquímica la expresión de nestina.

La muestra se componía de 30 CBC nodulares faciales, 22 CBC superficiales de tronco y 15 CBC de regiones no fotoexpuestas (formado por un conjunto de CBC superficiales, nodulares e infiltrantes). Las muestras elegidas son las mismas que han sido utilizadas en el capítulo 1 de la presente tesis doctoral, en el estudio del perfil de expresión de citoqueratinas.

Se recuperaron los bloques con los tumores y fueron seccionados con un grosor de 3 μ m, secados durante 1 h a 65°C antes del pretratamiento de desparafinado, fueron rehidratadas y se recuperó el epítipo en el Módulo de pretratamiento, PT-LINK (DAKO) a 95°C durante 20 min en una solución tamponada 50 x Tris/EDTA, pH 9. Se dejaba enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 5 minutos. Antes de la tinción de las secciones, se bloqueó la peroxidasa endógena con la solución bloqueadora de peroxidasa ya comercializada (DAKO, Glostrup, Denmark). El anticuerpo utilizado se muestra en la tabla 2. Después de la incubación, la reacción se visualizó con el Kit de Detección Envision™ FLEX (DAKO, Glostrup, Dinamarca) utilizando el cromógeno diaminobencidina como sustrato. Las secciones fueron contrastadas con hematoxilina.

Los resultados de inmunohistoquímica se evaluaron siguiendo criterios uniformes preestablecidos.

Antígeno	Anticuerpo clon	Dilución	Fuente
Nestin	10C2	1:100	Thermo Scientific, Waltham, USA

Tabla 2. Anticuerpo utilizado en la inmunohistoquímica para la detección de nestina en las muestras de CBC.

2.4. Western blot

Mediante esta técnica se determina la presencia de proteínas específicas en una muestra determinada, generalmente en una mezcla compleja de proteínas o en un extracto tisular. Nosotros la hemos utilizado para determinar la presencia de nestina.

Mediante una electroforesis SDS-PAGE se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad o alguna propiedad fisicoquímica que diferencie la proteína del resto de proteínas de la mezcla.

Las proteínas son transferidas a una membrana absorbente de PVDF para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia, entre otros métodos. De esta misma forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto proteico y analizar su cantidad relativa respecto a las otras proteínas.

Las células de la placa de cultivo se lavan con PBS a 4°C y se recogen en el volumen necesario de 1xSR (*buffer* de lisis) (2% de SDS y Tris-HCl 0.125M cpm pH 6.8). Por ejemplo, se añade 60 µL de 1xSR por pozo en una placa de 4 pozos de 16 mm de diámetro o 100 µL de 1xSR por pozo en una placa de 6 pozos de 35 mm de diámetro, y se recogen con la punta de la pipeta o con un raspador. Seguidamente las células se sonicán a potencia de 8 durante 10 segundos (Soniprep 150 MSE) hasta que la muestra ya no esté viscosa. En ese momento se mide la cantidad de proteína con el *kit* de Bio-Rad DC™ Protein Assay para poder cargar la misma cantidad de cada muestra. Se añade el volumen correspondiente de 4xSS (20% de sacarosa y 0.02% de azul de bromofenol) hasta obtener una concentración final de 1xSS, y un 1% de β-mercaptoetanol. Finalmente las muestras se hierven durante 5 minutos a 95°C antes de cargarlas en un gel de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida se preparan a

partir de una solución formada por 30% de acrilamida y 2% de bis-acrilamida, y la polimerización de los geles se inicia por adición de TEMED como un iniciador de la reacción y persulfato amónico como un catalizador. El gel apilador contiene un porcentaje de acrilamida bajo (5%) y un pH ligeramente ácido (6.8). En esta parte se cargan las muestras, se empaquetan y salen todas las proteínas del mismo punto de partida. El gel separador es la parte donde las muestras se resuelven electroforéticamente, teniendo un pH básico (8.8) y el porcentaje de acrilamida que contiene será más alto o bajo dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar, habitualmente se utilizan geles del 10%.

La electroforesis en geles SDS-PAGE se utiliza para separar proteínas según su peso molecular en condiciones desnaturizantes. El dodecil sulfato sódico (SDS) es un detergente aniónico que desnaturiza las proteínas y les da una carga neta negativa. Cuando se aplica un campo eléctrico constante de 20 mA por gel dentro de una solución tampón electrolítica, las proteínas se mueven a través de una matriz porosa de poliacrilamida hacia el polo positivo dependiendo de su peso molecular. Nosotros utilizamos el sistema Miniprotean de Bio-Rad. Una vez las proteínas se han separado por electroforesis, se transfieren a una membrana de PVDF (Millipore). Para hidratar las membranas, primero se tratan con metanol y seguidamente se ponen a agitar con el tampón de transferencia que contiene 20% de metanol. Se utiliza el sistema de transferencia semi-seco y se aplica un campo eléctrico constante de 60 mA por gel. En la transferencia, donde se saca el gel apilador, las proteínas cargadas negativamente y desnaturizadas se desplazan desde el gel de acrilamida hacia el polo positivo y quedan retenidas en la membrana. Una vez las proteínas están transferidas, la membrana se bloquea con una solución formada por 5% de leche desnatada en PBST (PBS +0.1% de Tween20) durante 1 hora a temperatura ambiente para cubrir el resto de lugares donde no hay proteína transferida. La membrana se limpia con PBST y se incuba con el anticuerpo primario diluido en solución I (0.25% de leche desnatada en PBST) durante toda la noche a 4°C. Dependiendo del anticuerpo que utilicemos se hace una dilución determinada. Nosotros utilizamos el anticuerpo PSmad 2/3 rabbit cell signaling #8828 y el Anti- β -Actin (clone AC-15), en una dilución 1:1000. Se vuelve a lavar la membrana con PBST y se trata con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con la peroxidasa HRP (GE Healthcare UK Ltd), que rutinariamente se utiliza

en una dilución 1:10000 en solución I durante una hora a temperatura ambiente. Se hacen los últimos lavados con PBST y se incuba la membrana durante 5 minutos con el sustrato HRP quimioluminiscente Immobilon Western (Millipore). La quimioluminiscencia de las proteínas a estudiar se visualiza con el aparato ChemiDoc-MP Imaging System (Bio-Rad). La cuantificación de bandas se realiza con el software del mismo aparato.

3. Resultados

3.1. Cultivo celular de CBC.

El problema del cultivo de células procedentes de CBC es básicamente que las células mueren a los pocos días de cultivo normalmente después del primer pase, sin que conozcamos la causa. Pocos grupos han descrito este tipo de cultivo, sin embargo todos presentaban el mismo problema, las células morían a los pocos días sin que se conozca la razón^{33, 34}. En anteriores trabajos nuestro grupo ya había diseñado un protocolo para el cultivo de CBC³⁵ pero mostraba el mismo problema de viabilidad citado en la literatura. En el presente trabajo hemos intentado mejorar el modelo de cultivo y hemos modificado el protocolo en tres aspectos:

- 1) Obtención de la muestra a partir de curetaje y no de biopsia en sacabocados tipo *punch* para evitar contaminación por fibroblastos.
- 2) Tratamiento enzimático de la muestra primero con dispasa y luego con tripsina en ambos casos durante 15 minutos a 37°C. En el anterior protocolo la dispasa se dejaba actuar durante toda la noche a 4°C, este hecho probablemente afectaba la viabilidad.
- 3) Filtración celular después de añadir el inhibidor de tripsina.

Por consiguiente, en el presente trabajo hemos realizado una serie de modificaciones del protocolo de cultivo celular para adaptarlo a muestras tumorales obtenidas mediante curetaje y los resultados son mejores, obteniendo células procedentes de CBC capaces de durar hasta un máximo de 5 días en cultivo, lo que nunca se consiguió con el antiguo protocolo, figura 4.

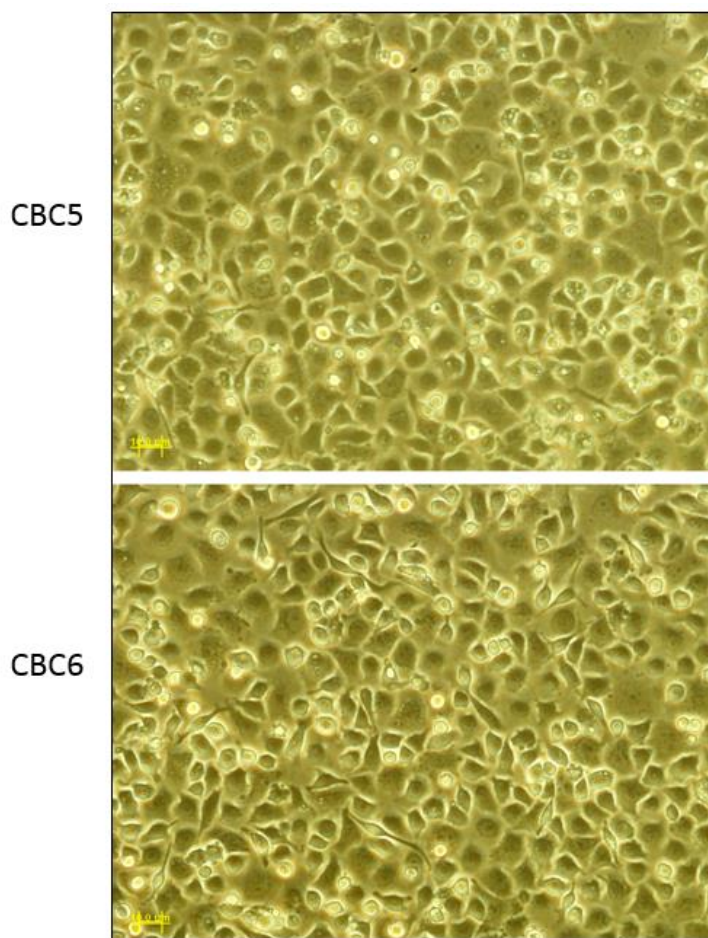


Figura 4. Células confluentes en cultivo procedentes de 2 CBC diferentes, CBC5 y CBC6 a los 4 días de haber sido plantadas.

Con este nuevo método no conseguíamos mantener viables las células en cultivo más de 5 días y después del primer pase las células perdían rápidamente viabilidad. Según un trabajo publicado³⁶, la citocina CXCL11 promueve la proliferación de las células procedentes de CBC en cultivo. En vista de este dato decidimos probar el efecto de la citocina CXCL11 en nuestro protocolo. Esta citocina era introducida al final del protocolo del cultivo de células tumorales procedentes de CBC. Se añadía 5 μ l de citocina en cada pocillo y se dejaba en la incubadora a 37^o C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Sin embargo, la utilización de dicha citocina no nos demostró ventajas respecto al resto de cultivos en los que no se utilizó, figura 5.

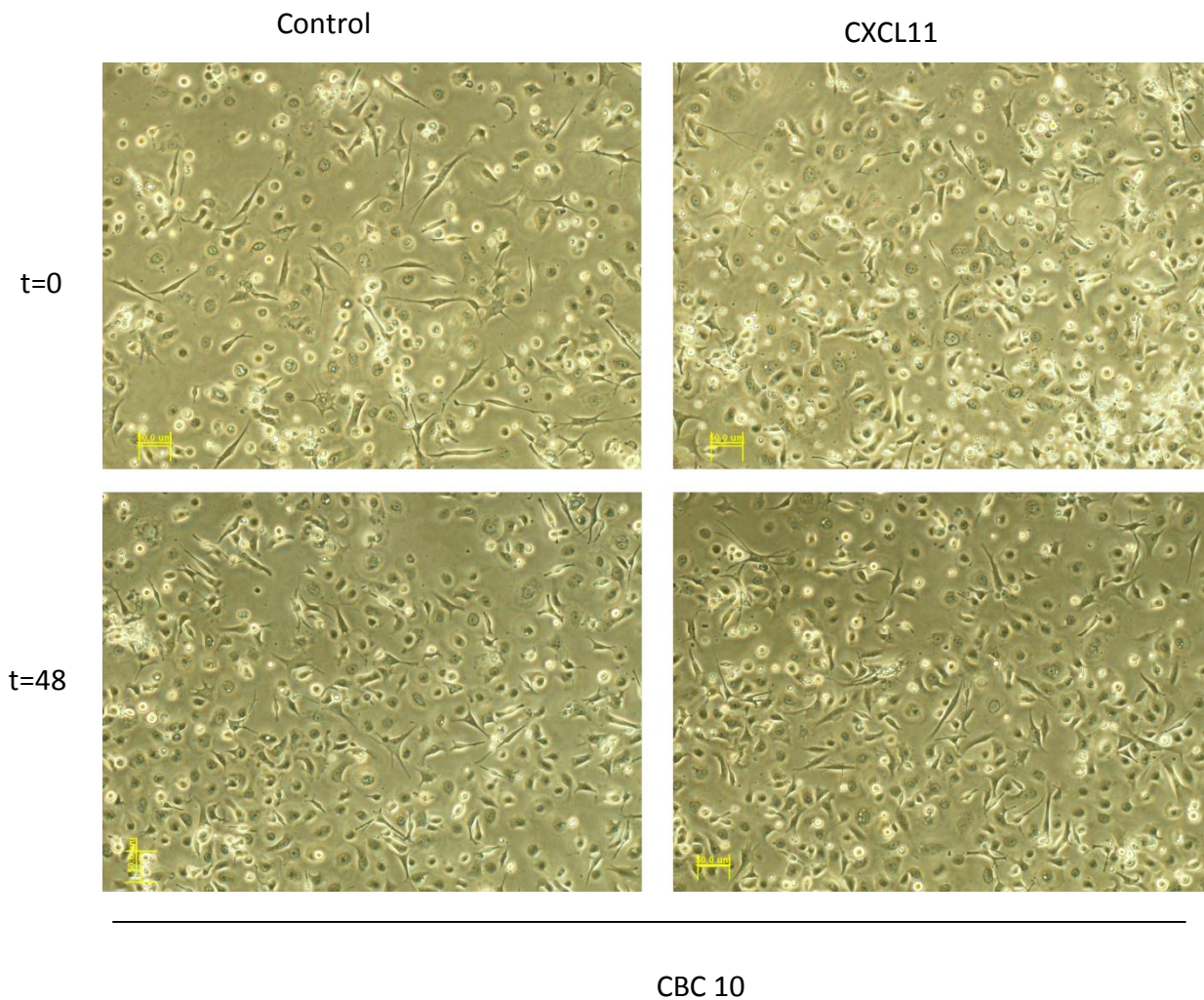


Figura 5. Efecto de la citocina CXCL11 en el cultivo de queratinocitos de CBC. Células procedentes del CBC10 fueron plantadas en presencia de CXCL11 (t=0) y se dejaron incubando a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 horas (t=48h). Como podemos observar no existe una diferencia significativa en cuanto a la supervivencia en ambos cultivos.

La utilización de esta citocina no mejoró el crecimiento celular y tampoco mejoró la supervivencia de las células después del primer pase, en contra de lo que esperaríamos encontrar según la literatura revisada³⁶. Por este motivo, el protocolo utilizado en el resto de cultivos que realizamos fue sin añadir citocina CXCL11.

Después de realizar 25 cultivos celulares procedentes de CBC, concluimos que el factor más determinante en la supervivencia celular y la longevidad del cultivo fue la cantidad de masa tumoral obtenida en el curetaje. Cuantas más células logramos plantar a tiempo "0" más longevo resultaron ser nuestros cultivos. Por otro lado, lo que más nos sorprendió en los cultivos celulares fue la obtención de unas células con morfología

fibroblastoide que aparecían a partir de las 24 horas y que se hacían muy evidentes a las 48h de cultivo, como se puede observar en la figura 6.

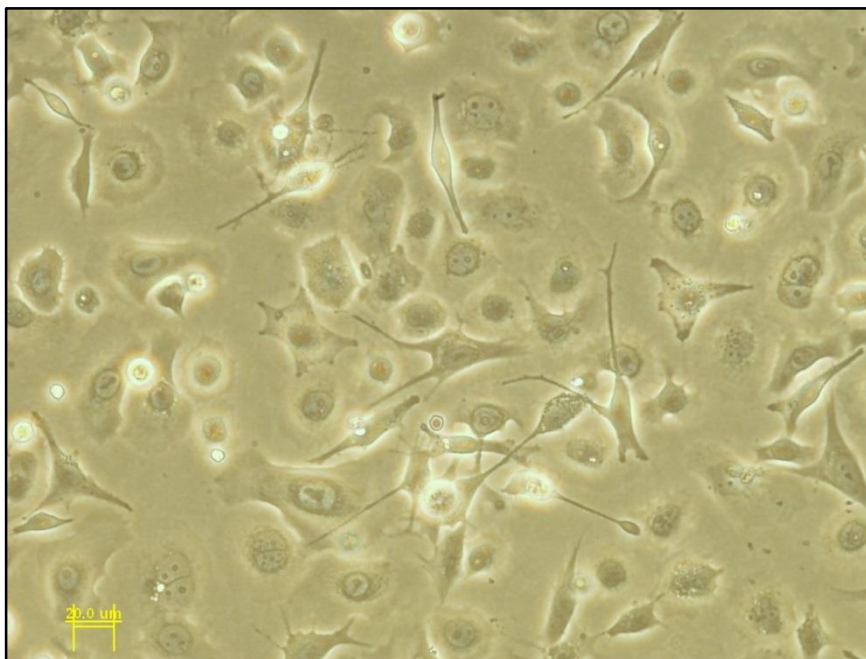


Figura 6. CBC19. Obsérvese las células con morfología fibroblastoide a las 48 horas de cultivo.

3.2. Efecto de TGF- β en las células en cultivo procedentes de CBC

El hecho de encontrar células con morfología fibroblastoide en los cultivos celulares nos hizo pensar que pudieran tratarse de células de TEM. Entonces decidimos comprobar los niveles de activación de la vía TGF- β .

Como hemos explicado en la introducción sobre la TEM, el factor TGF- β es una pieza clave para iniciar dicho proceso, por lo que hemos realizado cultivos de células tumorales procedentes de diversos CBC y en presencia de TGF- β . Siguiendo el protocolo habitual, TGF- β se añadió en el momento de plantar las células que fueron incubadas durante 48h a 37°C y 5% de CO₂. Pasado el tiempo de incubación analizamos la morfología celular en el microscopio y obtuvimos muestras para realizar inmunoblots e inmunofluorescencias. Esperábamos encontrar un aumento de células con morfología fibroblastoide a las 48 h, pero como se aprecia en la figura 7, no observamos diferencias en los cultivos que habíamos puesto TGF- β respecto al cultivo control. El número de células con morfología fibroblastoide observadas a las 48 h es proporcional a las células plantadas a tiempo 0, con independencia de TGF- β .

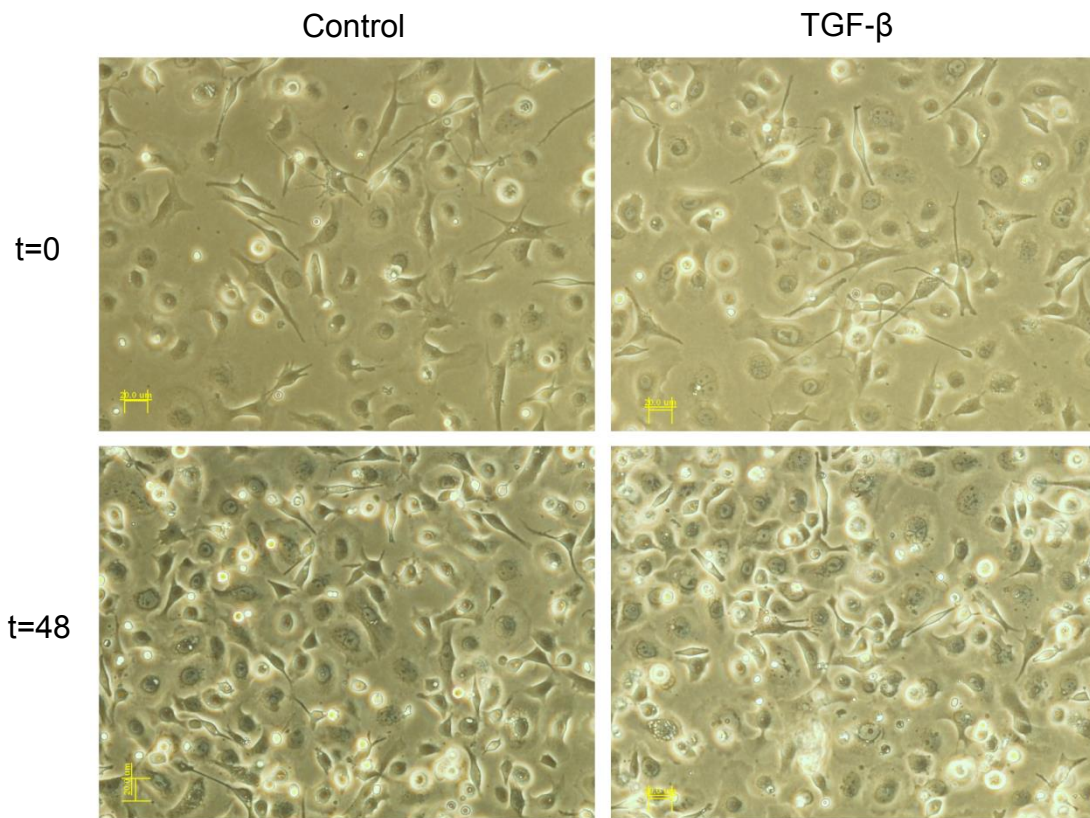


Figura 7. CBC 19. Efecto del TGF- β en el cultivo de queratinocitos procedente de CBC para el estudio de la transición epitelio mesénquima. Respecto al control no se observa un aumento de células con morfología fibroblastoide a las 48 h.

Decidimos estudiar mediante Western-blot la presencia de mediadores de la TEM como serían Smad2-P y Smad3-P en diferentes extractos de cultivo de CBC sometidos a la acción de TGF- β para estimular la TEM, así como en otras muestras controles, y también utilizamos en una muestra la citocina CXCL11, figura 8.

Curiosamente en todas las muestras independientemente de haber añadido o no TGF- β tenían los niveles de Smad2-P muy elevados, a diferencia de Smad3-P que era casi imperceptible. En cualquier caso no observamos aumento de Smad2-P ni de Smad-3P en el extracto celular de la muestra sometida a TGF- β como habíamos pensado.

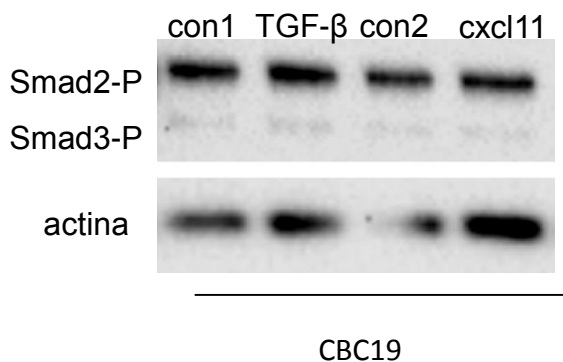


Figura 8. Western blot de muestras obtenidas del CBC19. Controles independientes, con1 y con2. En el panel superior se observan los niveles de Smad 2/3 fosforilados. En el panel inferior están los niveles de actina que se usaron como control de carga.

En conjunto los resultados de morfología e inmunoblot no son en absoluto concluyentes, pero podrían sugerir que las células tumorales obtenidas de CBC tienen capacidad de TEM *per se*, sin añadir TGF- β , ya que muestran un número elevado de células con morfología mesenquimal y tienen altos niveles de Smad2-P.

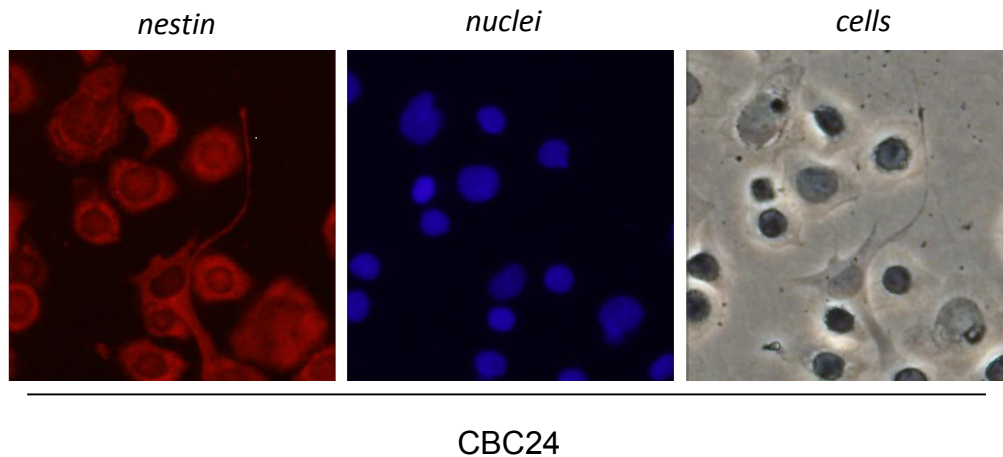
3.3. Expresión de nestina en el CBC

3.3.1. Determinación de nestina en cultivos celulares de CBC mediante inmunofluorescencia

Con intención de caracterizar las células con morfología fibroblastoide, obtenidas en los cultivos de queratinocitos procedentes de carcinomas basocelulares, continuamos realizando experimentos. Por un lado, hipotetizamos que se trataran de fibroblastos que habían contaminado la muestra, hecho que nos extrañaba por haber obtenido la masa tumoral mediante curetaje superficial para no contaminar el cultivo con células procedentes de la dermis. Por otro lado, hipotetizamos que se trataran de queratinocitos desdiferenciados o directamente de células de transición epitelio mesénquima. Para estudiar estos aspectos, analizamos la expresión de nestina, como marcador de células TEM, mediante inmunofluorescencia en los cultivos celulares procedentes del CBC24. Como se aprecia en la figura 9A tanto las células con morfología fibroblastoide como las células con morfología poligonal eran positivas para nestina. Nosotros esperábamos encontrar expresión de nestina solo en las células fibroblastoides que serían las que nosotros hipotetizamos que se trataran de células TEM, sin embargo, las células poligonales que serían células de características

epiteliales esperábamos que fueran nestina negativa. El control del anticuerpo secundario como observamos en la figura 9B es correcto ya que no se observa marcaje para nestina. Este resultado, si suponemos que el anticuerpo primario es específico, indicaría que el CBC podría presentar expresión de nestina como se ha observado en otros tumores (ver apartado siguiente).

A



B

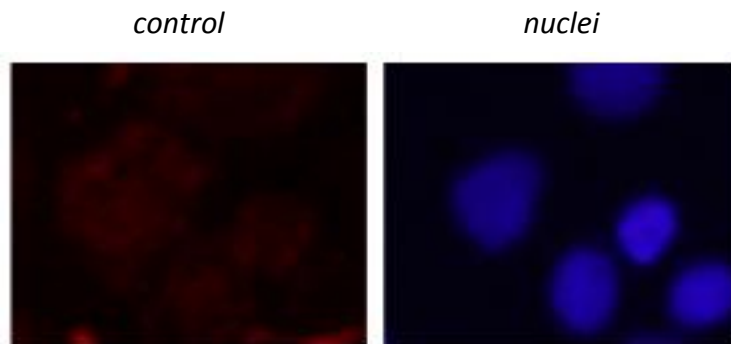


Figura 9. Inmunofluorescencia sobre CBC24 para estudiar la expresión de nestina en células en cultivo. A) Todas las células expresaban nestina, tanto las células diferenciadas con morfología poligonal como las células con morfología fibroblastoide. B) Control negativo sin anticuerpo primario. En ambos casos los núcleos fueron teñidos con Hoescht.

3.3.2. Determinación de nestina en el CBC y el estroma tumoral mediante inmunohistoquímica

En lo que se refiere a marcadores de TEM en CBC existe controversia, por ejemplo ya se ha comentado los resultados discrepantes en lo que se refiere a la tinción para

Snail^{9, 10}. Según los datos del apartado anterior, podría ser que el CBC expresase nestina como se observa en algunos casos para Snail. En un intento de discutir el origen celular del carcinoma basocelular, Sellheyer¹² muestra patrones de expresión de nestina en el CBC. Sus resultados indican que no hay expresión en el tumor pero sí hay expresión en el estroma peritumoral. Para comprobar estos datos, las mismas muestras utilizadas en el capítulo de las citoqueratinas fueron utilizadas para determinar mediante inmunohistoquímica la presencia de nestina en un total de 67 muestras. Como se observa en las figuras 10 y 11, las células tumorales de CBC fueron negativas para nestina, sin embargo dentro de la masa tumoral existían células dendríticas positivas para nestina. En el estroma tumoral observamos también algunas células positivas para nestina como las células endoteliales de los vasos, lo que nos sirvió como control positivo interno de la técnica. Además podemos observar que los fibroblastos más próximos a la masa tumoral son también positivos para nestina, a diferencia de los fibroblastos más alejados que son negativos para nestina. Este trabajo estaría indicando que el estroma tumoral es importante en la carcinogénesis del carcinoma basocelular, y son semejantes a los resultados realizados por Sellheyer¹³. Por lo tanto, las células tumorales de CBC son negativas para nestina y la presencia de queratinocitos positivos para nestina en los cultivos celulares no serían relevantes *in vivo*.

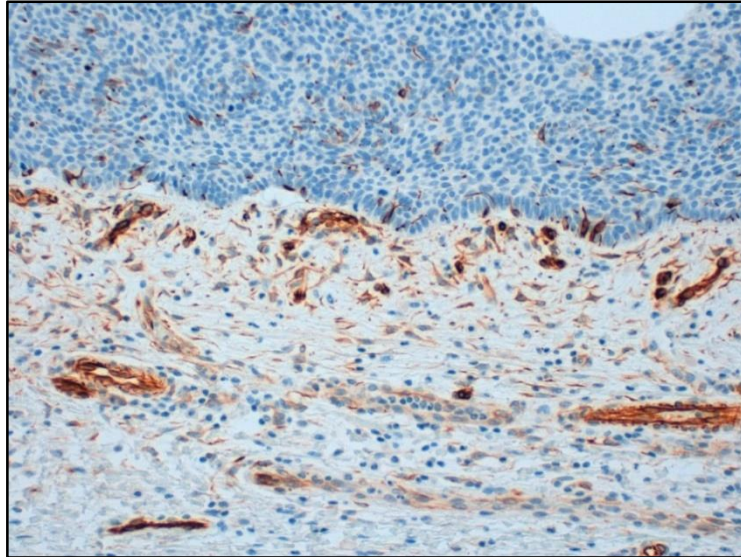


Figura 10. Nestina en CBC de axila de un varón. Aquí podemos observar como los fibroblastos del estroma tumoral en contacto con las células tumorales expresan nestina, en comparación con el estroma más alejado al nido tumoral, donde los fibroblastos no expresan nestina. Obsérvese también la expresión de nestina en las células endoteliales de los pequeños capilares sanguíneos.

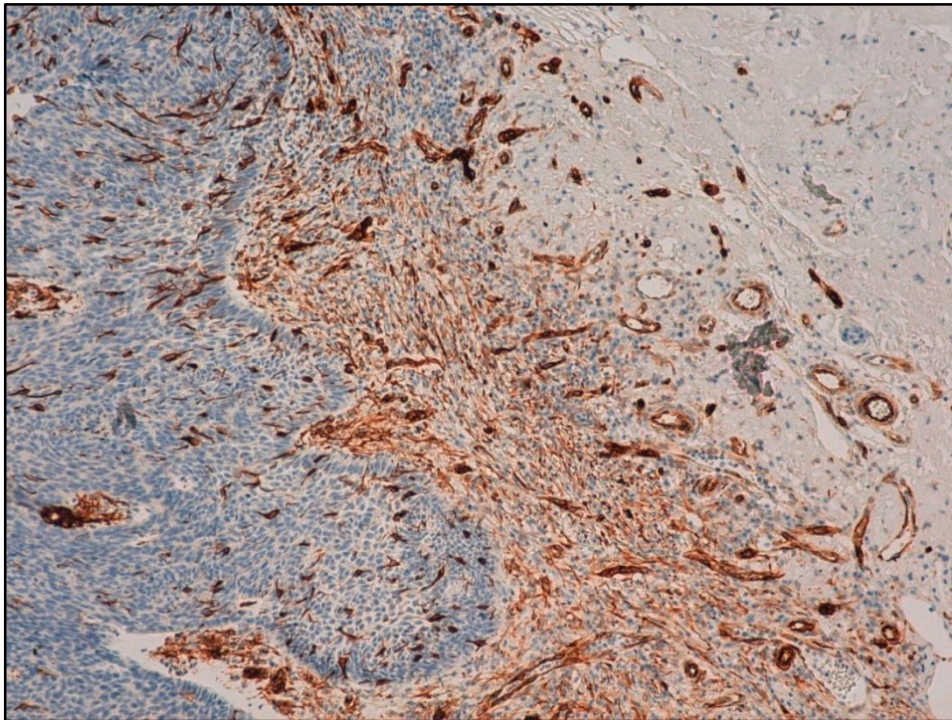


Figura 11. CBC facial nodular pigmentado. En estas imágenes podemos observar como las células tumorales de CBC son negativas para nestina, encontrando abundantes células dendríticas positivas para nestina, melanocitos, en el interior del tumor, al tratarse de un CBC pigmentado. Al igual que en la figura 10 podemos observar como los fibroblastos adyacentes a los nidos tumorales expresan nestina a diferencia de los fibroblastos más alejados del tumor.

4. Discusión

En este capítulo mostramos los trabajos de mejora del protocolo de cultivo de células procedentes de CBC. Las células obtenidas eran capaces de crecer en nuestras condiciones de cultivo en algunos casos hasta la confluencia, lo que supone una mejora respecto al protocolo anterior donde nos fue muy difícil conseguir cultivos longevos. Ciertamente, no hemos mejorado en el mantenimiento de los cultivos y después del primer pase cae la viabilidad sin que conozcamos muy bien la causa. En una primera referencia Flaxman *et al.*³⁷ en 1968 proponen que hay un proceso de queratinización cuando se cultivan los queratinocitos de CBC aunque no explican el motivo. Revisando la bibliografía algunos autores han descrito que la presencia de queratinocitos contaminantes normales procedentes del tejido colindante podría suprimir el crecimiento de las células de CBC en los cultivos de carcinoma basocelular³³. Sin embargo, este factor lo vemos como una causa poco probable en el fracaso de supervivencia de nuestros cultivos ya que las muestras fueron obtenidas mediante curetaje superficial de la masa tumoral. También utilizamos la citocina CXCL11 al existir un artículo en el que describen que dicha citocina interviene en la tumorigénesis del CBC pudiendo tener una importante función autocrina y/o paracrina, pero nosotros tampoco vimos un aumento en la supervivencia en los cultivos celulares en que la utilizamos³⁶. La dificultad del cultivo celular procedente de CBC se hace patente al revisar la bibliografía y observar las pocas referencias bibliográficas y la escasa información existente^{33, 37}. Solo hay un caso bien descrito de mantenimiento de queratinocitos de ratón CBC-like inducidos en un modelo transgénico, realizado por los autores So *et al.*³⁴.

La posibilidad que exista TEM en el CBC es muy controvertida y se basa en algunos artículos que muestran expresión de Snail e ILK en el CBC⁸. Nuestros datos con cultivos celulares no descartan esta posibilidad:

- 1) Presencia de un elevado número de células con morfología fibroblastoide en los cultivos celulares.

2) Niveles de Smad 2/3 fosforilados muy elevados, lo que indicaría una inducción constitutiva de la vía TGF- β .

3) Expresión de nestina pudiendo ser indicadora de TEM.

Sin embargo, es muy importante considerar que nuestros datos son muy preliminares y no concluyentes, y podrían ser explicados por otras causas.

La presencia de células fibroblastoides en los cultivos primarios de CBC ya fue descrito en el trabajo de Grando *et al.*³³ en 1996. Estos autores obtuvieron las muestras de CBC por cirugía de Mohs y describieron tres tipos celulares presentes en los cultivos, queratinocitos normales, fibroblastos y células en forma de huso. En los medios y condiciones de cultivo que utilizaron, se eliminaron los fibroblastos y los queratinocitos entraron en senescencia. Las células alargadas en forma de huso crecieron y retuvieron marcadores epiteliales y con estos resultados propusieron que aquellas células en forma de huso eran verdaderas células tumorales de CBC donde ha tenido lugar un cambio morfológico (desdiferenciación parcial). En ningún caso, hablaron de TEM. Nuestro protocolo es muy parecido al utilizado por estos autores pero tiene algunas variaciones: ahora usamos medios definidos con metabolitos inhibidores del crecimiento de fibroblastos y obtenemos las muestras por curetaje. Así, en nuestro caso también es difícil pensar que la presencia de células alargadas sea debido a contaminación por fibroblastos. De hecho, cuando cultivamos queratinocitos normales con el mismo protocolo y medios de cultivo en la mayoría de casos no aparecen células con morfología fibroblastoide. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que se trate de fibroblastos asociados al tumor que expresen nestina. Nuestros datos confirman las observaciones de Sellheyer y Krahl¹² y observamos que solo los fibroblastos perinodulares en contacto con los CBC expresan nestina, lo que sugiere que tienen características de fibroblastos activados asociados al tumor. Los fibroblastos asociados al CBC han sido ampliamente descritos y tienen características distintas de los fibroblastos dérmicos normales. Así, por ejemplo, en un trabajo previo de nuestro grupo observamos que los fibroblastos que están en contacto con los nidos tumorales de CBC, en el estroma tumoral, tiene unas características diferenciales respecto al resto de fibroblastos de la dermis, ya que son ERK positivos³⁵. Por lo tanto,

los fibroblastos adyacentes a los nidos tumorales podrían contaminar la muestra y también serían capaces de crecer en los medios usados ya que presentan cambios en la señalización celular si lo comparamos con los fibroblastos de dermis normales.

En un principio el hecho de que ciertos autores describieran la presencia de marcadores de TEM, como la detección de Snail o ILK⁸ en CBC nos indujo a pensar en la posibilidad que los CBC sufrieran TEM. Sin embargo, si aceptamos como marcador de TEM la nestina, nuestros datos de inmunohistoquímica en muestras de tejido CBC no apoyan esta posibilidad ya que los nódulos tumorales no expresan nestina. De acuerdo con este dato, la vía TGF- β tampoco parece estar activada en los CBC³⁸. Entonces surge la pregunta, ¿por qué en algunos casos se detectan marcadores de TEM en el CBC? En este sentido, hay que considerar que la expresión de Snail está controlada por distintas vías de señalización entre otras las de TNF- α y Sonic Hedgehog³⁹. Está muy bien descrito que la ruta Shh se encuentra anormalmente activada en las células de CBC y por tanto ésta podría ser la razón de encontrar altos niveles de Snail en los CBC. Esta posibilidad nos llevaría a debatir si en el CBC habría la inducción de una TEM-like, no por la vía canónica del TGF- β y Snail sino a través de Hedgehog y Snail.

Alternativamente nuestros resultados obtenidos en cultivos primarios de CBC discrepan de los resultados obtenidos en tejido, y mencionados en el párrafo anterior, ya que las células en cultivo presentan altos niveles de Smad2/3 fosforilado y por tanto la ruta TGF- β activa. Además todas las células parecen ser nestina positivas y no solo las células con morfología fibroblastoide. Nuestros resultados son preliminares y quedarían por realizar distintos experimentos de control: para la fosforilación de Smad2/3 necesitamos encontrar una situación control con la vía TGF- β apagada; y para el resultado de nestina habría que comprobar el resultado con otros anticuerpos. En cualquier caso, de confirmarse estos resultados con los cultivos, podríamos pensar que es la propia siembra *in vitro* de las células tumorales de CBC la que induce una activación anómala de la vía TGF- β y un proceso de TEM que no se corresponde con las observaciones *in vivo*. También nos queda por explorar la posibilidad de que no sean los fibroblastos asociados al tumor que tengan estas características.

Como conclusión creemos que el estroma celular pueda tener un papel importante en la carcinogénesis del CBC. La inmunohistoquímica nos enseña unas células en contacto

con los nidos tumorales que son nestina positivas a diferencia de las células estromales más alejadas al núcleo tumoral y que probablemente estas células sean importantes en la carcinogénesis. Sin embargo, no hemos podido constatar si en el CBC se produce TEM o no. Los resultados de las distintas técnicas han sido contradictorios, pero sí que parecen indicar la participación del estroma tumoral en la carcinogénesis del CBC.

5. Bibliografía

1. Palena C, Hamilton DH, Fernando RI. Influence of IL-8 on the epithelial-mesenchymal transition and the tumor microenvironment. *Future Oncol* 2012; 8: 713-22.
2. Zhang Y, Zeng S, Ma J, Deng G, Qu Y, Guo C *et al.* Nestin overexpression in hepatocellular carcinoma associates with epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance. *J Exp Clin Cancer Res* 2016; 35: 111.
3. Mamuya FA, Duncan MK. α V integrins and TGF- β -induced EMT: a circle of regulation. *J Cell Mol Med* 2012; 16: 455-55.
4. O'Kane, Jackson MV, Kissenpfenning A, Spense S, Damkat-Thomas L, Tolland JP *et al.* SMAD inhibition attenuates epithelial to mesenchymal transition by primary keratinocytes in vitro. *Exp Dermatol* 2014; 23: 497-503.
5. Pearlman RL, Montes de OCAMK, Pal HC, Afag F. Potential therapeutic targets of epithelial-mesenchymal transition in melanoma. *Cancer Lett* 2017; 391: 125-140.
6. Lv C, Dai H, Sun M, Zhao H, Wu K, Zhu J *et al.* Mesenchymal stem cells induce epithelial mesenchymal transition in melanoma by paracrine secretion of transforming growth factor- β . *Melanoma Res* 2017; 27: 74-84.
7. Chandrakesan P. Cancer cell of origin controls epithelial-to-mesenchymal transition in skin squamous cell carcinoma. *Stem Cell Investig* 2017; 4: 34.
8. Papanikolaou S, Bravou V, Gyftopoulos K, Nakas D, Repanti M, Papadaki H. ILK expression in human basal cell carcinoma correlates with epithelial-mesenchymal transition markers and tumour invasion. *Histopathology* 2010; 56: 799-809.
9. Franz M, Spiegel K, Umbreit C, Richter P, Codina-Canet C, Berndt A *et al.* Expression of Snail is associated with myofibroblast phenotype development in oral squamous cell carcinoma. *Histochem Cell Biol* 2009; 131: 651-60.

10. Dvořánková B, Szabo P, Lacina L, Kodet O, Matoušková E, Smetana K Jr. Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. *Histochem Cell Biol* 2012; 137: 679-85.
11. Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 1990; 60: 585-95.
12. Sellheyer K, Krahl D. Does the peritumoral stroma of basal cell carcinoma recapitulate the follicular connective tissue sheath? *J Cutan Pathol* 2011; 38: 551-9.
13. Sellheyer K, Krahl D. Spatiotemporal expression pattern of neuroepithelial stem cell marker nestin suggests a role in dermal homeostasis, neovasculogenesis, and tumor stroma development: a study on embryonic and adult human skin. *J Am Acad Dermatol* 2010; 63: 93-113.
14. Abbas O, Mahalingam M. Epidermal stem cells: practical perspectives and potential uses. *Br J Dermatol* 2009; 161: 228-236.
15. Kloepper JE, Tiede S, Brinckmann J, Reinhardt DP, Meyer W, Faessler R *et al.* Immunophenotyping of the human bulge region: the quest to define useful in situ markers for human epithelial hair follicle stem cells and their niche. *Exp Dermatol* 2008; 17: 592-609.
16. Kanoh M, Amoh Y, Sato Y, Katsuoka K. Expression of the hair stem cell-specific marker nestin in epidermal and follicular tumors. *Eur J Dermatol* 2008; 18: 518-23.
17. Amoh Y, Li L, Yang M, Moossa AR, Katsuoka K, Penman S *et al.* Nascent blood vessels in the skin arise from nestin-expressing hair-follicle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 13291-5.
18. Amoh Y, Li L, Campillo R, Kawahara K, Katsuoka K, Penman S *et al.* Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nervis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 17734-8.

19. Amoh Y, Li L, Katsuoka K, Penman S, Hoffman RM. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 5530-4.
20. Hoffman RM. The pluripotency of hair follicle stem cells. *Cell cycle* 2006; 5: 232-233.
21. Mori T, Misago N, Yamamoto O, Toda S, Narisawa Y. Expression of nestin in dermatofibrosarcoma protuberans in comparison to dermatofibroma. *J Dermatol* 2008; 35: 419-25.
22. Sellheyer K, Nelson P, Krahl D. Dermatofibrosarcoma protuberans: a tumour of nestin-positive cutaneous mesenchymal stem cells? *Br J Dermatol* 2009, 161: 1317-1322.
23. Shimada S, Tsuzuki T, Kuroda M, Nagasaka T, Hara K, Takahashi E *et al.* Nestin expression as a new marker in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Pathol Int* 2007, 57: 60-67.
24. Sellheyer K, Krahl D. Cutaneous mesenchymal stem cells: status of current knowledge, implications for dermatopathology. *J Cutan Pathol* 2010; 37: 624-34.
25. Abbas O, Bhawan J. Expression of stem cell markers nestin and cytokeratin 15 and 19 in cutaneous malignancies. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2011; 25: 311-6.
26. Sellheyer K. Basal cell carcinoma: cell of origin, cancer stem cell hypothesis and stem cell markers. *Br J Dermatol* 2011; 164: 696-711.
27. Sellheyer K. Basal cell carcinoma and stem cell markers: Contribution to possible histogenesis?. *Hautarzt* 2011; 62: 119-27.
28. Kruse C, Bodó E, Petschnik AE, Danner S, Tiede S, Paus R. Towards the development of a pragmatic technique for isolating and differentiating nestin-positive cells from human scalp skin into neuronal and glial cell populations: generating neurons from human skin? *Exp Dermatol* 2006; 15: 794-800.

29. Tiede S, Kloepper JE, Ernst N, Poeggeler B, Kruse C, Paus R. Nestin in human skin: exclusive expression in intramesenchymal skin compartments and regulation by leptin. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 2711-20.
30. Ernst N, Tiede S, Tronnier V, Kruse C, Zechel C, Paus R. An improved, standardised protocol for the isolation, enrichment and targeted neural differentiation of nestin+ progenitors from adult human dermis. *Exp Dermatol* 2010; 19: 549-55.
31. Hyder CL, Lazaro G, Pylvanainen JW, Roberts MW, Qvarnstrom SM, Eriksson JE. Nestin regulates prostate cancer cell invasion by influencing the localisation and functions of FAK and integrins. *J Cell Sci* 2014; 127: 2161-73.
32. Hagio M, Matsuda Y, Suzuki T, Ishiwata T. Nestin regulates epithelial-mesenchymal transition marker expression in pancreatic ductal adenocarcinoma cell lines. *Mol Clin Oncol* 2013; 1: 83-7.
33. Grando SA, Schofield OM, Skubitz AP, Kist DA, Zelickson BD, Zachary CB. Nodular basal cell carcinoma in vivo vs in vitro. Establishment of pure cell cultures, cytomorphic characteristics, ultrastructure, immunophenotype, biosynthetic activities, and generation of antisera. *Arch Dermatol* 1996; 132: 1185-93.
34. So PL, Langston AW, Daniellina N, Hebert JL, Fujimoto MA, Khaimskiv Y et al. Long-term establishment, characterization and manipulation of cell lines from mouse basal cell carcinoma tumors. *Exp Dermatol* 2006; 15: 742-50.
35. Aguayo, R. Caracterización de las alteraciones moleculares de los carcinomas basocelulares esporádicos. Tesis doctoral. Lleida. Universidad de Lleida. 2013.
36. Lo BK, Yu M, Zloty D, Cowan B, Shapiro J, McElwee KJ. CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas. *Am J Pathol* 2010; 176: 2435-46.
37. Flaxman BA, Van Scott E J. Keratinization in vitro of cells from a basal cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1968; 40: 411-22.

38. Lange D, Persson U, Wollina U, ten Dijke P, Castelli E, Heldin CH et al. Expression of TGF-beta related Smad proteins in human epitelial skin tumors. *Int J Oncol* 1999; 14: 1049-56.

39. Li X, Deng W, Nail CD, Bailey SK, Kraus MH, Ruppert JM *et al.* Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene* 2006; 25: 609-21.

CAPÍTULO 3

Papel de la inmunidad en el carcinoma basocelular. Caracterización del infiltrado inmunoinflamatorio:

- A. En el estudio de la regresión espontánea en el CBC**
- B. En la respuesta al tratamiento con ingenol mebutato**

1. A. Introducción: Caracterización del infiltrado inmunoinflamatorio en el estudio de la regresión espontánea en el CBC

1.1. A. El sistema inmune

Las células y moléculas responsables de la inmunidad constituyen el sistema inmunitario, y a la respuesta conjunta y coordinada al reconocimiento de cuerpos extraños se la denomina respuesta inmune.

La respuesta inmune clásicamente se ha dividido en dos ramas principales: la respuesta inmune innata o natural y la respuesta inmune adaptativa o específica. La respuesta inmune innata constituye la primera línea de defensa frente a patógenos y responde de forma rápida e idéntica ante los distintos patógenos. Los mecanismos de la inmunidad innata son específicos de las estructuras que son comunes en diferentes grupos de patógenos (“reconocimiento de patrones”)¹. Los principales componentes de la respuesta natural son: barreras físicas y químicas, como son la piel, las mucosas y las sustancias químicas antimicrobianas (principalmente péptidos antimicrobianos) producidos en las superficies epiteliales, células fagocíticas, como los neutrófilos y los macrófagos, células dendríticas, y linfocitos citolíticos naturales más conocidos por su nombre en inglés como células *Natural Killers* (NK) y otras células linfocíticas innatas T $\gamma\delta$ (linfocitos T $\gamma\delta$), y proteínas sanguíneas, como son el sistema del complemento, las colectinas, pentraxinas, ficolinas y citocinas².

La respuesta inmune adaptativa se define por ser específica frente a un amplio espectro de antígenos, y responde de forma más enérgica a infecciones repetidas frente al mismo patógeno, lo que se conoce como memoria inmunológica. La respuesta inmune adaptativa está constituida por dos tipos de respuesta: la respuesta humoral y la respuesta celular. La primera está formada por los linfocitos B, que se diferencian en células plasmáticas (células efectoras), que producen y liberan anticuerpos, inmunoglobulinas que reconocen de forma específica antígenos de cuerpos extraños o patógenos, neutralizan su infecciosidad y los marcan para su posterior eliminación a través de mecanismos efectoras. Está dirigida contra microbios extracelulares y toxinas¹. La respuesta celular está formada por la familia de linfocitos T. Por una parte, se activan los linfocitos T CD4+ *helper*, tras reconocer péptidos presentados por el receptor del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de

clase II situado en la superficie de las células presentadoras de antígenos como las células dendríticas y los macrófagos, secretando mediadores inflamatorios para desencadenar una respuesta inmune efectiva contra patógenos a través de las distintas vías de respuesta como por ejemplo las vías de los linfocitos T *helpers*: Th1, Th2 y Th17. Otro tipo de respuesta es la que originan los linfocitos T citotóxicos o CD8+, que secretan gránulos citotóxicos y mediadores inflamatorios al reconocer patógenos a través de la unión del receptor de los linfocitos T (TCR) a los péptidos presentados por los receptores del MHC de clase I. Finalmente el subgrupo de linfocitos T reguladores (Treg), que limitan las respuestas inmunes iniciadas para evitar el daño tisular excesivo y la autoinmunidad. Además son responsables de la autotolerancia periférica frente a antígenos propios, y tienen un papel destacado en la inhibición de la respuesta inmune por parte de los tumores^{1, 3-6}.

1.2. A Respuesta inmune contra el cáncer

Actualmente, existe una amplia evidencia y al mismo tiempo una fuerte controversia del papel del sistema inmune en la progresión tumoral y su capacidad de diseminación, por la doble acción: antitumoral y por poder favorecer el crecimiento tumoral cuando la respuesta inmune es deficitaria o incorrecta. El concepto de inmunovigilancia del cáncer, que fue propuesto por Burnet⁷ en los años cincuenta, afirma que una función fisiológica del sistema inmunitario es reconocer y destruir los clones de células mutadas del que están formadas. La respuesta inmune se cree que es más eficaz en los primeros estadios del cáncer, pero cuando el tumor progresa, este es capaz de desarrollar tolerancia escondiendo sus antígenos, liberando citocinas inmunosupresoras y desarrollando mecanismos de bloqueo de la respuesta inmune^{4, 5, 8, 9}.

La importancia del sistema inmune en la respuesta frente al cáncer se refleja en los estados de inmunodeficiencia. Se ha visto un aumento del riesgo de aparición y progresión de neoplasias, ya sea en el caso de inmunodeficiencias primarias (por ejemplo, la inmunodeficiencia variable común), o bien secundarias, como serían los pacientes en tratamientos con inmunosupresores de larga duración, en receptores de trasplantes de órganos, o las infecciones por el virus VIH-1 (virus de la

inmunodeficiencia humana)⁵. De todos es sabido el riesgo que presentan los pacientes con SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) de desarrollar sarcoma de Kaposi, linfomas o carcinoma anogenital por el virus del papiloma humano¹⁰ y la facilidad para desarrollar cáncer cutáneo no melanoma, de 10 a 30 veces más de lo esperado, en pacientes trasplantados renales¹¹.

Por otra parte, se ha establecido una asociación entre la localización del infiltrado inmunitario en relación al tumor y la respuesta clínica¹². En neoplasias epiteliales de ovario y cáncer colorrectal se ha correlacionado el aumento de la población intratumoral de linfocitos T CD3+ y linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) con mayores tiempos de supervivencia¹³. Asimismo, el número de células CD8+ que infiltran el tumor se ha relacionado con la respuesta clínica de los cánceres de colon, pulmón y mama¹⁴.

Paralelamente, la respuesta inmune frente a las células tumorales, impone una presión selectiva sobre el tumor que da lugar a una selección de células que presentan variantes resistentes entre las células tumorales supervivientes, lo que se conoce como inmunoección¹⁵. La alta proliferación tumoral y la facilidad de mutaciones en las células tumorales propician la aparición de mecanismos de evasión e inhibición de la respuesta inmune. Es el caso de la inhibición de la expresión del receptor del MHC de clase I en células tumorales, evitándose así el reconocimiento por parte de los linfocitos T CD8+¹⁶, o la secreción de TGF- β en grandes cantidades por parte del tumor, hecho que inhibe la proliferación y funciones efectoras de los linfocitos y macrófagos provocando un microambiente tumoral tolerogénico¹⁷.

Si profundizamos en el modelo de la inmunoección, se pueden establecer tres fases bien diferenciadas: eliminación, equilibrio y escape. La inmunovigilancia tumoral se incluye en la primera fase.

La fase de eliminación o vigilancia se encuentra constituida por cuatro etapas: en una etapa inicial, el tumor sólido adquiere cierto tamaño, comienza a crecer invasivamente y necesita suministro sanguíneo. Consecuentemente, el tumor produce proteínas angiogénicas y estromogénicas¹⁸. Este crecimiento invasivo causa daños en los tejidos circundantes, induciendo señales de inflamación que dan lugar al reclutamiento de

células del sistema inmune innato (células NK, NKTs, células $T\gamma\delta$, macrófagos y células dendríticas). Las estructuras de las células transformadas, producidas por el proceso tumoral o por la inflamación, son reconocidas por los linfocitos infiltrantes, como las NK, NKT y linfocitos $T\gamma\delta$. En una segunda etapa de la vigilancia, el interferón γ (IFN- γ) produce la muerte de células tumorales al inducir mecanismos apoptóticos. También induce la producción de las quimiocinas CXCL9, 10 y 11, por parte de células del tumor o del tejido sano. Algunas de las quimiocinas citadas tienen capacidades angiostáticas, bloqueando la formación de nuevos vasos y dando lugar a la muerte de más células tumorales. Los restos celulares formados, ya sea directa o indirectamente como consecuencia del IFN γ , son ingeridas por las células dendríticas locales, las cuales migran a los nódulos linfáticos drenantes. Las quimiocinas producidas durante el proceso inflamatorio reclutan más NKs y macrófagos. Posteriormente, en la tercera etapa, las NKs infiltrantes del tumor y los macrófagos se activan mutuamente a través de la producción de IFN γ e interleucina 12 (IL-12), y eliminan células tumorales por mecanismos de apoptosis mediadas por TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*), perforina e intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno. En los ganglios linfáticos de drenaje, las células dendríticas que han migrado desde el lugar del tumor, previa fagocitosis de antígenos tumorales, inducen la diferenciación de los linfocitos T CD4+ *helpers* hacia Th1, respuesta inmune efectiva contra el tumor, que facilitará el desarrollo de los linfocitos T citotóxicos CD8+ específicos. En la cuarta etapa, los linfocitos CD4+ y CD8+ específicos contra el tumor se desplazarán hacia el lugar del tumor, donde los linfocitos T CD8+ destruirán las células tumorales supervivientes, la inmunogenicidad de las cuales estará potenciada por la exposición al IFN- γ liberado durante todo el proceso¹⁸.

En el proceso de equilibrio, el sistema inmune del paciente y el resto de células tumorales supervivientes del proceso de eliminación entran dentro de un equilibrio dinámico. En esta etapa, los linfocitos y el IFN- γ ejercen una fuerte presión selectiva sobre las células tumorales que es suficiente para contenerlas, pero no para destruirlas completamente⁸. Parece ser que el equilibrio es el más largo de los tres procesos, pudiendo tener una duración de años.

En el proceso de escape, las variantes tumorales supervivientes que han adquirido características que les permiten evadir/inhibir la respuesta inmune, a través de

cambios genéticos o epigenéticos, comienzan a expandirse de forma incontrolada. Este fenómeno resultará en el desarrollo de la neoplasia maligna que, si no se trata, acabará con la muerte del paciente¹⁸.

1.3. A. Respuesta inmune frente al CBC: estudio de la regresión espontánea

Como hemos comentado, la respuesta inmune antitumoral ha sido ampliamente estudiada en diversos carcinomas internos^{5, 12,14} y también en el melanoma^{19, 20}. Las terapias inmunes como las vacunas y los nuevos tratamientos biológicos anti-CTLA4 y anti-PD-1, están en constante desarrollo¹⁹. Sin embargo, existe poca bibliografía referida a la regresión del CBC^{3, 19,21-26}. Hace algunos años, se caracterizó el infiltrado inmune pero sin relacionarlo con la regresión²⁷⁻²⁹. Consideramos que el CBC supone un modelo tumoral idóneo para investigar estos fenómenos, ya que se trata de un tumor muy accesible y frecuente en la población.

A nivel clínico, especialmente en el CBC superficial, la mayoría de casos presentan en su evolución crecimiento tumoral periférico junto a amplias zonas de regresión en la parte central del tumor. Se supone que el sistema inmune lo elimina parcialmente y las zonas destruidas quedan sustituidas por tejido cicatricial, figura 1. A este fenómeno le denominamos regresión espontánea, aunque también se observa en otras formas clínicas de CBC^{3, 23}, figura 2. En el análisis histológico de las zonas de regresión hemos podido observar situaciones de regresión parcial (RP: islotes tumorales rodeados por infiltrado celular y tejido cicatricial) y de regresión total (RT: inflamación y tejido cicatricial sin restos tumorales).



Figura 1. CBC superficial localizado en el tronco, incluido en el estudio. Se observa una zona central cicatricial de regresión rodeada por el resto del tumor.



Figura 2. CBC infiltrante en la cara, concretamente en la frente, incluido en el estudio. Se observa una zona central de regresión cicatricial rodeada por el resto del tumor.

Dada la escasez de estudios sobre la respuesta inmune en la regresión del carcinoma basocelular, nos propusimos caracterizar las diferencias en la composición del infiltrado inmune entre la zona tumoral y la zona de regresión.

2. A. Material y métodos

Se reclutaron 10 pacientes de consultas externas del servicio de dermatología del HUAV. Los criterios de inclusión para el estudio fueron: adulto caucásico > 18 años, diagnosticado de CBC primario mediante histología (preferiblemente se seleccionaron CBC superficiales, aunque también se incluyeron otros subtipos de CBC que mostraron regresión clínica) y firma del consentimiento informado de participación en el estudio.

Los pacientes fueron citados al quirófano de dermatología donde se practicaron 2 biopsias con un *punch* de 4 mm una vez extirpado el tumor, una de la zona central inflamatoria o cicatricial, en la que se sospechaba regresión, y otra de la periferia o zona de progresión tumoral, figura 3. Se recogieron un total de 20 muestras (2 biopsias por paciente) de manera prospectiva.

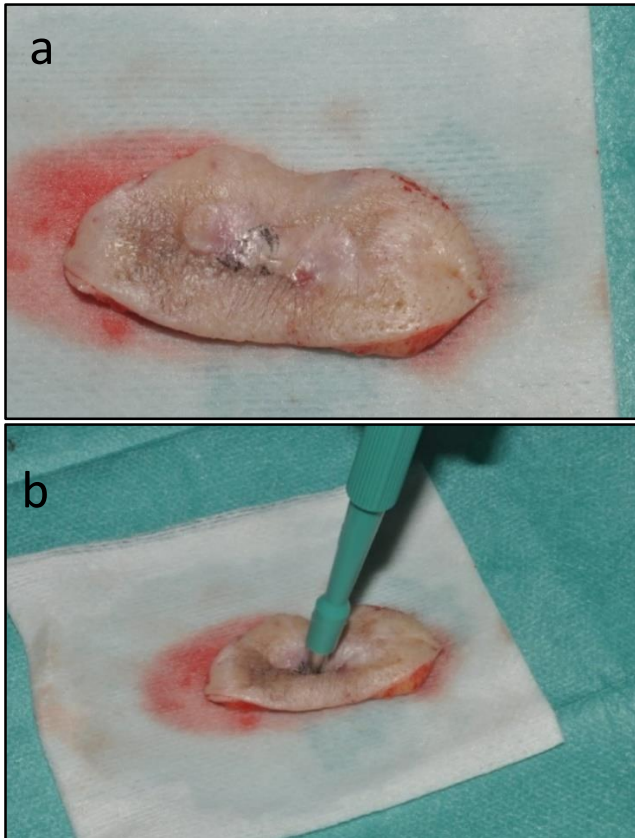


Figura 3. Tras la exéresis quirúrgica del tumor (a), se tomaron 2 biopsias tanto en la zona de regresión tumoral como en el borde tumoral activo (b).

Las biopsias obtenidas se enviaron al Servicio de Anatomía Patológica del HUAV para su procesamiento y preservación en parafina.

Se seccionaron los bloques parafinados con un grosor de $3 \mu\text{m}$, se secaron a 65°C y luego se sometieron a un proceso de pre-tratamiento (desparafinización, rehidratación y liberación de los epítomos), para iniciar posteriormente la tinción de las muestras mediante un anticuerpo primario, uno secundario y un cromógeno más su sustrato. En concreto, para el pre-tratamiento, se sumergió la muestra en una solución tamponada $50 \times$ Tris/EDTA, pH 9 en un baño termoestable (módulo de pre-tratamiento, *PT-LINK* (DAKO)) a 95°C durante 20 min. Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se incubó en peróxido de hidrógeno (*EnVision FLEX Peroxidase-*

Blocking Reagent) durante 5 minutos para bloquear la peroxidasa endógena, y se realizó un *buffer* de lavado 3 veces seguidas durante 5 minutos.

Una vez preparada la muestra, se incubó con los anticuerpos primarios, tabla 1, durante 20 minutos. Seguidamente, se realizaron 3 ciclos seguidos de *buffer* de lavado, durante 5 minutos y se incubó la muestra con el anticuerpo secundario (*EnVision FLEX/HRP*) durante 20 minutos. Se repitieron 3 ciclos del *buffer* de lavado durante 5 minutos. Seguidamente se incubó la muestra con un cromógeno (*EnVision FLEX DAB+Chromogen*) y un sustrato (*EnVision FLEX Substrate Buffer*) durante 10 minutos. Se repitieron los 3 ciclos de *buffer* de lavado, durante 5 minutos. Finalmente, se contratiñó la muestra con hematoxilina durante 5 minutos y se deshidrató mediante un gradiente creciente de alcoholes hasta la total inmersión en xileno (gradiente: agua destilada, alcohol 50%, alcohol 80%, alcohol absoluto, xileno-alcohol, Xileno), para acabar montándola mediante un medio de montaje no acuoso.

La lectura sistemática de las muestras se realizó mediante un sistema de imagen automatizado, el ACIS® III Instrument (DAKO, Denmark, Glostrup), que calcula de forma automática el porcentaje de células teñidas por el cromógeno, respecto al total de células del infiltrado, figuras 4 y 5. Para calcular el *Histoscore* este porcentaje se multiplicaba por la intensidad del infiltrado total (de 0 a 3)

Las biopsias realizadas a los pacientes fueron sometidas a tinciones inmunohistoquímicas con los diferentes anticuerpos contra los marcadores moleculares para caracterizar el infiltrado inmunoinflamatorio así como los marcadores funcionales de apoptosis y de proliferación celular. En la tabla 1 se detallan los anticuerpos utilizados y en la tabla 2 el significado de los marcadores moleculares determinados.

Antígeno	Clon (Anticuerpo)	Número de catálogo	Dilución	Fuente
CD1a	O10	IR069	Preparado para su uso	DAKO, Glostrup, Denmark
CD3	Polyclonal	IR503	Preparado para su uso	DAKO, Glostrup, Denmark
CD4	4B12	IR649	Preparado para su uso	DAKO, Glostrup, Denmark
CD8	C8/144B	IR623	Preparado para su uso	DAKO, Glostrup, Denmark
CD20	L26	IR604	Preparado para su uso	DAKO, Glostrup, Denmark
CD56	123C3	IR628	Preparado para su uso	DAKO, Glostrup, Denmark
CD68	PG-M1	IR613	Preparado para su uso	DAKO, Glostrup, Denmark
Bcl-2	124	IR614	Preparado para su uso	DAKO, Glostrup, Denmark
Cleaved Caspase 3	Polyclonal	9661	1:100	Cell signaling, Massachusetts, US
FoxP3	D2W8E	98377	1:100	Cell signaling, Massachusetts, US
GrzB	GrB-7	M7235	1:50	DAKO, Glostrup, Denmark
KI67	MIB-1	IR626	Preparado para su uso	DAKO, Glostrup, Denmark
TIA-1	TIA-1	Ab2712	1:100	Abcam, Cambridge, UK

Tabla 1. Anticuerpos primarios usados en la inmunohistoquímica.

Marcadores	Principal expresión celular	Función celular
CD1a	Células dendríticas y timocitos	MHC de clase I, no clásico
CD3	Linfocitos T	TCR. Expresión en la superficie celular y transducción de señales por el receptor del linfocito T para el antígeno
CD4	Linfocitos T restringidos por la clase II del MHC (= <i>helpers</i>) y algunos macrófagos.	Correceptor en la activación del linfocito T inducido por el antígeno y restringido por la clase II del MHC (se une al MHC de clase II)
CD8	Linfocito T citotóxico	Correceptor en la activación del linfocito T inducido por el antígeno y restringido por el MHC de clase I (se une al MHC I)
CD20	Linfocito B	Proteína transmembrana que interviene en la regulación del linfocito B
CD56	<i>Natural Killer</i>	Molécula de adhesión celular neuronal (NCAM)
CD68	Macrófagos	Glicoproteína ubicada en la superficie de la membrana celular
Bcl-2	Células somáticas y tumorales	Proteína procedente del proto-oncogén (BCL2) regulador de la apoptosis. Función antiapoptótica
Caspasas-3 activadas (CASP3)	Células somáticas y tumorales	Mediador apoptótico. Función proteolítica
FoxP3	Linfocitos T reguladores	Gen crucial para el desarrollo de linfocitos T reguladores
GrzB	Células somáticas y tumorales	Enzima inductora de la apoptosis (activa las caspasas ejecutoras), actividad citotóxica

Ki-67	Células somáticas y tumorales	Proteína no histónica presente en las fases celulares G1, S, G2 y M. No se encuentra en G0. Marcador de proliferación celular. Mayor expresión en CBC agresivos y recurrentes
TIA-1	Linfocito T citotóxico y <i>Natural Killer</i>	Se localizan en el citoplasma. Proteína en forma de gránulo inductora de la apoptosis

Tabla 2. Significado de cada uno de los marcadores estudiados por inmunohistoquímica.

Los resultados obtenidos para cada marcador molecular estudiados por inmunohistoquímica se procesaron estadísticamente con el test ANOVA para datos independientes. Los marcadores que presentaban significación estadística fueron sometidos a *Tukey-HSD* post-test (* indica $p < 0.05$, ** indica $p < 0.01$).



Figura 4: ACIS® III Instrument, conectado a un ordenador al que se envían los datos. El lector de las muestras se encuentra en la ranura de la izquierda del instrumento.

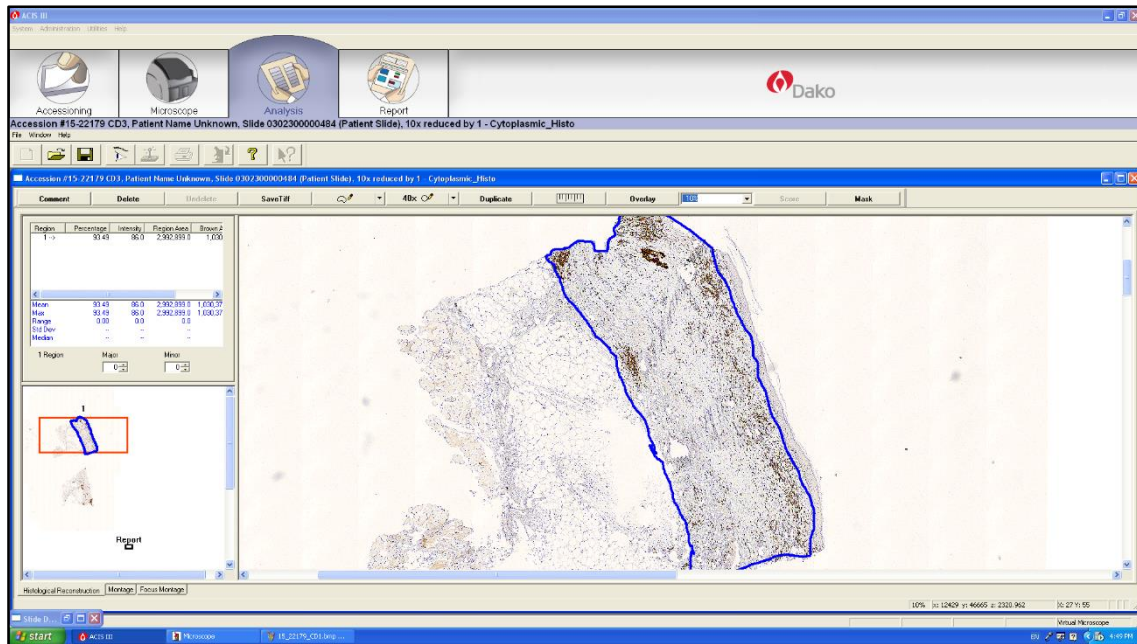


Figura 5. Imagen obtenida de una muestra de inmunohistoquímica donde se seleccionó el área a valorar manualmente delimitada por la línea azul. En este caso, vemos en la imagen una muestra correspondiente a la tinción de células CD3+. El procesador de imagen, ACIS® III Instrument, valora el porcentaje e intensidad de la tinción.

Para estudiar el proceso de la regresión espontánea en el CBC, decidimos caracterizar el infiltrado inmunoinflamatorio existente en diferentes CBC con signos de regresión tumoral. Para ello realizamos 2 biopsias, una en el área del parénquima tumoral y otra en la zona de regresión. En la zona de regresión observamos que en algunos casos quedaban islotes tumorales acompañados de un infiltrado inflamatorio peritumoral en la histopatología, mientras en otros solo observamos infiltrado. De este modo clasificamos la regresión tumoral en zonas de regresión parcial y en zonas de regresión total y comparamos las diferencias que existían entre las 3 zonas: tumor, regresión parcial y regresión total.

3. A. Resultados

De los 10 CBC incluidos en el estudio, 5 presentaron histología superficial (tronco) y 5 infiltrante (cara). Se extrajeron dos biopsias de cada CBC con un *punch* de 4 mm: una de la zona de regresión y una de la zona tumoral. Las características de la muestra se pueden consultar en la tabla 3.

Histología	Características de la muestra (n)		
	Superficial	Infiltrante	Total Biopsias
Biopsia tumoral	5	5	10
Biopsia regresión parcial	3	3	6
Biopsia regresión total	2	2	4
Total biopsias	10	10	20
Total de carcinomas	5	5	10
Localización	CBC con regresión parcial: 3 en cara y 3 en tronco CBC con regresión total: 2 en cara y 2 en tronco		

Tabla 3. Características de las muestras tumorales.

En 6 de las biopsias de la zona de regresión pudimos apreciar islotes tumorales rodeados de un intenso infiltrado inmune (regresión parcial) mientras que en 4 únicamente se detectó infiltrado sin presencia de restos tumorales (regresión total). El infiltrado de la zona de regresión parcial se caracterizaba por un marcado incremento de células CD3+ (células T totales), especialmente a expensas de células CD4+, y de células CD68+, cuyo valor triplicaba el de la zona tumoral y la zona de regresión total. Ahora bien, las diferencias únicamente fueron estadísticamente significativas para el incremento de células CD68+ (*Histoscore* en la zona de regresión parcial 4.27, zona tumoral y zona de regresión total, 1 y 0.96 respectivamente). El incremento de células CD3+ no alcanzó la significación estadística aunque estuvo muy próxima ($p=0.055$). El incremento de células CD4+ en el área de regresión parcial tampoco consiguió la significación estadística ($p=0.150$) respecto a las otras 2 zonas, figuras 6-9. Se detectaron diferencias significativas respecto a la expresión de Bcl-2 ($p=0.006$; *Histoscore* en la zona de regresión parcial 2.30, mientras que en la zona tumoral era de 1 y en la de regresión total 0.83).

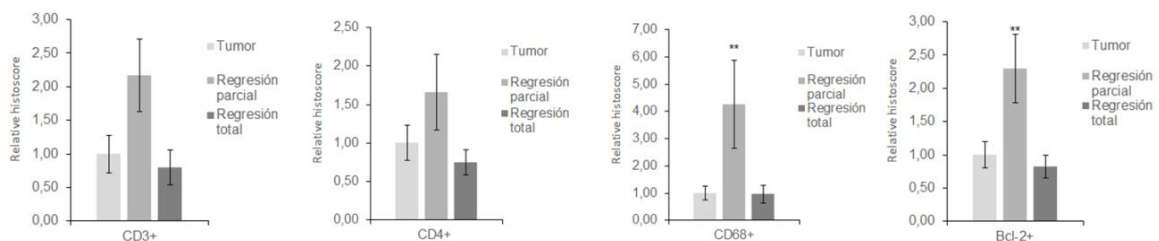


Figura 6. Representación de los resultados obtenidos en diagrama de barras para los marcadores: CD3, CD4, CD68 y Bcl-2. Se representa la magnitud de cada marcador en función del *Histoscore* (eje Y) y la zona de extracción de la biopsia (eje X).

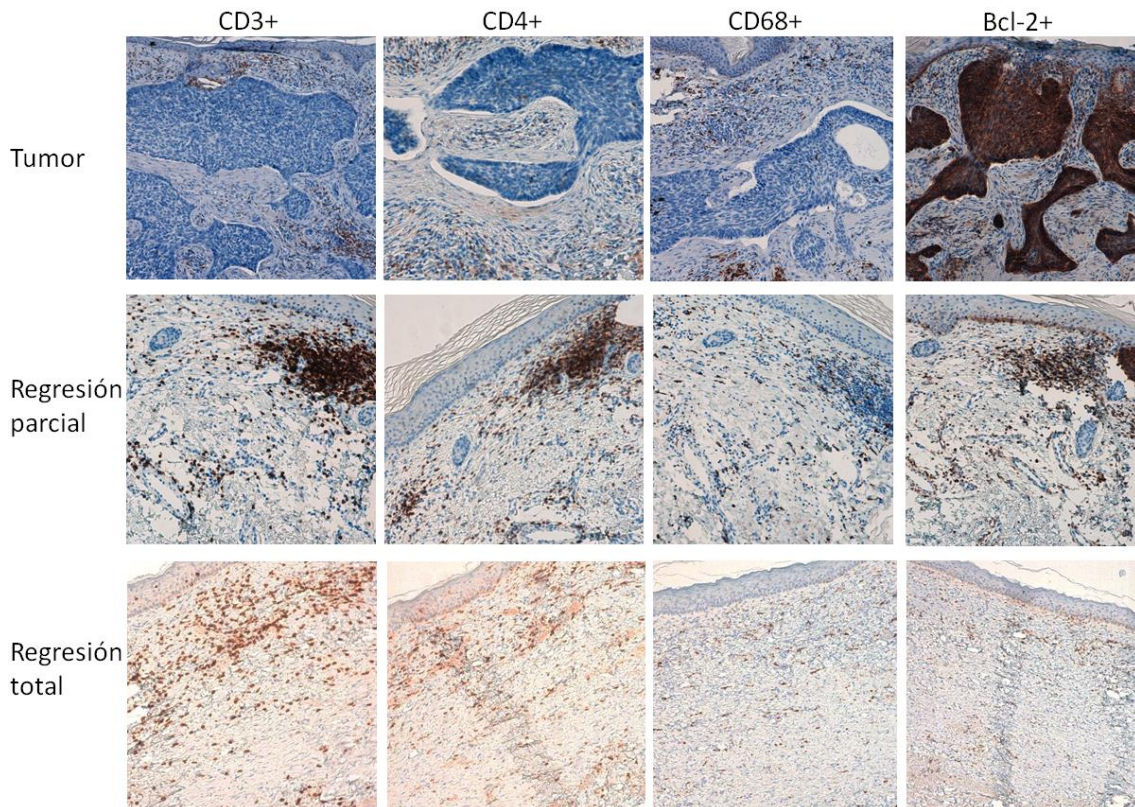


Figura 7. Resultados de la inmunohistoquímica de la zona tumoral, de la zona de regresión parcial y de la zona de regresión total de los marcadores: CD3, CD4, CD68 y Bcl-2.

Asimismo, en la zona de regresión parcial, se detectó un incremento muy discreto en la celularidad CD1a+ (células de Langerhans), CD56+ (*Natural Killers*) y FoxP3+ (Treg). La presencia de células FoxP3+ frenaría la respuesta inmune iniciada, lo que evitaría un daño innecesario en los tejidos, figuras 8 y 9. Los pequeños incrementos de estos 3 tipos de células sugieren un papel secundario en la respuesta inmunitaria contra el CBC.

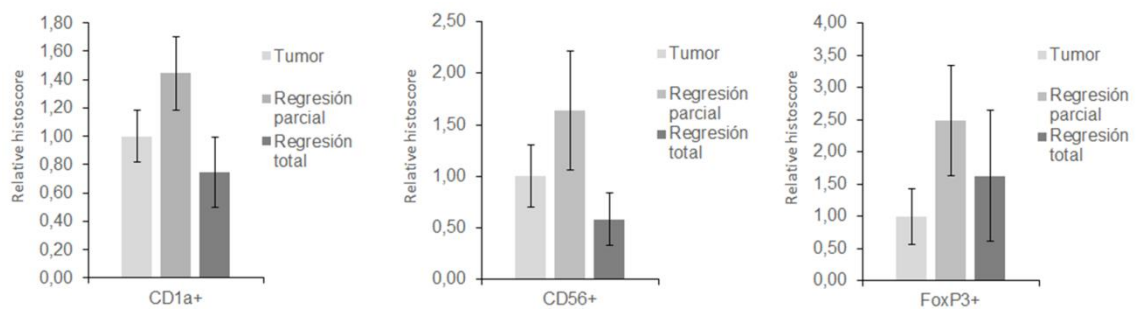


Figura 8. Representación en diagrama de barras de los resultados obtenidos de los marcadores: CD1a, CD56 y Foxp3. Se representa la magnitud de cada marcador en función del *Histoscore* (eje Y) y la zona de extracción de la biopsia (eje X).

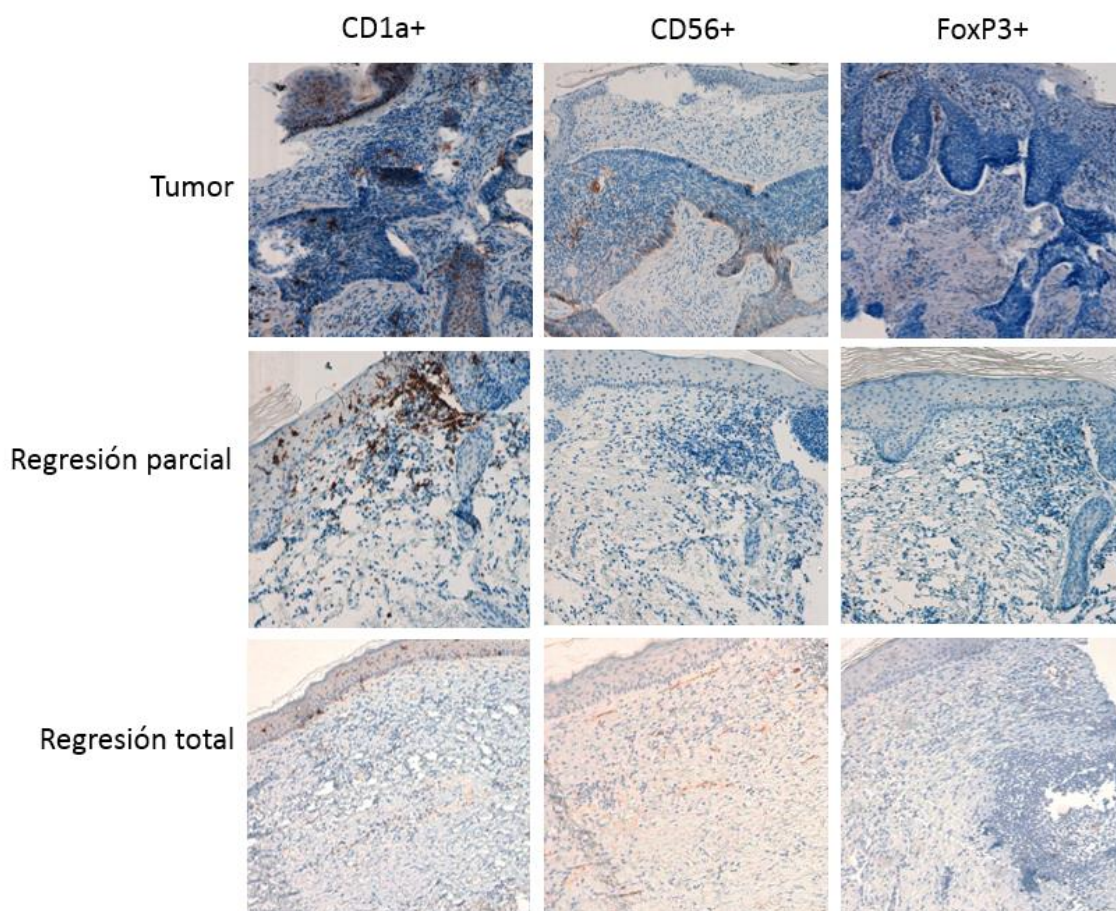


Figura 9. Resultados de la inmunohistoquímica de la zona tumoral, de la zona de regresión parcial y de la zona de regresión total de los marcadores: CD1a, CD56 y Foxp3.

Igualmente se encontraron incrementos reducidos, y sin diferencias estadísticamente significativas, en la expresión de CD20+ (linfocitos B), en la zona de regresión parcial y total, a diferencia de lo ocurrido con los linfocitos CD8+ (linfocitos T citotóxicos) que estaban ligeramente más elevados en la zona tumoral, que en las áreas de regresión parcial y total, figuras 10 y 11.

En cuanto a las características funcionales del infiltrado, hemos de destacar el incremento, estadísticamente significativo, de la expresión de Bcl-2 ($p=0.006$) (proteína antiapoptótica), figura 6, y de CASP3 (caspasa 3, mediador apoptótico), muy cercana a la significación estadística ($p=0.069$) en la zona de regresión parcial, también encontramos un aumento de TIA-1 y GrzB, figuras 10, 11 y 12. El hecho de que exista un aumento de ambos marcadores en la zona de regresión parcial, nos sugiere que existe cierta activación de los linfocitos CD8+ y una respuesta citotóxica.

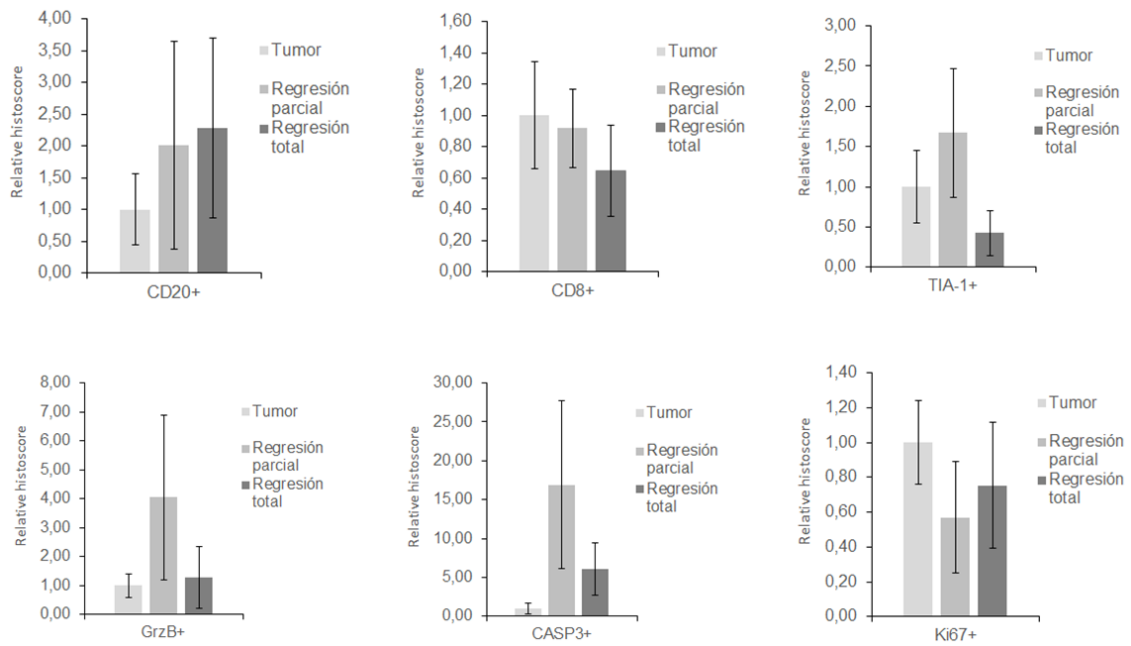


Figura 10. Representación en diagrama de barras de los resultados obtenidos de los marcadores: CD20, CD8, TIA1, GRZB, CASP3 y Ki67. Se representa la magnitud de cada marcador en función del *Histoscore* (eje Y) y la zona de extracción de la biopsia (eje X).

El índice de proliferación celular Ki67+ del infiltrado se mantuvo bajo en las tres localizaciones (en este trabajo no se estudió la expresión de Ki67 del tumor, solo se analizaba el infiltrado inmunoinflamatorio), aunque la expresión fue mayor en el infiltrado peritumoral frente a las zonas de regresión, figuras 10 y 12. Ki67 se expresa abundantemente en las células tumorales y en las células proliferativas de la capa basal de la epidermis, como sucede en condiciones normales.

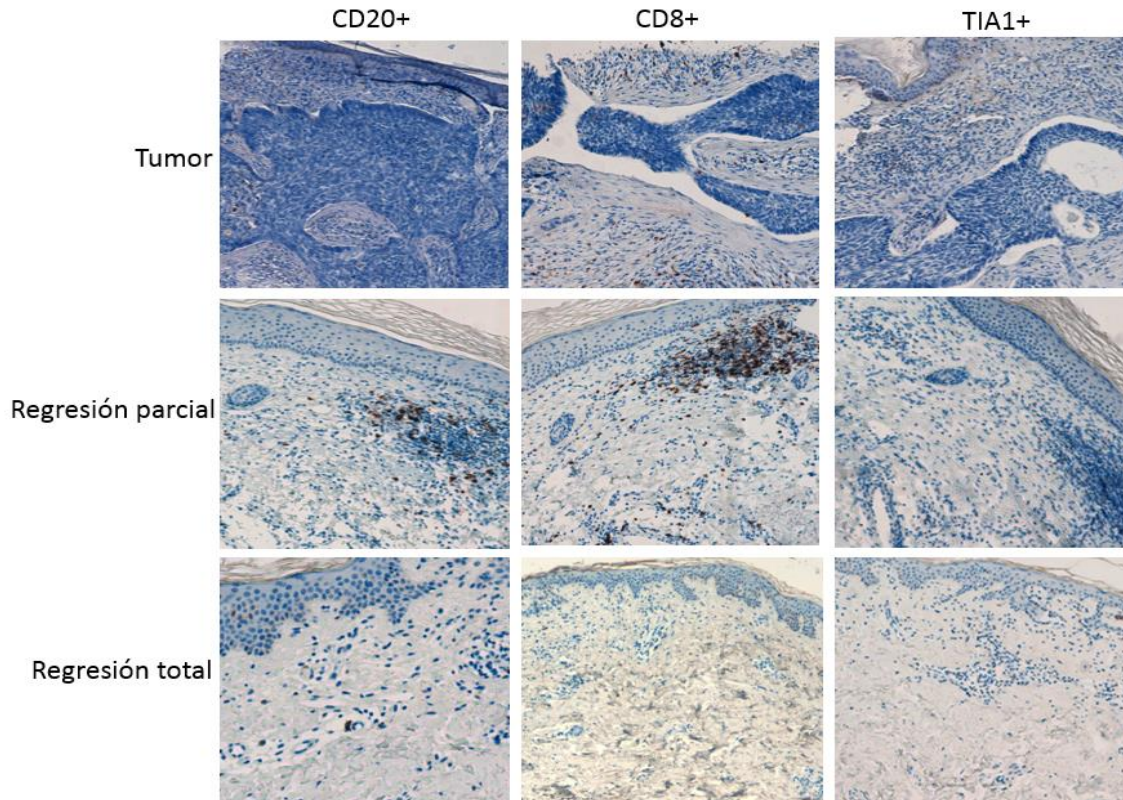


Figura 11. Resultados de la inmunohistoquímica de la zona tumoral, de la zona de regresión parcial y de la zona de regresión total de los marcadores: CD20, CD8 y TIA1.

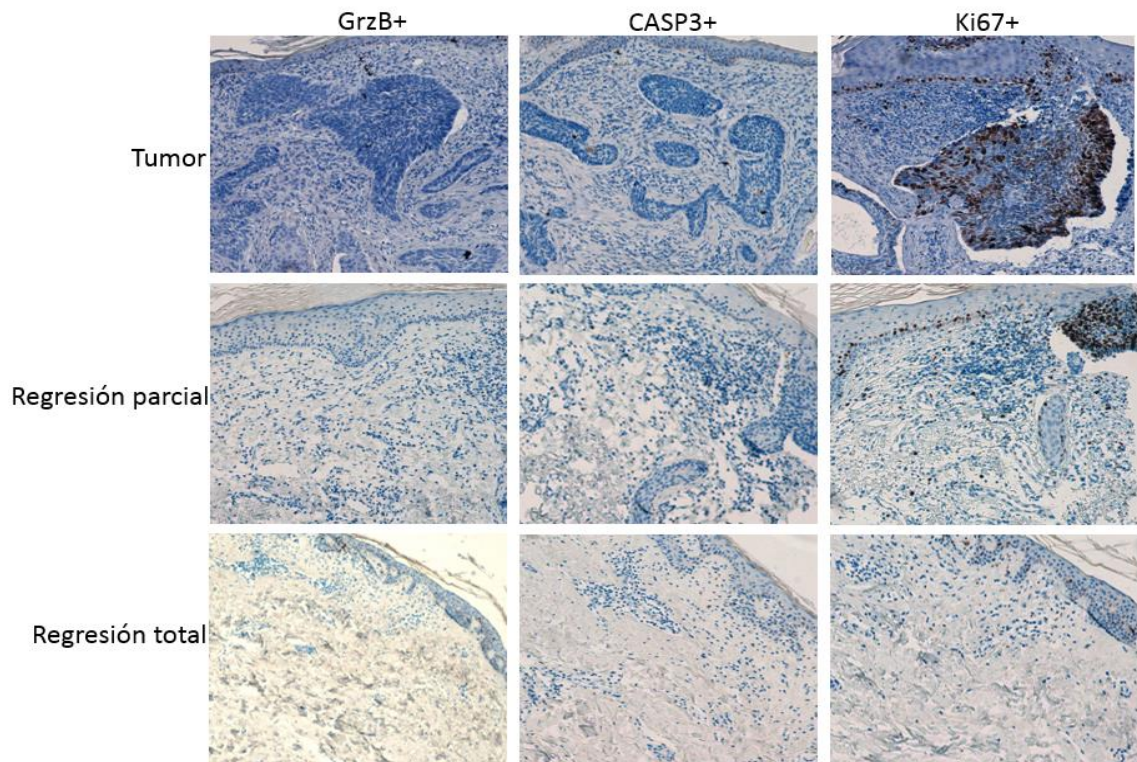


Figura 12. Inmunohistoquímica de la zona tumoral, de la zona de regresión parcial y de la zona de regresión total de los marcadores GrzB, CASP3 y Ki67. Obsérvese el elevado índice de proliferación del CBC y de la capa basal de la epidermis, y el escaso número de células proliferativas en el infiltrado peritumoral.

4. A. Discusión

La inmunidad juega un papel fundamental en la defensa contra el cáncer. Tras una fase de equilibrio, gracias a las mutaciones de las células cancerígenas y la inmunoección, las células tumorales evaden la inmunidad y sintetizan citocinas tolerogénicas que favorecen su crecimiento y la neoangiogénesis. El fenómeno de regresión se caracteriza por la destrucción parcial o total del tumor, presumiblemente por la acción del sistema inmune. En el CBC se ha estudiado poco este fenómeno, muy evidente en el CBC superficial, en que se observa una zona central de aspecto cicatricial y una zona periférica con micropápulas tumorales, aunque también se puede apreciar en otras formas clínicas. Para Fujimura³, la regresión puede ser activa (presente en el momento de biopsiar), o bien pasiva (regresión pasada, inactiva en el momento de biopsiar). Definen como criterios de regresión activa, en un CBC, la presencia de la empalizada periférica presente en condiciones normales en los diversos islotes tumorales, acompañada de infiltrado linfocítico que penetra y rodea los nidos tumorales. Hablan de regresión pasada cuando detectan la presencia de colágeno eosinofílico en la dermis, reducción de los apéndices cutáneos en las áreas cicatriciales, aumento del número de vasos sanguíneos y un número variable de linfocitos y células plasmáticas. Nosotros preferimos simplificar estos conceptos y hablamos de regresión parcial cuando quedan islotes tumorales rodeados de infiltrado inflamatorio en una zona de aspecto cicatricial, sin tratamiento previo, y de regresión total cuando solo se aprecia infiltrado inflamatorio o bien fibrosis.

Según la literatura revisada respecto a la respuesta inmune frente al cáncer^{5,7}, esperábamos encontrar un infiltrado compuesto principalmente por linfocitos T citotóxicos (CD8+), macrófagos (CD68+) y células *NK* (CD56+), en la zona peritumoral y en la de regresión parcial; y un infiltrado inflamatorio centinela y áreas fibróticas en la zona de regresión total. También esperábamos un incremento de linfocitos Treg (FoxP3+), población implicada en la evasión tumoral de la respuesta inmune, en la zona tumoral³.

En nuestro estudio sobre el CBC, hemos observado una expresión elevada y estadísticamente significativa de células CD68+ (macrófagos con actividad fagocítica), sobre todo en el área de regresión parcial ($p=0.005$). La población de macrófagos,

células CD68+, puede provenir de la activación de la respuesta inmunitaria a través de la vía Th1 y a la presencia de macrófagos en la población inmunoinflamatoria como células presentadoras de antígenos. Las células CD3+, también presentan un aumento en la zona de regresión parcial que aunque no llegue a la significación estadística, probablemente por el tamaño muestral, se aproxima mucho ($p=0.055$). También hemos observado un incremento menos importante de células CD4+ (linfocitos T *helper*) ($p=0.150$). Estos resultados coinciden con los de otros autores^{3, 27-30}. El predominio de la respuesta en la zona de regresión parcial significaría que la respuesta inmune celular antitumoral es más intensa en dicha zona, donde el sistema inmune, tanto innato como adaptativo, sería capaz de superar los mecanismos de evasión e inhibición tumoral.

En nuestra serie, las células CD8+ no presentaron significación estadística ($p=0.74$), la tendencia observada en los gráficos es que sea menor de lo esperado, obteniendo en la zona peritumoral un *Histoscore* de 1, en las zonas de regresión parcial un *Histoscore* de 0.92 y en la zona de regresión total un *Histoscore* de 0.64. La aparente mayor presencia de linfocitos T CD8+ en la zona peritumoral no tiene porqué significar una mayor actividad citotóxica en dicha localización, sino que hay que observar la presencia de células TIA-1+ y GrzB+ que estarían relacionados con la activación de los linfocitos CD8+ y que en este caso no se objetiva un aumento de ambas poblaciones. Esto significaría que las células CD8+ podrían tratarse simplemente de población acompañante del infiltrado inmunoinflamatorio. Sin embargo, en la zona de regresión parcial aunque encontramos un menor número de linfocitos T CD8+ en comparación con la región peritumoral, estos presentan mayor actividad citotóxica a tenor del aumento de células TIA-1+ y GrzB+ que implicaría la activación de los linfocitos CD8+ como ya hemos explicado anteriormente.

De igual modo, la presencia de células CD1a+ (células de Langerhans), CD 56+ y CD20+ (linfocitos B) han estado muy poco presentes en nuestras muestras y sin apenas variación entre las 3 zonas estudiadas ($p=0.19$; $p=0.22$ y $p=0.61$ respectivamente), lo que significa que probablemente tengan un papel secundario en la respuesta inmune frente al CBC.

Los linfocitos Treg (FoxP3+) se encuentran ligeramente aumentados en la zona de regresión parcial, entendiéndose como represores fisiológicos de la respuesta inmune iniciada, proporcionales al aumento del infiltrado. Teóricamente en la zona de regresión parcial es donde la actividad inmunológica antitumoral es más intensa y por tanto, debe de haber mayor número de linfocitos Treg que intenten frenar la cascada inmunitaria.

Como se esperaba, la presencia de células CASP3+ como se observa en la figura 10, se vio francamente elevada en las zonas de regresión parcial frente a la zona peritumoral y la zona de regresión total y cercana a la significación estadística ($p=0.063$). Las células CASP3+ son mediadoras de la apoptosis y por tanto es normal que en las zonas de regresión espontánea, especialmente en las zonas de regresión parcial, sea donde se exprese más intensamente, ya que es la zona de máxima actividad inmune antitumoral. Ahora bien, Bcl-2 es una proteína antiapoptótica y por tanto esperábamos encontrar una expresión disminuida en la zona de regresión parcial y no un aumento de expresión y menos de forma estadísticamente significativa ($p=0.006$). Este aumento de células Bcl-2+ podría explicarse a la actividad antiapoptótica presente en los linfocitos T y otras poblaciones celulares del sistema inmune que como hemos visto coinciden que están en mayor número en la zona de regresión parcial. Sin embargo, no podemos asegurar con certeza nuestro razonamiento, puesto que serían necesario dobles tinciones inmunohistoquímicas para poder caracterizar las células que están expresando Bcl-2.

La presencia de un mayor infiltrado inmune en la zona de regresión total en comparación con la piel normal^{31, 32}, pero inferior al de la zona de regresión parcial, probablemente indicaría el papel centinela de este infiltrado. El infiltrado localizado en la zona tumoral, indicaría una fase inicial de la respuesta inmune, en la que habría un cierto equilibrio.

En conclusión, destacamos el mayor número de células efectoras CD3+, CD4+ y CD68+ en la zona de regresión parcial, donde se libra la batalla entre el sistema inmune y el tumor. En el CBC las células inmunes más implicadas son por tanto los linfocitos T *helper* y los macrófagos, sin embargo, los linfocitos T citotóxicos, CD8+, están más

aumentados en la zona tumoral seguido de la zona de regresión parcial y en menor medida en la zona de regresión total. Por otro lado, los linfocitos T CD56+ están más aumentados en la zona de regresión parcial. En la zona de regresión parcial las células tumorales no evaden la respuesta inmune. En las zonas de regresión total las células linfoides efectoras han eliminado el tumor y ocupan dicha zona. Más adelante comenzará la respuesta reparadora por los macrófagos y el infiltrado inflamatorio será sustituido por tejido cicatricial. Sin embargo, la zona más periférica del tumor es capaz de evadir la respuesta inmune y continuar proliferando. La principal limitación de nuestro estudio ha sido el tamaño muestral y probablemente por este motivo no hemos obtenido la significación estadística en algunos marcadores, pero los análisis realizados nos han sido de utilidad para observar el comportamiento del sistema inmune en el CBC.

1. B. Introducción: Caracterización del infiltrado inmunoinflamatorio en la respuesta al tratamiento con ingenol mebutato.

1.1. B. Papel de los tratamientos inmunomoduladores en el carcinoma basocelular

A pesar de que la cirugía es el tratamiento de primera línea del carcinoma basocelular, existe un conjunto de pacientes que busca un tratamiento efectivo ambulatorio que respete la integridad tisular, mantenga buenos resultados cosméticos y evite cicatrices. En respuesta a esta demanda disponemos de la terapia tópica con 5-fluorouracilo e imiquimod al 5% en crema y la terapia fotodinámica. La última molécula comercializada hasta la fecha ha sido el ingenol mebutato (IM), aprobado para el tratamiento tópico de las queratosis actínicas, pero todavía no para el tratamiento del carcinoma basocelular.

Como ya habíamos comentado, imiquimod es una imidazoquinolinamina sintética (C₁₄H₁₆N₄) que induce la liberación de diversas citocinas y es capaz de modificar la respuesta innata y adaptativa. Por otra parte, imiquimod se une al Toll like Receptor nº 7 (TLR7) en la superficie de los macrófagos y de las células dendríticas y activa la transcripción del ARNm de diversas citocinas, incluyendo el interferón α (IFN- α), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la interleucina 12 (IL-12). Estas citocinas activarán las células de Langerhans, las células dendríticas y los macrófagos, que procesarán antígenos locales y migrarán a los nódulos linfáticos regionales, donde los antígenos serán presentados a los linfocitos CD4+ *naïve*. Estos linfocitos T se diferenciarán a linfocitos T activados, y volverán a la dermis donde desarrollarán una respuesta inmune a cargo mayoritariamente de los linfocitos T *helper* 1 (Th1)³¹. Además, imiquimod induce la apoptosis de las células tumorales a través de la activación de unas proteasas que forman la familia de las caspasas y la disminución de la expresión de sustancias antiapoptóticas, como Bcl-2. En relación al CBC, imiquimod también bloquea la activación de la vía de señalización Hedgehog/GLI (*Glioma associated oncogene*), la principal vía de promoción de la carcinogénesis en el CBC³¹. Imiquimod actualmente, está indicado en el tratamiento de las queratosis actínicas no hiperqueratósicas y no hipertróficas y de los condilomas acuminados genitales y perianales externos. Más recientemente ha sido aprobado en la terapia de carcinomas basocelulares superficiales de pequeño tamaño³².

En cuanto al ingenol mebutato, se extrae de la planta *Euphorbia peplus* y fue aprobado por la Agencia Europea del Medicamento y Productos sanitarios (AEMPS) en noviembre del 2012 para el tratamiento de las queratosis actínicas³³. Actualmente está indicado como tratamiento tópico de las queratosis actínicas y del campo de cancerización en adultos. El mecanismo de acción no está definido totalmente. Modelos *in vitro* e *in vivo* han demostrado un mecanismo dual: por una parte, induce la muerte celular en la lesión local, y por otra, promueve una respuesta inflamatoria caracterizada por la producción local de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, lo que origina la infiltración de células inmunocompetentes. Los resultados obtenidos en dos estudios clínicos sobre los efectos biológicos de ingenol mebutato en queratosis actínicas han demostrado que la administración tópica induce necrosis epidérmica y una respuesta inflamatoria intensa en la epidermis y la dermis papilar, con predominio de células T infiltrantes, neutrófilos y macrófagos^{34, 35}.

La única contraindicación es la hipersensibilidad al principio activo o a alguno de los excipientes. Como efectos adversos, pueden producirse reacciones cutáneas locales como eritema, descamación, costras, pústulas, vesículas, erosión y ulceración, en la zona de aplicación. No se han realizado estudios de interacciones con otros medicamentos, pero son improbables las reacciones sistémicas, dado que ingenol mebutato no se absorbe a nivel sistémico. Tampoco se han realizado estudios en embarazadas ni durante la lactancia, así que es preferible evitar su uso durante estos periodos.

1.2. B. Evidencias experimentales del papel de la inmunidad en el tratamiento médico del CBC

Nos centraremos en los artículos de Vidal *et al.*^{31, 36,37} dado que nos han servido de referencia para realizar el diseño de nuestro estudio. Uno de sus artículos³¹, es un ensayo clínico abierto y prospectivo. Sus objetivos fueron estudiar la eficacia de imiquimod 5% en crema en los CBC primarios de histología superficial, nodular e infiltrante y caracterizar la presencia de diferentes subpoblaciones celulares en el infiltrado (CD3+,CD8+,CD20+,CD68+, GrzB+, S100+), la expresión de p53, Bcl-2, Ki-67, así como el índice apoptótico antes y durante el tratamiento. Se incluyeron 55 pacientes caucásicos con CBC primarios de diámetro de 8 mm o más. Todos los

pacientes se aplicaron la misma dosis, 24 tubos de imiquimod al 5% en crema. Se asignaron los pacientes en 4 grupos diferentes (A,B,C y D); 35 pacientes (grupos A, B y C) se aplicaron imiquimod tres veces por semana durante un total de 8 semanas mientras que los otros 20 pacientes (grupo D) se aplicaron imiquimod cinco veces por semana durante 5 semanas. Las biopsias se realizaron el día 22 post-tratamiento en el subgrupo A, el día 15 en el subgrupo B, el día 8 en el subgrupo C y el día 8 en el grupo D. De este modo se estudió la evolución de los marcadores a lo largo del tratamiento. Respecto a la eficacia, no se encontraron diferencias en las dos pautas de tratamiento. A las 6 semanas se constató persistencia de 13 CBC (1 CBC nodular y 12 CBC infiltrantes) y la curación clínica en 42 CBC. Todos los pacientes siguieron controles hasta 2 años después, 41 de los 55 CBC tratados se mantuvieron clínicamente curados, entre los cuales habían curado 4/4 (100%) CBC superficiales, 7/8 (88%) CBC nodulares y 30/43 (70%) CBC infiltrantes. Uno de los CBC considerado curado inicialmente recurrió.

A nivel inmunohistoquímico, se observó un incremento notable y estadísticamente significativo de todas las subpoblaciones celulares estudiadas a excepción de las células CD56+, *Natural killers*. Pero lo más destacable es el aumento de las células CD8+, correspondientes a los linfocitos T citotóxicos, principales células efectoras en la respuesta antitumoral. La expresión de Bcl-2, proteína con función antiapoptótica, disminuyó de forma estadísticamente significativa durante el tratamiento en la mayoría de grupos (A, C y D), correlacionándose con el aumento del índice apoptótico y coincidiendo con el comentado aumento del infiltrado inmunoinflamatorio, entendiéndose así el efecto de la respuesta antitumoral. La expresión de p53 i Ki-67 se mantuvo invariable.

Se han realizado pocos estudios sobre la eficacia, seguridad y mecanismo de acción de ingenol mebutato en el tratamiento del carcinoma basocelular. En todos ellos se han obtenido buenos resultados en cuanto a eficacia³⁸⁻⁴⁴. Ahora bien, no hemos encontrado trabajos que examinen el mecanismo de acción, tanto a nivel celular como a nivel molecular en este campo.

1.3. B. Estudios de ingenol mebutato y CBC

El ingenol mebutato es un éster diterpeno extraído y purificado de la planta *Euphorbia Peplus*. Se ha usado exitosamente en el tratamiento tópico de las queratosis actínicas y del campo de cancerización. Se ha demostrado que parte de su respuesta está mediada por el sistema inmunoinflamatorio y la activación de la proteína quinasa C. Como se ha comentado, en el campo de las queratosis actínicas su mecanismo de acción es dual. Se caracteriza por una rápida necrosis de la epidermis y la dermis superficial que comienzan de 1 a 2 horas tras la aplicación del producto^{34, 38, 40,44}. Produce un incremento de calcio intracelular, inflamación mitocondrial y pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática, seguida por la muerte de las células tumorales. La aplicación tópica genera infiltración neutrofílica, debido a la proteína quinasa C. De este modo, se produce un incremento de TNF- α e IL-8, los cuales reclutan y subsecuentemente activan los neutrófilos hacia el infiltrado inflamatorio. Sin embargo, el mecanismo exacto de acción de ingenol mebutato en el carcinoma basocelular todavía no se sabe con exactitud⁴⁰.

Ante la escasez de estudios sobre el efecto de ingenol mebutato en el CBC, nos propusimos estudiar el mecanismo de acción de ingenol mebutato mediante el estudio de los cambios histopatológicos secuenciales y la composición del infiltrado inmunoinflamatorio que se suceden tras la aplicación de ingenol mebutato en gel. Al mismo tiempo, determinar su eficacia y seguridad. Algunos quimioterápicos tópicos, como el imiquimod o el 5-fluorouracilo, fueron inicialmente aprobados para el tratamiento de las queratosis actínicas y posteriormente demostraron su efectividad en el CBC.

Diseñamos un estudio clínico experimental, abierto y prospectivo, en el que incluimos pacientes con carcinomas basocelulares localizados en zonas de bajo riesgo como el tronco o las extremidades, con un diámetro igual o inferior a 1 cm. Los pacientes incluidos en el estudio debían ser mayores de edad y firmar el consentimiento informado correspondiente a la inclusión en el estudio. Se excluyeron las mujeres embarazadas y los pacientes inmunodeprimidos. Nos planteamos como objetivos:

- 1) Calcular el porcentaje de curación de los CBC (especialmente el subtipo superficial, pero también el nodular y el infiltrante) de < 1cm de diámetro
- 2) Determinar su seguridad
- 3) Caracterizar las subpoblaciones del infiltrado inmunoinflamatorio a los 3, 10 y 30 días post-tratamiento
- 4) Valorar la modificación de la actividad apoptótica y mitótica

2. B. Material y métodos

2.1. B. Reclutamiento y recogida de muestras

Los pacientes fueron reclutados en las consultas externas del Servicio de dermatología del HUAV cumpliendo los siguientes criterios de inclusión:

- Adulto caucásico mayor de 18 años
- CBC primario confirmado histológicamente
- Área tumoral igual o inferior a 1 cm²
- Localización tumoral en zonas de bajo riesgo (tronco y extremidades)

Tras la anamnesis, se recogían datos referentes al grado de fotoexposición, tipo de piel y se descartaba inmunosupresión, se anotaba el subtipo de CBC clínico, la localización y su tamaño. Posteriormente se daba información sobre el estudio a los candidatos para firmar el consentimiento informado. Para confirmar el diagnóstico de CBC y el subtipo histológico se realizaba una biopsia tipo *punch de 3 mm* bajo anestesia local. En la visita de confirmación, mediante asignación aleatoria en función de la disponibilidad de la agenda médica, fueron atribuidos a uno de los tres grupos de seguimiento (1, 2 y 3), e informados sobre el tratamiento. El tratamiento consistía en la aplicación de ingenol mebutato gel 500 mcg/g durante dos noches consecutivas, bajo oclusión con discos de aluminio, sobre todo el área del CBC, incluyendo 1 cm de piel sana perilesional. A los pacientes del grupo 1 se les tomó una biopsia a los 3 días de haberse aplicado el producto, al grupo 2 a los 10 días y al grupo 3 a los 30 días, figura 13.

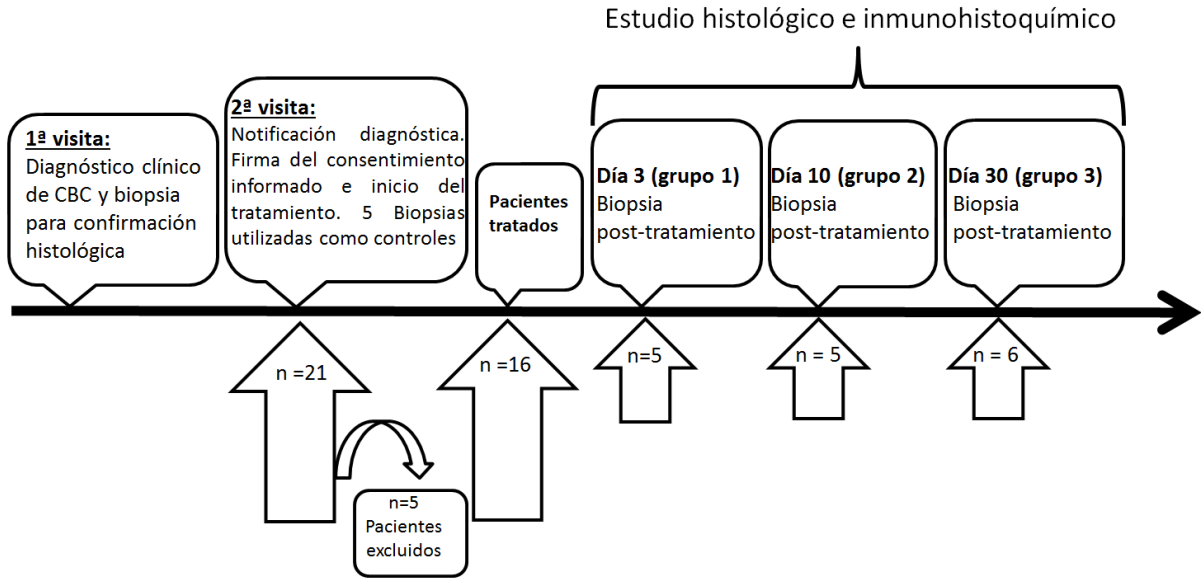
Diseño del estudio

Figura 13. Esquema del estudio, aleatorización de los pacientes en los 3 brazos de seguimiento en función del día a realizar la biopsia (días 3, 10 y 30).

Posteriormente se establecieron visitas de seguimiento a los 3, a los 6, a los 12 y a los 24 meses de haber finalizado el tratamiento, con el fin de detectar posibles recidivas o registrar efectos adversos a largo plazo.

Las biopsias de confirmación, pretratamiento, fueron sometidas a una técnica convencional de hematoxilina-eosina. Las realizadas los días 3, 10 y 30 se estudiaron mediante inmunohistoquímica. Se seccionaron los bloques parafinados con un grosor de 3 μm , se secaron a 65°C y luego se sometieron a un proceso de pre-tratamiento (desparafinización, rehidratación y liberación de los epítomos), para iniciar posteriormente la tinción de las muestras mediante un anticuerpo primario, uno secundario y un cromógeno más su sustrato. En concreto, para el pre-tratamiento, se sumergió la muestra en una solución tamponada 50 x Tris/EDTA, pH 9 en un baño termoestable (módulo de pre-tratamiento, *PT-LINK (DAKO)*) a 95°C durante 20 min. . Se dejó enfriar la muestra a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se incubó en peróxido de hidrógeno (*EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent*) durante 5 minutos

para bloquear la peroxidasa endógena, y se realizó un *buffer* de lavado 3 veces seguidas durante 5 minutos.

Una vez preparada la muestra, se incubó con los anticuerpos primarios utilizados en el estudio anterior, tabla 1, durante 20 minutos. Seguidamente, se realizaron 3 ciclos seguidos de *buffer* de lavado, durante 5 minutos y se incubó la muestra con el anticuerpo secundario (*EnVision FLEX/HRP*) durante 20 minutos. Se repitieron 3 ciclos del *buffer* de lavado durante 5 minutos. Seguidamente se incubó la muestra con un cromógeno (*EnVision FLEX DAB+Chromogen*) y un sustrato (*EnVision FLEX Substrate Buffer*) durante 10 minutos. Se repitieron los 3 ciclos de *buffer* de lavado, durante 5 minutos. Finalmente, se contratiñó la muestra con hematoxilina durante 5 minutos y se deshidrató mediante un gradiente creciente de alcoholes hasta la total inmersión en xileno (gradiente: agua destilada, alcohol 50%, alcohol 80%, alcohol absoluto, xileno-alcohol, Xileno), para acabar montándola mediante un medio de montaje no acuoso. También se prepararon muestras controles para evaluar los posibles negativos.

La lectura sistemática de las muestras se realizó mediante un sistema de imagen automatizado, el ACIS® III Instrument (DAKO, Denmark, Glostrup), que calcula de forma automática el porcentaje de células teñidas por el cromógeno, respecto al total de células del infiltrado. Para calcular el *Histoscore* este porcentaje se multiplicaba por la intensidad del infiltrado total (de 0 a 3), tal y como se hizo en el estudio anterior de regresión espontánea del CBC.

Las biopsias realizadas a los pacientes de los distintos grupos fueron sometidas a tinciones inmunohistoquímicas con los diferentes anticuerpos contra los marcadores moleculares para caracterizar el infiltrado inmunoinflamatorio así como los marcadores funcionales de apoptosis y de proliferación celular utilizados en el estudio de regresión. En la tabla 2 se detalla el significado de cada uno de los marcadores moleculares determinados, como ya comentamos anteriormente.

Por otra parte, para el cálculo de la eficacia, se registró el número de casos con respuesta favorable a IM y la incidencia de efectos adversos relacionados con el tratamiento, tabla 4.

Parámetros evaluados	Variables
Valoración de la eficacia del tratamiento	Remisión clínica completa, remisión histológica completa.
Incidencia de efectos adversos relacionados con el tratamiento	Incidencia de reacciones cutáneas locales: eritema, edema, descamación, incrustación, aparición de vesículas, pústulas, erosión y ulceración e incidencia de efectos adversos sistémicos.
Identificación inmunofenotípica y caracterización de las poblaciones celulares infiltrantes	Expresión de CD1A, CD3, CD4, CD8, CD20, CD56, CD68, FoxP3, GrzB, TIA1.
Índice de proliferación celular	Expresión de Ki67
Cuantificación del grado de apoptosis	Expresión de Bcl-2, detección de caspasa 3-activada.

Tabla 4. Parámetros evaluados en todos los pacientes que entraron en el estudio. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el test ANOVA.

3. B. Resultados

En total 21 pacientes entraron en el estudio, pero solo 16 lo completaron. Hubo 5 pérdidas como consecuencia del incorrecto cumplimiento terapéutico, en ocasiones causados por la presencia de efectos adversos. De los 16 CBC finalmente incluidos en el estudio, 10 eran de subtipo superficial, 5 eran nodulares y 1 infiltrante.

3.1. B. Eficacia y seguridad de IM gel al 0.05% bajo oclusión en el CBC

En conjunto, en las biopsias post-tratamiento tomadas a diferentes tiempos en función de la aleatorización de los grupos se comprobó una remisión total del tumor en 10/16 (62.5%) CBC, de los cuales 8/10 (80%) eran CBC superficiales, 2/5 (40%) CBC nodulares y 0/1 (0%) CBC infiltrantes. En los 2 años posteriores en que se siguieron a los pacientes no hubo evidencia de recurrencia en ningún caso.

En cuanto a los eventos adversos, 10/16 (62.5%) de los pacientes experimentaron una reacción inflamatoria local intensa con eritema, edema, formación de ampollas y erosiones, que se extendían más allá de la zona de aplicación, figuras 14 y 15, junto con escozor y quemazón. Todos estos síntomas fueron remitiendo de forma gradual a partir del tercer día, hasta ceder en gran medida el día 10 y por completo a las 5 semanas de seguimiento.

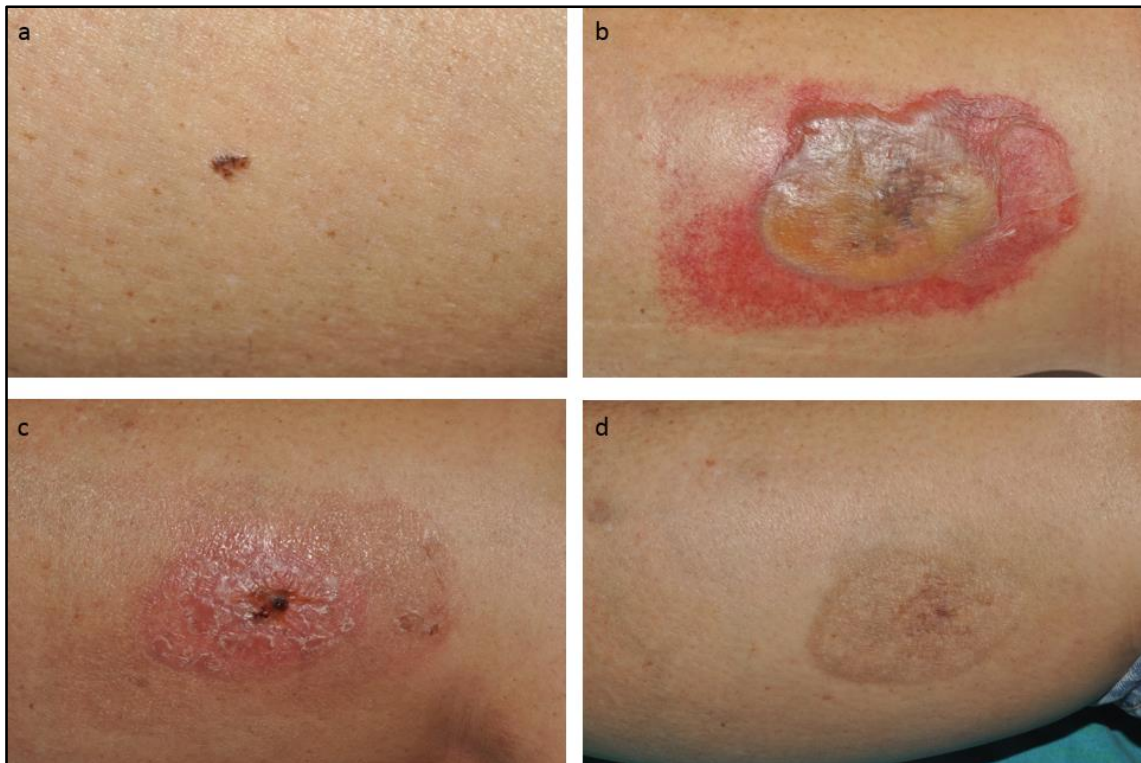


Figura 14. Caso 4, efectos locales adversos tras tratamiento con IM. (a) CBC nodular localizado en pierna. (b) Día 3. Importante reacción inflamatoria con eritema, edema y formación de ampolla y erosiones que sobrepasan la zona de tratamiento. (c) Eritema residual al cabo de 1 mes. (d) Curación clínica dejando zona cicatricial consistente en una placa hiperpigmentada a los 6 meses de seguimiento.

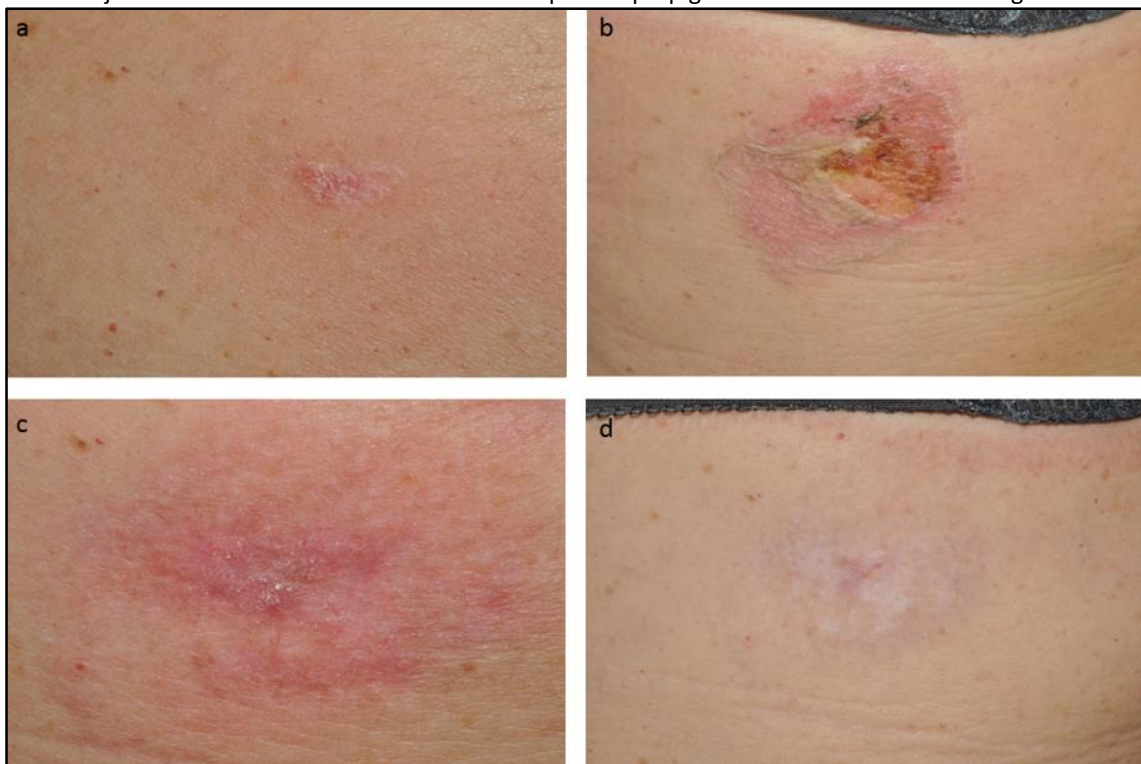


Figura 15. Caso 10, efectos locales adversos tras tratamiento con IM. (a) CBC superficial del tronco. (b) Día 10. Placa erosiva tras la ruptura de la ampolla. (c) Eritema residual a los 2 meses. (d) Control a los 6 meses, curación clínica dejando placa cicatricial residual.

Al finalizar el tratamiento, el eritema estaba presente en el 100% de los casos mientras que presentaron ampollas y erosiones el 62.5% de los pacientes. No se registraron efectos adversos sistémicos en ningún caso. Como hemos visto, en 6 casos no se produjo remisión completa tumoral, de los cuales 2/6 (33.33%) habían presentado reacción local leve.

3.2. B. Estudio histológico secuencial

Se observó una importante necrosis epitelial y de la dermis superficial y media en las biopsias tomadas al día 3 post-tratamiento (grupo 1), acompañadas de un importante infiltrado inflamatorio compuesto principalmente por células polimorfonucleares (PMN), figura 16. La necrosis y el infiltrado inflamatorio disminuyeron gradualmente con el tiempo. Las biopsias tomadas a los 10 días después del tratamiento (grupo 2) presentaron menor grado de necrosis e infiltrado inflamatorio que el grupo 1, y las biopsias tomadas a los 30 días posteriores al tratamiento tuvieron incluso grados más bajos que los del grupo 2. A los 10 días del tratamiento la necrosis comenzaba a ser reemplazada por una fase inicial de fibrosis, tejido reparativo, mientras que al día 30 después del tratamiento, la necrosis fue completamente reemplazada por fibrosis, tipo cicatricial, figura 16.

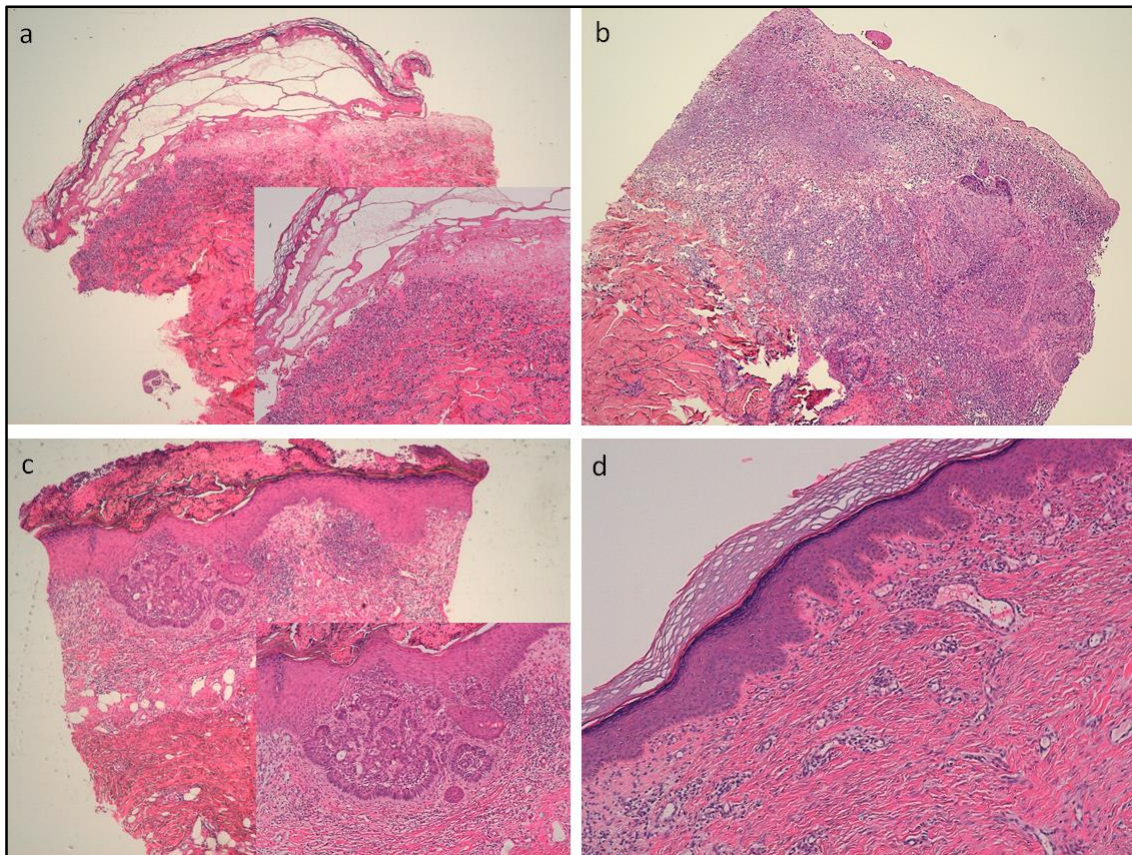
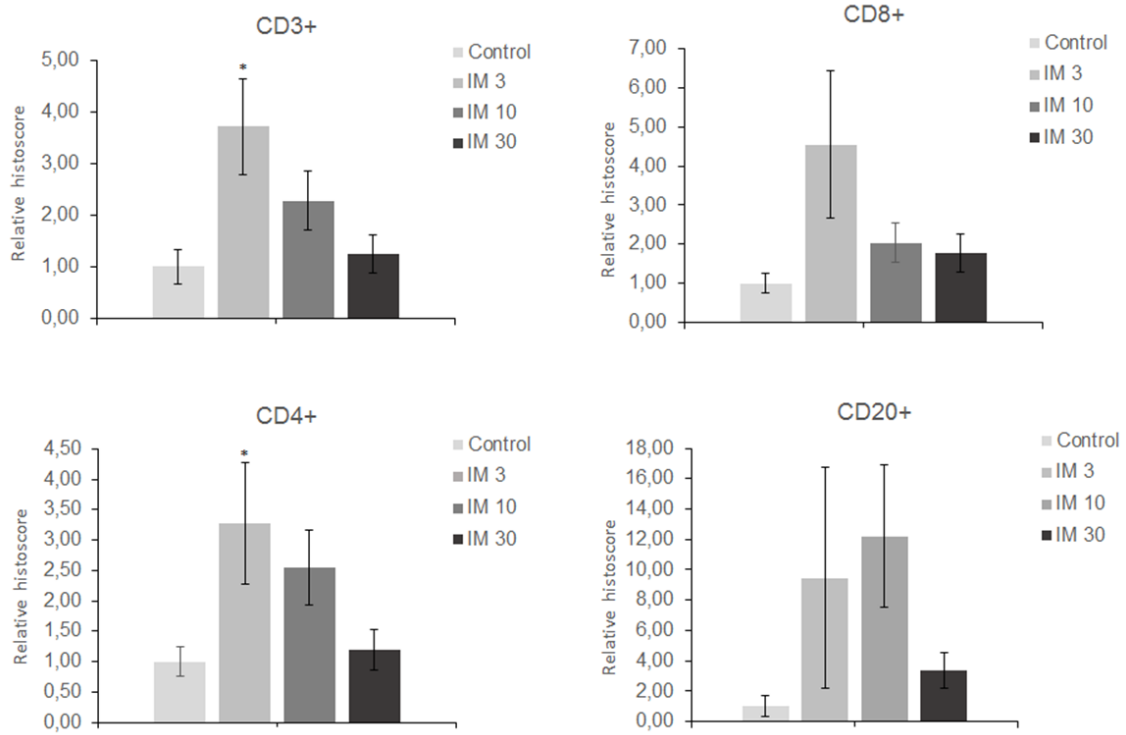


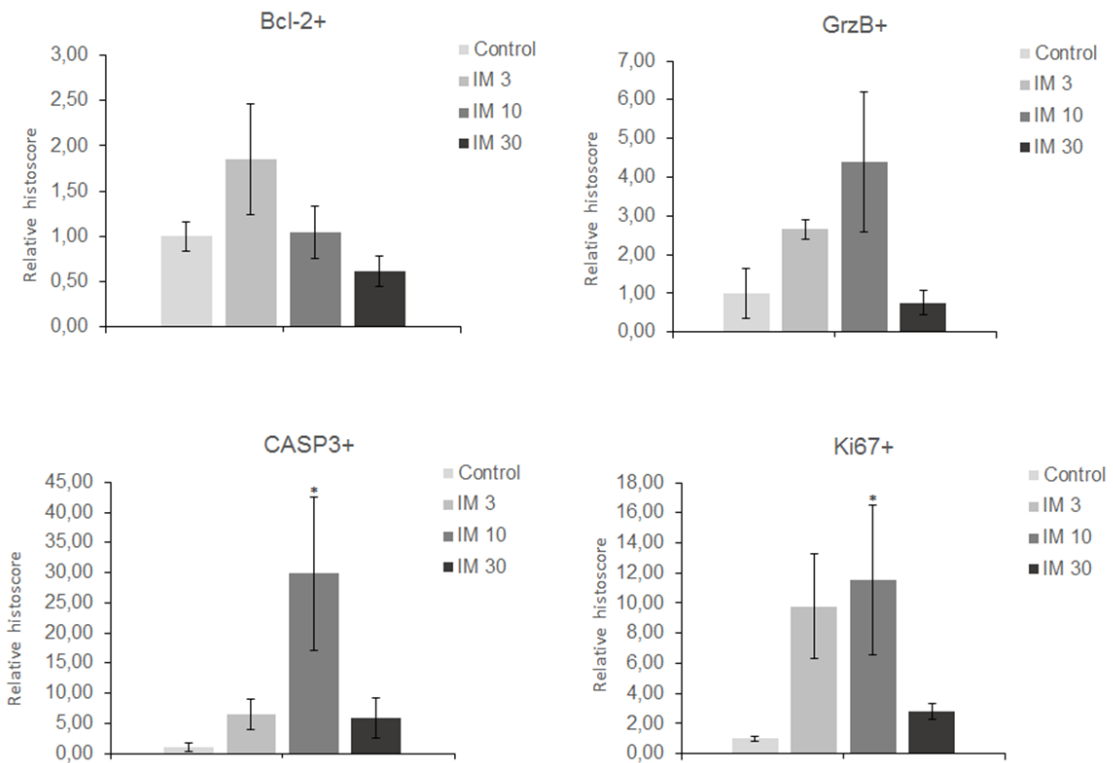
Figura 16. Imágenes histopatológicas de las biopsias realizadas en los 3 grupos de seguimiento. (a y b) Casos 6 y 8 respectivamente. Día 3. Obsérvese la importante necrosis epidérmica y dérmica formada, en determinadas zonas llega hasta dermis media. En la imagen (a) destaca una enorme ampolla subepidérmica mientras que en la imagen (b) destaca el intenso infiltrado neutrofílico. (c) Caso 9. Día 10. Reducción de la necrosis y de la intensidad del infiltrado. En las imágenes se aprecian restos de tumor. (d) Día 30. Caso7. Infiltrado residual y fibrosis. (a,b,c) Hematoxilina-eosina 4x; (d) Hematoxilina-eosina 10x.

3.3. B. Estudio inmunohistoquímico

Los resultados obtenidos de cada marcador molecular estudiado por inmunohistoquímica se procesaron estadísticamente con el test ANOVA y se comparó cada marcador respecto a su grupo control. Los marcadores que presentaban significación estadística fueron sometidos al *Tukey-HSD* post-test (*indica $p < 0.05$, **indica $p < 0.01$). Las muestras control utilizadas fueron las 5 biopsias obtenidas en la primera visita de los pacientes del grupo 2 para tener la confirmación histológica de carcinoma basocelular. Se realizó el análisis comparando las diferencias entre los 3 grupos de seguimiento (día +3, día +10 y día +30). A continuación mostramos las gráficas obtenidas para cada marcador y las imágenes de inmunohistoquímica en los distintos grupos, figuras 17 y 18.



Linfocitos T (*helpers* y citotóxicos) y linfocitos B



Marcadores de apoptosis y proliferación celular

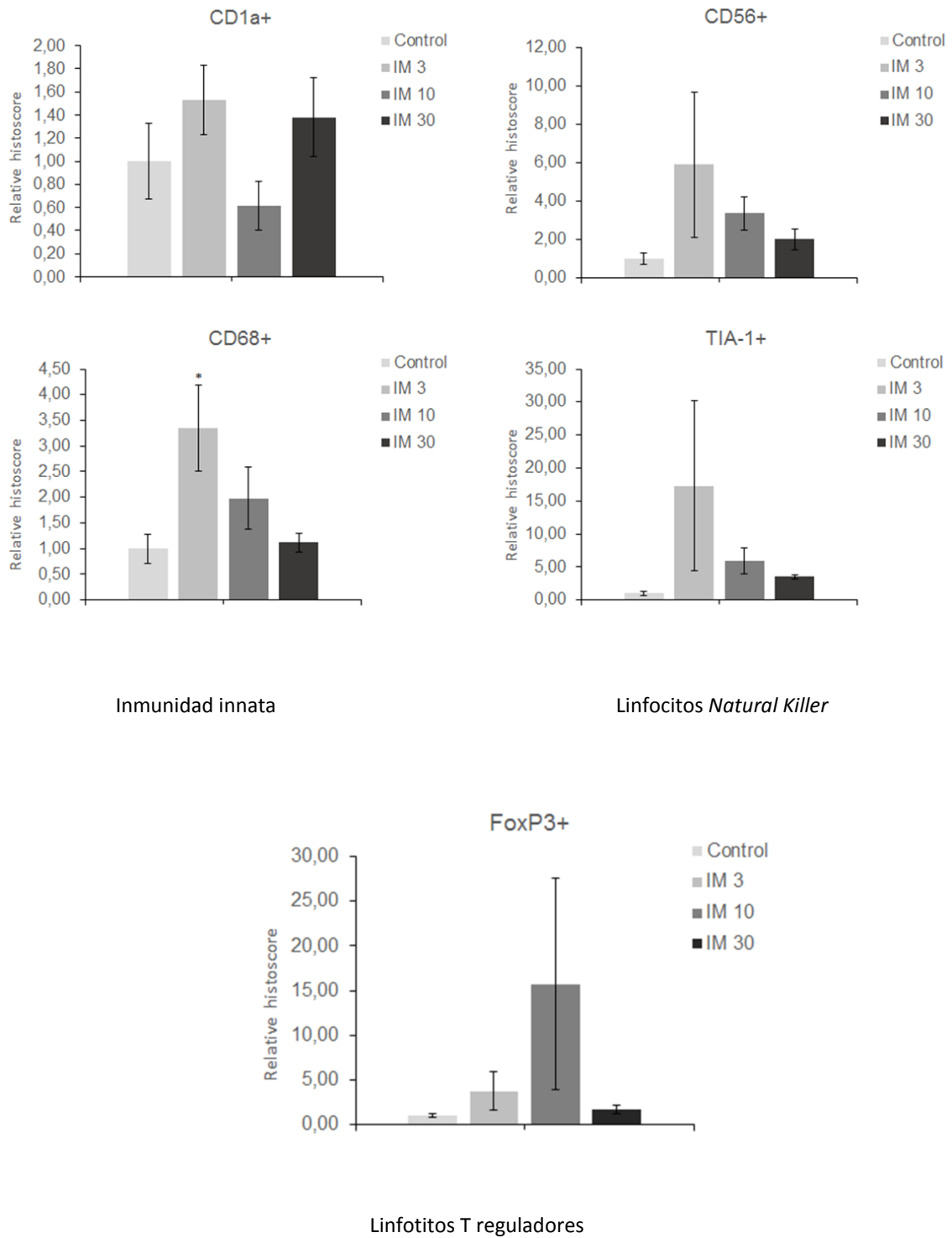


Figura 17. Diagrama de barras, representando todos los marcadores analizados en los 3 grupos de seguimiento, así como el grupo control. (IM 3= biopsias al día 3 post-tratamiento, IM 10= biopsias al día 10 post-tratamiento y IM 30= biopsias a los 30 días post-tratamiento).

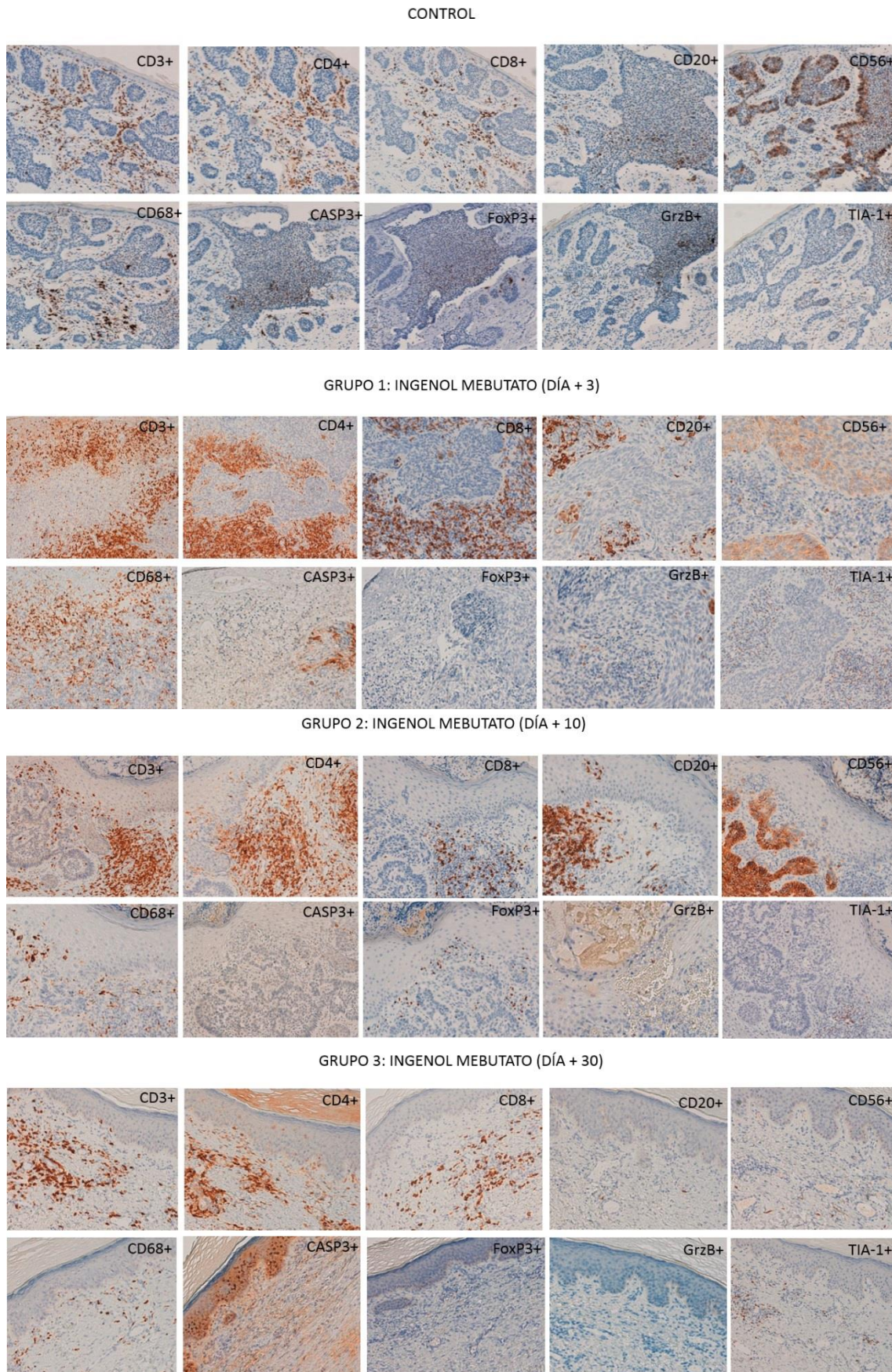
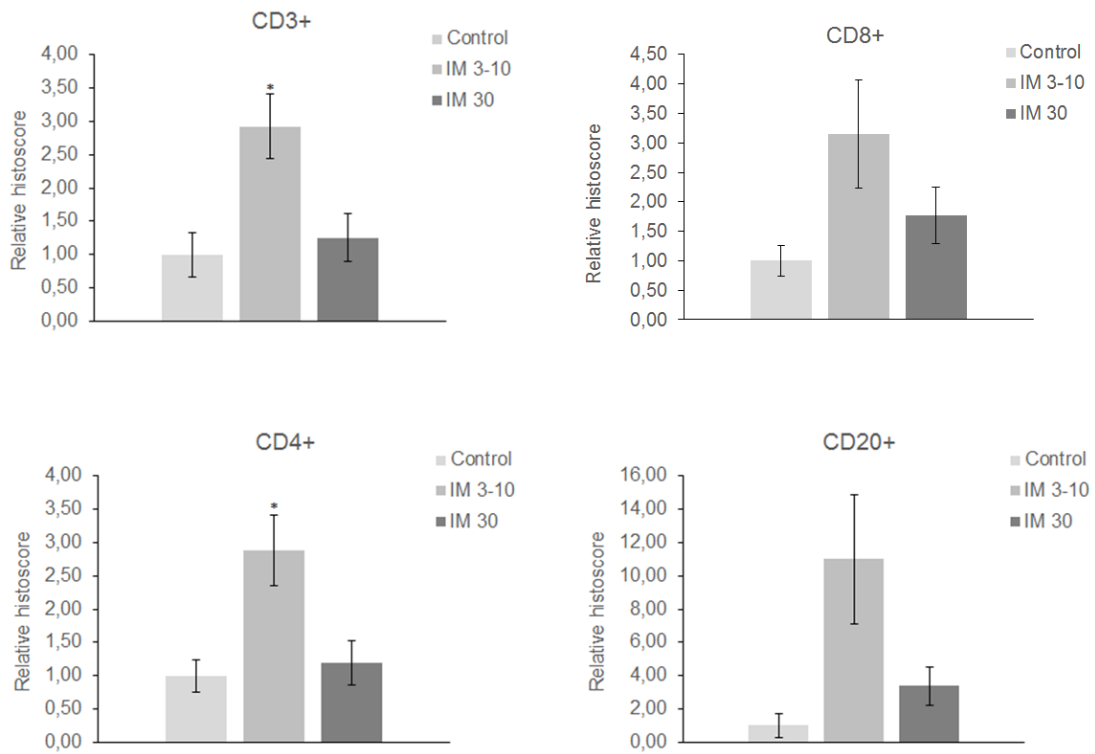
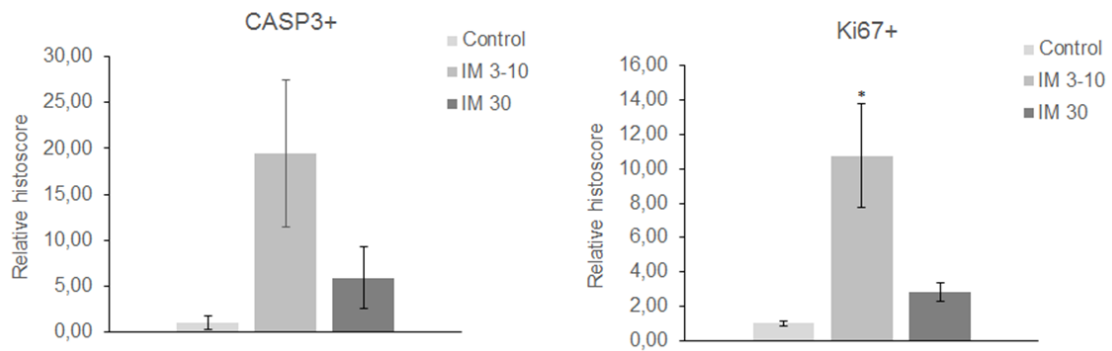
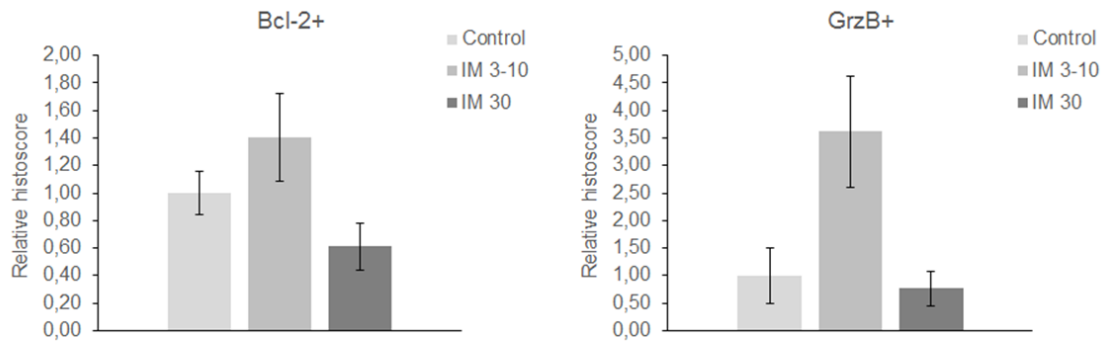


Figura 18. Imágenes de la inmunohistoquímica en las muestras controles y en los distintos grupos de seguimiento.

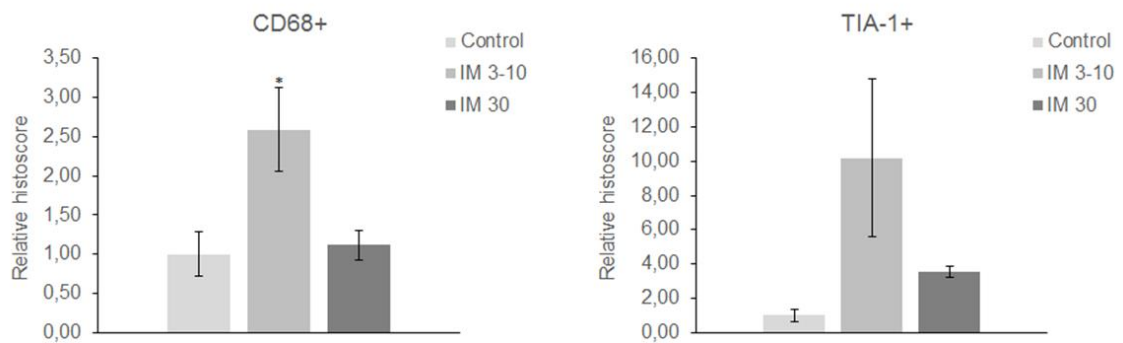
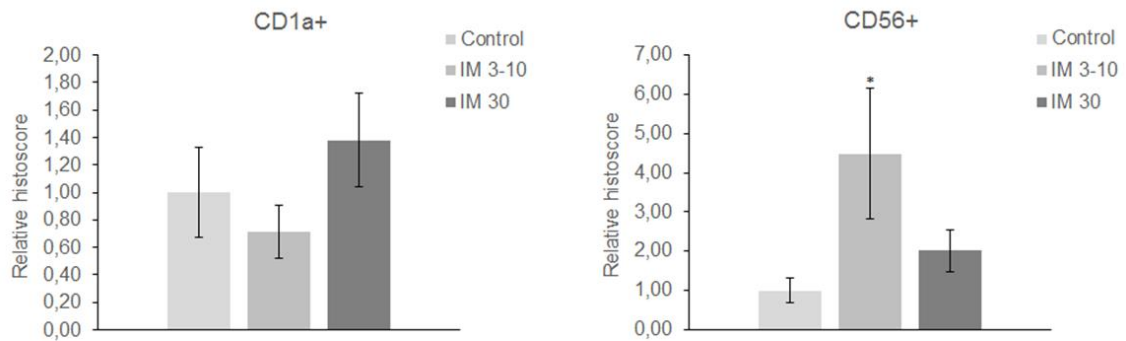
Posteriormente, con el fin de mejorar los resultados estadísticos dado el pequeño tamaño muestral que componía cada uno de los grupos, rehicimos los cálculos agrupando los grupos 1 y 2 (días +3 y +10), y consideramos este nuevo grupo como modelo de respuesta inmunoinflamatoria temprana contra el tumor, y dejamos intacto el grupo 3 (día +30), como respuesta inmunoinflamatoria tardía. A continuación pueden observarse los diagramas de barras con las diferencias obtenidas, figura 19.



Linfocitos T (*helpers* y citotóxicos) y linfocitos B



Marcadores de apoptosis y proliferación celular



Inmunidad innata

Linfocitos Natural Killer

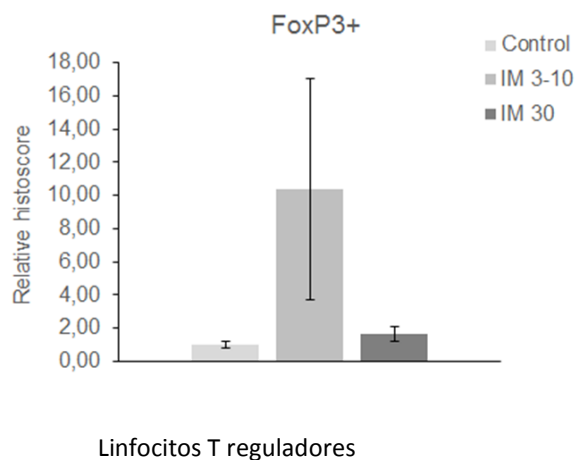


Figura 19. Diagrama de barras, representando todos los marcadores analizados en los distintos grupos así como el grupo control. (IM 3-10= biopsias al día 3 y 10 post-tratamiento y IM 30= biopsias a los 30 días post-tratamiento).

En resumen, los primeros días después de aplicar IM, respuesta inmune temprana, hay un alto reclutamiento de las células inmunes innatas. Se observa un aumento de macrófagos, células CD68+, con un valor de $p = 0.03$ en comparación con el control y también de células *natural killer*, células CD56+, aunque en mucha menor cantidad. Este reclutamiento disminuye gradualmente con el tiempo. En cuanto a la respuesta inmune adaptativa, se observa un patrón similar. También se incrementan de manera significativa los linfocitos T, células CD3+, con un valor de $p = 0.013$ comparado con el control, los linfocitos T citotóxicos y los *helpers* obtienen valores de $p=0.16$ y $p=0.016$ respectivamente comparado con los controles.

En cuanto a la respuesta inmune tardía, al día 30, los linfocitos T también disminuyen con el tiempo, pero mientras que los linfocitos T CD4+ vuelven a los niveles del control, una expresión residual de linfocitos T CD8+ permanecen a pesar de no ser estadísticamente significativa. Puede haber cierta actividad citotóxica en la zona del CBC al día 30 post-tratamiento, considerando la presencia de células TCD8+ y NK, CD56+, dentro del infiltrado. Además, se observa también la presencia de células TIA-1+, marcador de citotoxicidad. En la fase tardía de la respuesta inmune, la reducción del reclutamiento de linfocitos T coincide con un aumento de la expresión de células Treg, Foxp3+, una subpoblación celular encargada de suprimir o regular negativamente

las células T efectoras (CD4+ y CD8+). También hay reclutamiento de linfocitos B, CD20+, pero puede inducirse más tarde en la cascada de respuesta inmune en comparación con el reclutamiento de células T efectoras (datos no mostrados) y permanecer durante más tiempo.

En cuanto a los marcadores apoptóticos, observamos una alta expresión de CASP3 y GrzB en la fase temprana, mientras que Bcl-2, proteína antiapoptótica, disminuye su presencia gradualmente hasta el día 30 post-tratamiento, alcanzando niveles más bajos que en el control. Esta apoptosis podría ser inducida al detener la respuesta inmune de todas las células inflamatorias reclutadas en los momentos iniciales una vez que el tumor se ha eliminado.

4. B. Discusión

En este estudio hemos demostrado la eficacia de Ingenol mebutato gel 0.05% en el CBC bajo oclusión con discos de aluminio. El 80% de los CBC superficiales obtuvieron una remisión completa y mantuvieron esta respuesta después de 2 años de seguimiento. En un ensayo clínico de fase II con 60 pacientes, el 63% de los pacientes mostraron remisión completa³⁸, mientras que en otro ensayo clínico en fase I/II con 28 pacientes, el 82% obtuvo remisión completa después de 1 mes y el 57% continuó después de un seguimiento medio de 15 meses⁴³. Existen también algunos casos aislados^{42, 44} y series cortas de pacientes^{40, 41} con CBC tratados con diferentes posologías de IM (0.015 vs 0.05%), duración y número de ciclos con resultados de remisión completa.

La principal diferencia entre nuestro estudio y los reportados en la literatura es el uso de IM bajo oclusión; puede ser la razón por la que obtuvimos mayor tasa de respuesta completa en los CBC. La alta eficacia de IM al 0.05% ya se había demostrado en series cortas o casos excepcionales³⁸⁻⁴⁴.

Sin embargo, en nuestro estudio se incluyeron otros subtipos de CBC: 2/5 (40%) de los CBC nodulares se resolvieron, mientras que el único CBC infiltrante (0/1) no curó. Podemos concluir que IM bajo oclusión fue más eficaz en el tratamiento de CBC superficiales. Hasta donde sabemos no hay evidencia en la literatura médica de CBC

nodulares o infiltrantes tratados con IM. En general, nuestro estudio mostró que el 62.5% de los pacientes obtuvieron remisión completa después del tratamiento.

Quisiera destacar que 2 de los 5 pacientes que fueron retirados del estudio debido al cumplimiento incorrecto del tratamiento, al aplicarse las dos dosis de IM con varios días de intervalo, presentaron tumor residual confirmado por biopsia tras el tratamiento. Cuando los pacientes fueron intervenidos quirúrgicamente, al cabo de 1 mes, el análisis histológico no evidenció tumor. Esto significa que algunos casos que parecían ser respondedores incompletos, se curaron completamente tiempo después. En algunos casos parece que el sistema inmunológico necesita un tiempo más prolongado para destruir el tumor. Se plantea la hipótesis de que este hallazgo puede correlacionarse con nuestra observación de que algunas células citotóxicas permanecieron en el sitio del tumor incluso 30 días después del tratamiento, lo que significa que una cierta actividad citotóxica está presente en la respuesta inmune tardía. Se requerirán estudios más amplios para determinar la dosis máxima tolerada y la eficacia de IM gel en el carcinoma basocelular.

En cuanto a la seguridad, se observaron eventos adversos en el 62.5% de los pacientes: eritema, formación de ampollas, escozor o dolor que comenzaron desde el primer día de tratamiento. A partir del día 3, los pacientes presentaron en la histología una necrosis epidérmica extensa, que en algunos casos alcanzaba la dermis media, coincidiendo con una importante respuesta inflamatoria, figura 16. Esta necrosis causada por IM ocasiona la liberación de componentes citosólicos de las células tumorales que actuarían como antígenos y desencadenarían una respuesta inmune tanto innata como adaptativa. Esta necrosis en dermis papilar y media, observada en algunos pacientes y producida por el tratamiento oclusivo con IM podría ser responsable de las cicatrices residuales observadas en algunos casos.

En términos de respuesta innata, se observó una alta infiltración neutrofílica, con polimorfonucleares, reforzada por macrófagos ($p = 0.03$) y células NK (aunque no estadísticamente significativa). Esta inflamación local mejora la liberación de moléculas vasodilatadoras tales como histaminas y otras quimiocinas.

Respecto a la respuesta inmune adaptativa se observó un importante reclutamiento de linfocitos T, CD4+ ($p = 0.016$) y CD8 + (no estadísticamente significativo) en las fases iniciales, respuesta temprana. Curiosamente, los linfocitos T CD4+ se recuperan hasta los niveles del control mientras que los linfocitos T CD8 + permanecen en el sitio del tumor hasta el día 30 post-tratamiento, respuesta inmune tardía. El TIA-1 también está altamente expresado en los primeros días post-tratamiento, pero cierta presencia también permanece hasta el día 30. Las células NK, las células CD8+ y también la presencia de células TIA-1+ pueden significar que una cierta actividad citotóxica permanece en el lugar del tumor y puede ser la razón por la cual algunos tumores que no se curaron completamente durante los primeros días puedan llegar a curarse después de un tiempo más prolongado.

También hay una alta expresión de CASP3 y GrzB en las fases tempranas de la respuesta inmunoinflamatoria inicial, probablemente debido a la apoptosis de las células inmunes reclutadas que estaban luchando contra el tumor. Curiosamente, las células Treg también alcanzan la máxima expresión en la respuesta inmunoinflamatoria temprana, funcionando como supresoras de la respuesta inmune adaptativa por varios mecanismos. Uno de ellos es a través de la apoptosis. Esto puede explicar por qué las células, CASP3+ están más expresadas 10 días después del tratamiento coincidiendo con FoxP3 (marcador de Treg) y también puede explicar la reducción de las células T efectoras en el tiempo. Sin embargo, el mecanismo exacto de acción de las células Treg no ha sido aún plenamente estudiado⁴⁵. La proteína anti-apoptótica, Bcl-2, se reduce al día 30, por debajo de los niveles del grupo control. Estos resultados fueron similares en el ensayo aleatorizado de fase I en el que 26 pacientes con queratosis actínicas fueron tratados con IM 0.05%³⁴.

En resumen, hemos comprobado la eficacia de ingenol mebutato gel al 0.05% en cura oclusiva 2 días seguidos en una serie de 16 pacientes con CBC (10 superficiales, 5 nodulares y 1 infiltrante), obteniendo una curación del 80% (8/10) de CBC superficiales y de 40% (2/5) de los CBC nodulares, en total el porcentaje de curación fue de 62.5% (10/16) de todos los CBC analizados en nuestra serie. Con esta modalidad terapéutica, un 62.5% de los pacientes presentaron una reacción inflamatoria intensa consistente en inflamación y formación de ampollas que producían dolor y escozor moderados,

que cedieron progresivamente durante 5 semanas dejando cicatriz residual. Su mecanismo de acción consiste en una reacción inmunoinflamatoria inicial con necrosis epidérmica y de la dermis superficial y media e infiltración por PMN, macrófagos y células CD3+. La inmunidad innata/inflamación es la predominante en este tipo de reacción. La necrosis tisular podría liberar antígenos que serían responsables de la curación de algunos tumores residuales. Se precisan más estudios sobre dosificación e intervalos de aplicación de IM con el fin de mejorar los resultados y disminuir los efectos adversos del tratamiento.

5. A.B. Bibliografía

1. Tay SS, Roediger B, Tong PL, Tikoo S, Weninger W. The Skin-Resident Immune Network. *Curr Dermatol Rep* 2013; 3: 13-22.
2. Travis J. On the Origin of The Immune System. *Science* 2009; 324: 580-82.
3. Fujimura T, Kakizaki A, Kambayashi Y, Aiba S. Basal Cell Carcinoma with Spontaneous Regression : a case report and immunohistochemical study. *Case Rep Dermatol* 2012; 4: 125–32.
4. Rangwala S, Tsai KY. Roles of the immune system in skin cancer. *Br J Dermatol* 2011; 165: 953-65.
5. Corthay A. Does the immune system naturally protect against cancer? *Front Immunol* 2014; 5: 197.
6. Rolinski J, Hus I. Breaking immunotolerance of tumors: a new perspective for dendritic cell therapy. *J Immunotoxicol* 2014; 11: 311-8.
7. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13: 1–27.
8. Cantoni C, Huergo-Zapico L, Parodi M, Pedrazzi M, Mingari MC, Moretta A *et al.* NK Cells, Tumor Cell Transition, and Tumor Progression in Solid Malignancies: New Hints for NK-Based Immunotherapy? *J Immunol Res* 2016; 2016: 4684268, 13 pages.
9. Jinushi M. Yin and yang of tumor inflammation: how innate immune suppressors shape the tumor microenvironments. *Int J Cancer* 2014; 135: 1277-85
10. Clifford GM, Polesel J, Rickenbach M, Dal Maso L, Keiser O, Kofler A, *et al.* Cancer risk in the Swiss HIV Cohort Study: associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 425–32.

11. Birkeland S a, Storm HH, Lamm LU, Barlow L, Blohmé I, Forsberg B, *et al.* Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer* 1995; 60: 183–9.
12. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 298–306.
13. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960–4.
14. Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y, Naito Y, Mizuno T *et al.* Predominant infiltration of macrophages and CD8 (+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2008; 113: 1387–95.
15. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 2011; 331: 1565-70.
16. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M *et al.* Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997; 18: 89–95.
17. Principe DR, Doll JA, Bauer J, Jung B, Munshi HG, Bartholin L *et al.* TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106: djt369.
18. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002; 3: 991–8.
19. Mohan SV, Kuo KY, Chang AL. Incidental regression of an advanced basal cell carcinoma after ipilimumab exposure for metastatic melanoma. *JAAD Case Rep* 2016; 2: 13-5.
20. Bramhall RJ, Mahady K, Peach AH. Spontaneous regression of metastatic

- melanoma-clinical evidence of the abscopal effect. *Eur J Surg Oncol* 2014; 40: 34-41.
21. Gailani MR, Leffell DJ, Ziegler A, Gross EG, Brash DE, Bale AE. Relationship between sunlight exposure and a key genetic alteration in basal cell carcinoma. *J Natl Cancer Ins* 1996; 88: 349–54.
22. Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y *et al.* Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 299–305.
23. Caucanas M, Piérard-Franchimont C, Piérard GE. Chronicle of a pigmented superficial Basal cell carcinoma. *Case Rep Dermatol Med* 2012; 2012: 693041, 3 pages.
24. Otsuka A, Dreier J, Cheng PF, Nägeli M, Lehmann H, Felderer L *et al.* Hedgehog pathway inhibitors promote adaptive immune responses in basal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 1289-97.
25. Young-Zvandasara T, Popiela M, Shuttleworth G. “The nodule that disappeared” spontaneous regression of an eyelid noduloulcerative lesion mimicking the features of a basal cell carcinoma. *BMJ Case Rep* 2015. doi: 10.1136/bcr-2014-206566.
26. Kaehler KC, Gutzmer R, Egberts F, Hauschild A. Regression of a basal cell carcinoma infiltrating the brain after vismodegib therapy. *J Dtsch Dermatol Ges* 2014; 12: 906-7.
27. Habets JM, Tank B, Vuzevski VD, van Reede EC, Stolz E, van Joost T. Characterization of the mononuclear infiltrate in basal cell carcinoma: a predominantly T cell-mediated immune response with minor participation of Leu-7+ (natural killer) cells and Leu-14+ (B) cells. *J Invest Dermatol* 1988; 90: 289-92.
28. Claudatus JC Jr, d'Ovidio R, Lospalluti M, Meneghini CL. Skin tumors and reactive

- cellular infiltrate: further studies. *Acta Derm Venereol* 1986; 66: 29-34.
29. Deng JS, Falo LD Jr, Kim B, Abell E. Cytotoxic T cells in basal cell carcinomas of skin. *Am J Dermatopathol* 1998; 20: 143-6.
30. Halliday GM, Patel A, Hunt MJ, Tefany FJ, Barnetson RS. Spontaneous regression of human melanoma/nonmelanoma skin cancer: association with infiltrating CD4+ T cells. *World J Surg* 1995; 19: 352-8.
31. Vidal D, Matías-Guiu X, Alomar A. Open study of the efficacy and mechanism of action of topical imiquimod in basal cell carcinoma. *Clin Exp Dermatol*. 2004; 29: 518-25.
32. Hanna E, Abadi R, Abbas O. Imiquimod in dermatology: an overview. *Int J Dermatol* 2016; 55: 831-44.
33. Gras J. Ingenol mebutate: a new option for actinic keratosis treatment. *Drugs Today (Barc)* 2013; 49: 15-22.
34. Emmert S, Haenssle HA, Zibert JR, Schön M, Hald A, Hansen MH *et al*. Tumor-Preferential Induction of Immune Responses and Epidermal Cell Death in Actinic Keratoses by Ingenol Mebutate. *PLoS One* 2016; 11: e0160096.
35. Challacombe JM, Suhrbier A, Parsons PG, Jones B, Hampson P, Kavanagh D *et al*. Neutrophils are a key component of the antitumor efficacy of topical chemotherapy with ingenol-3-angelate. *J Immunol* 2006; 177: 8123-32.
36. Vidal D, Matías-Guiu X, Alomar A. Efficacy of imiquimod for the expression of Bcl-2, Ki67, p53 and basal cell carcinoma apoptosis. *Br J Dermatol* 2004; 151: 656-62.
37. Vidal D, Matías-Guiu X, Alomar A. Fifty-five basal cell carcinomas treated with topical imiquimod: outcome at 5-year follow-up. *Arch Dermatol* 2007; 143: 266-8.
38. Siller G, Rosen R, Freeman M, Welburn P, Katsamas J, Ogbourne SM. PEP005 (ingenol mebutate) gel for the topical treatment of superficial basal cell carcinoma:

- results of a randomized phase IIa trial. *Australas J Dermatol* 2010; 51: 99-105.
39. Bettencourt MS. Treatment of superficial basal cell carcinoma with ingenol mebutate gel, 0, 05%. *Clin Cosmet Invest Dermatol* 2016; 9: 205-9.
40. Diluvio L, Bavetta M, Di Prete M, Orlandi A, Bianchi L, Campione E. Dermoscopic monitoring of efficacy of ingenol mebutate in the treatment of pigmented and non-pigmented basal cell carcinomas. *Dermatol Ther* 2017; 30: doi: 10.1111/dth.12438.
41. Izzi S, Sorgi P, Piemonte P, Carbone A, Frascione P. Successfully treated superficial basal cell carcinomas with ingenol mebutate 0, 05% gel: Report of twenty cases. *Dermatol Ther* 2016; 29: 470-472.
42. Jung YS, Lee JH, Bae JM, Kim GM. Superficial Basal Cell Carcinoma Treated with Two Cycles of Ingenol Mebutate Gel 0,015. *Ann Dermatol* 2016; 28: 796-797.
43. Ramsay JR, Sunrbier A, Aylward JH, Ogbourne S, Cozzi SJ, Poulsen MG *et al*. The sap from *Euphorbia peplus* is effective against human nonmelanoma skin cancers. *Br J Dermatol* 2011; 164: 633-6.
44. Cantisani C, Paolino G, Cantoresi F, Faina V, Richetta AG, Calvieri S. Superficial basal cell carcinoma successfully treated with ingenol mebutate gel 0.05%. *Dermatol Ther* 2014; 27: 352-4.
45. Yolcu ES, Ash S, Kaminitz A, Sagiv Y, Askenasy N, Yarkoni S. Apoptosis as a mechanism of T-regulatory cell homeostasis and suppression. *Immunol Cell Biol* 2008; 86: 650-8.

CONCLUSIONES

1. Los carcinomas basocelulares de las zonas fotoexpuestas expresan principalmente CK5/6, aunque sin significación estadística respecto a la zona no fotoexpuesta. Los carcinomas basocelulares de áreas no fotoexpuestas, presentan mayor expresión de CK7, con diferencias estadísticamente significativas, del mismo modo que los carcinomas de las áreas no pilosas. Sugerimos que los carcinomas basocelulares de estas áreas, así como algunos CBC de la cara, podrían derivar de epitelios simples glandulares como el apocrino o el sebáceo. Los carcinomas basocelulares localizados en regiones no fotoexpuestas como la axila y el pubis, y en áreas desprovistas de pelo como el pezón o la semimucosa vulvar, con abundantes glándulas apocrinas y sebáceas, pudieran originarse de dichos epitelios. Ello no contradice la teoría ya publicada por Lever en 1948 del origen del CBC en una célula derivada del germen epitelial primario, pero resuelve la incógnita de los CBC en áreas carentes de pelo o muy ricas en glándulas apocrinas y sebáceas, ya que sería una célula madre más diferenciada el origen de estos tumores. En los casos de CBC en áreas no fotoexpuestas no sería la RUV del sol el principal factor etiopatogénico en la carcinogénesis de los carcinomas basocelulares sino que podrían ser factores hormonales como sucede en otros tumores con origen glandular.

2. El CBC aunque expresa algunos marcadores de TEM no presenta un fenotipo canónico de TEM. En relación a la TEM, hay diferencias significativas entre el comportamiento de las células de CBC *in vitro* (cultivos celulares) e *in vivo* (tejido).

3. Nuestros datos confirman que el estroma adyacente al CBC contiene fibroblastos asociados al tumor que son distintos a los fibroblastos dérmicos de la piel sana.

4. A pesar del bajo tamaño muestral, en la respuesta inmune específica frente al carcinoma basocelular, intervienen principalmente como efectores los linfocitos T *helper* y los macrófagos, a diferencia de los tumores internos y el melanoma en los que parecen predominar los linfocitos T citotóxicos y las células NK.

5. Ingenol mebutato gel es un fármaco eficaz para tratar el carcinoma basocelular, especialmente el subtipo superficial. Se produjeron eventos adversos locales de dolor, escozor, eritema, edema, formación de ampollas y erosiones en el 62.5% de los

pacientes, sin que se detectaran eventos adversos sistémicos. Ingenol mebutato actúa produciendo necrosis de la epidermis y la dermis superficial que se acompaña del reclutamiento de células inmunes innatas y adaptativas durante la fase temprana de la respuesta inmunoinflamatoria. En la fase tardía también se aprecian marcadores citotóxicos que podrían ser los responsables de la destrucción de algunos islotes tumorales residuales observados en algunos casos. Se precisarían estudios con un mayor número de pacientes para corroborar nuestras observaciones y con un modo de aplicación o dosificaciones diferentes con el fin de reducir la intensidad de la reacción inflamatoria inicial y el riesgo de cicatrices residuales.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía.

1. Bath-Hextall FJ, Perkins W, Bong J, Williams HC. Interventions for basal cell carcinoma of the skin. In: The Cochrane Library. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd; 2009:1-60. Search date 2009.
2. Wong CS, Strange RC, Lear JT: Basal cell carcinoma. *BMJ* 2003, 327:794-798.
3. Ionescu DN, Arida M, Jukic DM: Metastatic basal cell carcinoma: four case reports, review of literatura, and immunohistochemical evaluation. *Arch Pathol Lab Med* 2006, 130:45-51.
4. García de la Fuente, MR; Ortega Izquierdo, E. Tratamiento intermitente con vismodegib a propósito de un caso. En: *Archivos clínicos en carcinoma basocelular localmente avanzado o metastásico*. Ed. YOU & US, Madrid; 2017. págs. 5-11.
5. Housman TS, Feldman SR, Williford PM, Fleischer Jr AB, Goldman ND, Acostamadiedo JM *et al*. Skin cancer is among the most costly of all cancers to treat for the Medicare population. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48: 425-9.
6. Bielsa I, Soria X, Esteve M, Ferrándiz C. Population-based incidence of basal cell carcinoma in a Spanish Mediterranean area. *Br J Dermatol* 2009; 161: 1341-6.
7. Vilar-Coromina N, Miró-Queralt J, Cano-Bautista A, Vilardell-Gil L, Torres Babié P, Marcos-Gragera R. Non-melanoma skin cancer: incidence time trends analysis in Girona, Spain, 1944-2007. *Med Clin (Barc)* 2011; 137: 145-51.
8. Ortega Bravo, Marta. Prevalencia del cáncer cutáneo no melanoma en la región sanitaria de Lleida y factores de riesgo asociados. Tesis doctoral. Lleida, 2003.
9. Lomas A, Leonardi-Bee J, Bath-Hextall F. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2012; 166: 1069–80.
10. Perera E, Gnaneswaran N, Staines C, Win AK, Sinclair R. Incidence and prevalence

- of non-melanoma skin cancer in Australia: A systematic review. *Australas J Dermatol* 2015; 56: 258–267.
11. Marzuka AG, Book SE. Basal Cell Carcinoma : Pathogenesis , Epidemiology , Clinical Features , Diagnosis , Histopathology , and Management. *Yale J Biol Med* 2015; 88: 167–79.
12. Pacholczyk M, Czernicki J, Ferenc T. The effect of solar ultraviolet radiation (UVR) on induction of skin cancers. *Med Pr* 2016; 67: 255-66.
13. Zitás É, Mészáros J. Most common skin disorders caused by excessive exposure to sunlight. *Ory Hetil* 2016; 157: 94-97.
14. MT. López Giménez, M. Alejo, J. Autonell, MJ. Martínez, C. Janés. Carcinomas basocelulares múltiples posradioterapia: presentación de cinco pacientes. *Med Cutan Iber Lat Am* 2002; 30: 9-12.
15. Li C, Athar M. Ionizing Radiation Exposure and Basal Cell Carcinoma Pathogenesis. *Radiat Res* 2016; 185: 217-28.
16. Gulshan S, Rahman MJ, Sarkar R, Ghosh S, Hazra R. An interesting case of basal cell carcinoma with Raynaud's Phenomenon Following Chronic Arsenic Exposure. *JNMA J Nepal Med Assoc* 2016; 55: 100-102.
17. Zwald FO, Brown M. Skin cancer in solid organ transplant recipients: advances in therapy and management. Part I. Epidemiology of skin cancer in solid organ transplant recipients. *J Am Acad Dermatol* 2011; 65: 253-61.
18. Bordea C, Wojnarowska F, Millard PR, Doll H, Welsh K, Morris PJ. Skin cancers in renal-transplant recipients occur more frequently than previously recognized in a temperate climate. *Transplantation* 2004; 77: 574-9.
19. Irene García-Morales, Amalia Pérez-Gil, Francisco M Camacho. Úlcera de Marjolin: carcinoma sobre cicatriz por quemadura. *Actas Dermosifiliogr* 2006; 97: 529-32.

20. Sturm RA. Skin color and skin cancer-MC1R, the genetic link. *Melanoma Res* 2002; 12: 405-16.
21. Hsu MC, Liao JY, Hong JL, Cheng Y, Liao YH, Chen JS *et al.* Secondary neoplasms arising from nevus sebaceous: A retrospective study of 450 cases in Taiwan. *J Dermatol* 2016; 43: 175-80.
22. Aguayo R, Pallarés J, Casanova JM, Baradad M, Sanmartín V, Moreno S *et al.* Squamous cell carcinoma developing in Jadassohn's sebaceous nevus: case report and review of the literature. *Dermatol Surg* 2010; 36: 1763-8.
23. Alfaro-Sánchez AB, Zaldívar-Leal F, Casados-Vergara RF, Piña-Osuna AK. Nevo sebáceo de Jadassohn asociado con carcinoma basocelular. *Dermatol Rev Mex* 2014; 58: 295-299.
24. Castori M, Morrone A, Kanitakis J, Grammatico P. Genetic skin diseases predisposing to basal cell carcinoma. *Eur J Dermatol* 2012; 22:299-309.
25. Parren LJ, Frank J. Hereditary tumour syndromes featuring basal cell carcinomas. *Br J Dermatol* 2011; 165: 30-4.
26. Koch SC, Simon N, Ebert C, Carell T. Molecular mechanisms of xeroderma pigmentosum (XP) proteins. *Q Rev Biophys* 2016; 49: e5.
27. Bradford PT, Goldstein AM, Tamura D, Khan SG, Ueda T, Boyle *et al.* Cancer and neurologic degeneration in xeroderma pigmentosum: long term follow-up characterizes the role of DNA repair. *J Med Genet* 2011; 48: 168-176.
28. Norman CS, O'Gorman L, Gibson J, Pengelly RJ, Baralle D, Ratnayaka JA *et al.* Identification of a functionally significant tri-allelic genotype in the Tyrosinase gene (TYR) causing hypomorphic oculocutaneous albinism (OCA1B). *Sci Rep* 2017; 7: 4415.
29. Peralta R, Sabban EC, Friedman P, Marcucci C, Bollea Garlatti La, Galimberti G *et al.* Proposal for management and dermoscopy follow-up of nevi in patients affected

- by oculocutaneous albinism type Ia. *Dermatol Prat Concept* 2017; 7: 39-42.
30. Vabres P, Lacombe D, Rabinowitz LG, Aubert G, Anderson CE, Taieb A *et al.* The gene for Bazex-Dupré-Christol syndrome maps to chromosome Xq. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 87-91.
31. Andreani V, Richard M, Folchetti G, Varennes S, Philip N, Grob JJ. Congenital hypotrichosis and milia with spontaneous regression during adolescence or Oley syndrome: a variant of Bazex-Dupré-Christol syndrome. *Ann Dermatol Venereol* 2000; 127: 285-8.
32. Farndon PA, Del Mastro RG, Evans DG, Kilpatrick MW. Location of gene for Gorlin syndrome. *Lancet* 1992; 339: 581-2.
33. Weedon D. Tumors of the epidermis. En: *Skin Pathology*. 3^o Edition. U.K: Churchill Livingstone. Ed. Elsevier; 2010. p. 667-708.
34. Urrego-Rivera FL, Faura-Berruga C. Differential diagnosis of pigmented basal cell carcinoma. *Rev Clín Med Familia* Jun 2015; 8: 166-70.
35. Lesiak A, Sysa-Jedrzejowska A, Narbutt J. The role of sonic hedgehog pathway in skin carcinogenesis. *Pol Merkur Lekarski* 2010; 29: 141-43.
36. Emmert S, Schön MP, Haenssle HA. Molecular biology of basal and squamous cell carcinomas. *Adv Exp Med Biol* 2014; 810: 234-52.
37. Stojicic MT, Slavik EE, Acimovic GT, Jovanovic MD, Stojmirovic DM, Vujotic LD. Simultaneous surgical treatment of ulcer terebrans with intracranial propagation and acoustic neurinoma on the same side: a case report. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008; 61: e9-11.
38. L. Ríos-Buceta, A. Picoto. Cirugía de Mohs. *Actas Dermosifiliogr* 2003; 94: 503-523.
39. E.Dachów-Siwiéc. Cryosurgery in the treatment of skin cancers: Indications and Management. *Clin Dermatol* 1990, 8: 80-85.

-
40. W.F.Spiller, RF. Spiller. Treatment of basal cell epithelioma by curettage and electrodesiccation. *J Am Acad Dermatol* 1984; 11: 808-814.
41. Avril MF, Auperin A, Margulis A, Gerbaulet A, Duvillard P, Benhamou E *et al.* Basal cell carcinoma of the face: surgery or radiotherapy? Results of a randomized study. *Br J Cancer* 1997; 76: 100-106.
42. Aguayo-Leiva IR, Ríos-Buceta L, Jaén-Olasolo P. Surgical vs nonsurgical treatment of basal cell carcinoma. *Actas Dermosifiliogr* 2010; 101; 683-92.
43. Mc Gillis ST, Fein H. Topical treatment strategies for non-melanoma skin cancer and precursor lesions. *Semin Cutan Med Surg* 2004; 23: 174-83.
44. W.E. Love, J.D. Bernhard, J.S. Bordeaux. Topical imiquimod or fluorouracil therapy for basal and squamous cell carcinoma: a systematic review. *Arch Dermatol* 2009; 146: 1431-1438.
45. Gollnick H, Barona CG, Frank RG, Ruzicka T, Megahed M, Maus J *et al.* Recurrence rate of superficial basal cell carcinoma following treatment with imiquimod 5% cream: conclusion of a 5-year long-term follow-up study in europe. *Eur J Dermatol* 2008; 18: 677-682.
46. Braathen LR, Szeimies RM, Basset-Seguin N, Bissonnette R, Foley P, Pariser D *et al.* Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: An international consensus. *J Am Acad Dermatol* 2007, 56: 125-143.
47. Gilaberte Y, Serra-Guillén C, de las Heras ME, Ruiz-Rodríguez R, Fernández-Lorente M, Benvenuto-Andrade C *et al.* Photodynamic therapy in dermatology. *Actas dermosifiliogr* 2006; 97: 83-102.
48. Lever WF. Pathogenesis of benign tumors of cutaneous appendages and of basal cell epithelioma. *Arch Derm Syphilol* 1948; 57: 679-724.
49. Ackerman AB, Reddy VB, Soyer HP. Neoplasms with Follicular Differentiation. Second Edition. New York. Ed. Ardor Scribendi Publishers; 2000. pág. 1109.

50. Kasper M, Jaks V, Are A, Bergström Å, Schwäger A, Svärd J *et al.* Wounding enhances epidermal tumorigenesis by recruiting hair follicle keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 4099-104.
51. Wang GY, Wang J, Mancianti ML, Epstein EH Jr. Basal cell carcinomas arise from hair follicle stem cells in Ptch1(+/-) mice. *Cancer Cell* 2011; 19: 114-24.
52. Grachtchouk M, Pero J, Yang SH, Ermilov AN, Michael LE, Wang A *et al.* Basal cell carcinoma in mice arise from hair follicle stem cells and multiple epithelial progenitor populations. *J Clin Invest* 2011; 121: 1768-81.
53. Kenneth S. Saladin. Anatomía Fisiología. La Unidad entre forma y función. 6ª Edición. México DF. Ed. Mc Graw Hill; 2013. pág. 190.
54. Youssef KK, Van keymeulen A, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y *et al.* Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 299-305.
55. Estrach S, Legg J, Watt FM. Syntenin mediates Delta 1-induced cohesiveness of epidermal stem cells in culture. *J Cell Sci* 2007; 120: 2944-52.
56. De Zwaan SE, Haass NK. Genetics of basal cell carcinoma. *Australas J Dermatol* 2010; 51: 81-92.
57. Carol I, Low JA. The role of the hedgehog signaling pathway in the development of basal cell carcinoma and opportunities for treatment. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 3335-9.
58. Epstein EH. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 743-54.
59. Lacour JP. Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms. *Br J Dermatol* 2002; 146: 17-19.

-
60. Daya-Grosjean L, Couvé-Privat S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett* 2005; 225: 181-92.
61. Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 306-17.
62. Doglioni C, Piccinin S, Demontis S, Cangi MG, Pecciarini L, Chiarelli C *et al.* Alterations of beta-catenin pathway in non-melanoma skin tumors: loss of alpha-ABC nuclear reactivity correlates with the presence of beta-catenin gene mutation. *Am J Pathol* 2003; 163: 2277-87.
63. Li X, Deng W, Nail CD, Bailey SK, Kraus MH, Ruppert JM *et al.* Snail induction is an early response to Gli1 that determines the efficiency of epithelial transformation. *Oncogene* 2006; 25: 609-21.
64. Saldanha G, Ghura V, Potter L, Fletcher A. Nuclear beta-catenin in basal cell carcinoma correlates with increased proliferation. *Br J Dermatol* 2004; 151: 157-64.
65. Li X, Deng W, Lobo-Ruppert SM, Ruppert JM. Gli1 acts through Snail and E-cadherin to promote nuclear signaling by beta-catenin. *Oncogene* 2007; 26: 4489-98.
66. Campbell JS, Wenderoth MP, Hauschka SD, Krebs EG. Differential activation of mitogen-activated protein kinase in response to basic fibroblast growth factor in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 870-4.
67. Schnidar H, Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Kasper M, Hauser-Kronberger C *et al.* Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with hedgehog/GLI in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK/JUN pathway. *Cancer Res* 2009; 69: 1284-92.
68. Xie J, Aszterbaum M, Zhang X, Bonifas JM, Zachary C, Epstein E *et al.* A role of PDGFRalpha in basal cell carcinoma proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 9255-9.

ANEXO

Artículos como primera autora publicados sobre dermatología oncológica

Artículo 1. Reyes García-De La Fuente M, Sanmartín-Novell V, Casanova-Seuma JM. Cutaneous metastasis from a pancreatic adenocarcinoma as a form of presentation of tumoral recurrence. *Gastroenterología y Hepatología* 2014; 5: 299-301.

Artículo 2. García de la Fuente MR, Vilardell-Villellas F, Martí-Laborda RM, Casanova-Seuma JM. Primary cutaneous small-to-medium-sized CD4+ T-cell lymphoma with a granulomatous component. *Actas Dermo-Sifiliográficas* 2016; 1: 86-88.

Artículos como primera autora publicados resultado del trabajo de tesis doctoral

Artículo 3. Capítulo 1 de la tesis doctoral. García-de-la-Fuente MR, Santacana M, Vilardell F, Pujol RM, Garí E, Casanova JM. Vulvar Basal Cell Carcinoma: Four Case Reports With Immunohistochemical Study. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*. 2017; 5: 457-459.

Artículo 4. Capítulo 1 de la tesis doctoral. M^a Reyes García de la Fuente, Maria Santacana, Joan Valls, Felip Vilardell, Josep Manel Fernández Armenteros, Ramon Pujol, Eloi Garí, JM Casanova. Cytokeratin Profile of Basal Cell Carcinomas According to the Degree of Sun Exposure and to the Anatomical Localization. *American Journal of Dermatopathology* 2017. (Epub ahead of print)

Artículo como primera autora resultado del trabajo de tesis doctoral enviado para su aceptación a revista especializada.

Artículo 5. Capítulo 3B de la tesis doctoral. MR García-de-la-Fuente, M Santacana, J Verdaguer, F Vilardell, E Garí, JM Casanova. Efficacy and mechanism of action of topical ingenol mebutate 0.05% gel in basal cell carcinoma.

Capítulo de libro como primera autora publicado en relación con la temática de la tesis doctoral.

Capítulo de libro. García de la Fuente, MR; Ortega Izquierdo, E. Tratamiento intermitente con vismodegib a propósito de un caso. En: *Archivos clínicos en carcinoma basocelular localmente avanzado o metastásico*. Ed. YOU & US, Madrid; 2017. págs. 5-11.

Metástasis cutáneas de adenocarcinoma pancreático como forma de presentación de recidiva tumoral



Cutaneous metastasis from a pancreatic adenocarcinoma as a form of presentation of tumoral recurrence

Presentamos un caso de metástasis cutáneas (MC) por carcinoma de páncreas que se presentó en forma de nódulos cutáneos difusos.

Se trataba de un varón de 42 años, diagnosticado en abril de 2011 de adenocarcinoma ductal de cabeza de páncreas. Había recibido tratamiento erradicador mediante cirugía y quimiorradioterapia adyuvante. En junio de 2012 consultó en el servicio de dermatología por presentar 6 nódulos cutáneos, del color de la piel, consistencia dura, de 1-2 cm de tamaño. Las lesiones habían aparecido progresivamente desde hacía 3 semanas localizándose en cuero cabelludo, tórax anterior, hombro derecho, axila y abdomen (fig. 1). Se realizó un *punch*-biopsia que mostró un infiltrado nodular en dermis profunda e hipodermis constituido por una proliferación de células atípicas en disposición glandular, formando ductos, inmersa en un estroma desmoplásico (fig. 2). El estudio inmunohistoquímico mostró positividad para citoqueratina 7 (fig. 2), siendo negativo para citoqueratina 20, cromogranina y sinaptofisina, por lo que fue diagnosticado de metástasis cutáneas de adenocarcinoma pancreático. En una TC de control realizada 2 semanas después se detectaron metástasis pulmonares múltiples, falleciendo el paciente 2 meses más tarde.

Se calcula que la incidencia del carcinoma pancreático en España es de alrededor 7/100.000 habitantes¹ situándose en el decimotercer lugar entre los tumores por incidencia. Ahora bien, se trata de un tumor agresivo, pues representa la cuarta causa de muerte por cáncer, siendo responsable del 6% de todas las muertes por este motivo. Las manifestaciones cutáneas son frecuentes y consisten en ictericia obstructiva y prurito. Más raramente se ha asociado a paniculitis pancreática y tromboflebitis migratoria superficial.

Las MC representan del 0,6-10,4% del total de metástasis, según las series revisadas². Los tumores que con mayor frecuencia metastatizan en la piel se corresponden con los de mayor prevalencia entre la población. En el hombre la primera causa sería el cáncer de pulmón y en la mujer el de mama. Existen 2 excepciones: el melanoma, un tumor relativamente raro, que metastatiza en la piel con una frecuencia desproporcionalmente alta debido a su epidermotropismo; y el cáncer de próstata, un tumor muy frecuente que excepcionalmente lo hace.



Figura 1 Nódulos subcutáneos eritematosos de consistencia pétrea y adheridos a planos profundos, correspondientes a metástasis cutáneas en cuero cabelludo y región axilar.

Las MC por carcinoma de páncreas son raras. La localización más frecuente es el ombligo, lo que se conoce como nódulo de la hermana María José. Yendluri et al.³, en una revisión de la literatura de los últimos 90 años, identificaron 57 casos de nódulo de la hermana María José procedentes de neoplasia pancreática. En este estudio la mayoría de los tumores originales (91%) se localizaban en el cuerpo y la cola del páncreas, a pesar de que entre el 70-80% de los adenocarcinomas de páncreas tengan su origen en la cabeza o el cuello⁴. Esta localización preferente se explicaría por la existencia del uraco, que facilitaría el tránsito de las células malignas. Siguiendo el mismo camino, pueden alcanzar la región periumbilical otras neoplasias intraabdominales. La aparición de MC en localizaciones distintas al área umbilical, como el paciente que describimos, es aún menos habitual. Hafez⁵ publicó un caso de MC de origen pancreático en forma de placa indurada en el cuello. En su revisión de la literatura, encontró 17 casos con MC extraumbilical (15 varones y 2 mujeres), siendo el cuero cabelludo y el cuello las localizaciones predominantes. Las MC pueden constituir el primer signo de cáncer de páncreas⁶. En 11 de los 22 casos registrados por Miyahara et al.⁷ las lesiones cutáneas fueron la primera manifestación de la neoplasia. También se ha descrito MC en la herida quirúrgica, por siembra tumoral durante la resección. En otros casos pueden constituir el primer signo de recidiva, como en nuestro paciente, con las consecuencias pronósticas y terapéuticas que conlleva. Las MC múltiples por carcinoma de páncreas constituyen un signo de mal pronóstico, que indica diseminación de la enfermedad. La supervivencia media oscila entre los 5,8-3,3 meses en función de las series revisadas^{7,8}.

En el proceso metastásico las células tumorales adoptan un fenotipo agresivo seleccionado por unas condiciones microambientales de estrés celular (falta de oxígeno y nutrientes, pH ácido y radicales libres). Las células adoptan la capacidad de sobrevivir y reproducirse mejor en estas condiciones. La inestabilidad genómica generada favorece la aparición de nuevas mutaciones que les confieren una ventaja reproductiva y colonizadora⁹. En el proceso invasivo y metastásico, uno de los primeros cambios que se producen es la transición epitelio-mesénquima, por la que las células cancerosas pierden su capacidad de formar tejidos adhesivos, con la pérdida de caderina E, y adquieren fenotipo mesenquimal reordenando su citoesqueleto de actina y expresando integrinas capaces de interactuar con la matriz extracelular, lo que facilita su migración. También sintetizan metaloproteinasas que permiten penetrar las paredes de los vasos y alcanzar tejidos distantes¹⁰.

Describimos un caso de MC por adenocarcinoma de páncreas. Su peculiaridad es que las MC fue el signo de recidiva de la neoplasia. Resaltamos la importancia del examen cutáneo en el seguimiento de pacientes con neoplasias malignas. La facilidad de la detección visual y el acceso rápido al estudio histológico permitirán un diagnóstico precoz.

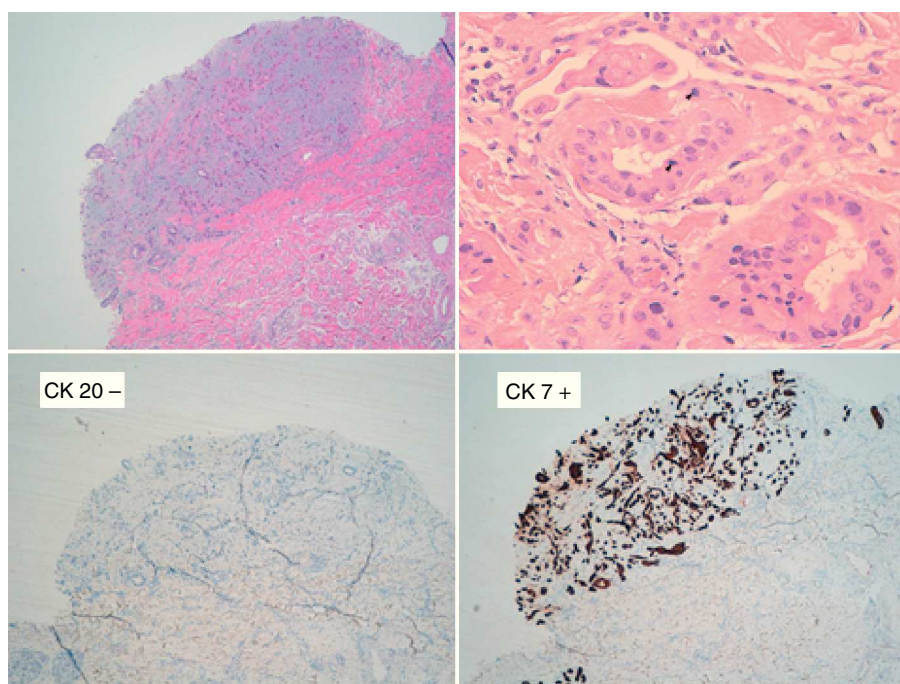


Figura 2 En la imagen superior izquierda podemos observar un infiltrado nodular en dermis profunda junto a un importante estroma desmoplásico. En la imagen superior derecha se aprecian células atípicas que se disponen formando ductos. En las imágenes inferiores se muestra el resultado obtenido en la tinción inmunohistoquímica.

Bibliografia

- Hidalgo Pascual M, Ferrero Herrero E, Castillo Fé MJ, Guadarrama González FJ, Peláez Torres P, Botella Ballesteros F. Cáncer de páncreas. Epidemiología y diagnóstico. Rev Esp Enferm Dig. 2004;96:714-22.
- Lookingbill DP, Spangler N, Sexton FM. Skin involvement as the presenting sign of internal carcinoma. A retrospective study of 7316 cancer patients. J Am Acad Dermatol. 1990;22:19-26.
- Yendluri V, Centeno B, Springett GM. Pancreatic cancer presenting as a Sister Mary Joseph' nodule: Case report and update of the literature. Pancreas. 2007;34:161-4.
- Gómez-Diez S, García-García B, Fernández-García MS, Pérez-Oliva N. Skin metastases as the initial presentation of pancreatic carcinoma. Actas Dermosifiliogr. 2010;101:93-5.
- Hafez H. Cutaneous pancreatic metastasis: A case report and review of literature. Indian J Cancer. 2007;44:111-4.
- Jun DW, Lee OY, Park CK, Choi HS, Yoon BC, Lee MH, et al. Cutaneous metastases of pancreatic carcinoma as a first clinical manifestation. Korean J Intern Med. 2005;20:260-3.
- Miyahara M, Hamanaka Y, Kawabata A, Sato Y, Tanaka A, Yamamoto A, et al. Cutaneous metastases from pancreatic cancer. Int J Pancreatol. 1996;20:127-30.
- Shoenlaub P, Sarraux A, Grosshans E, Heid E, Cribier B. Survival after cutaneous metastasis: A study of 200 cases. Ann Dermatol Venereol. 2001;128:1310-5.
- Chiang AC, Massagué J. Molecular basis of metastasis. N Engl J Med. 2008;359:2814-23.
- Palena C, Hamilton DH, Fernando RI. Influence of IL-8 on the Epithelial-Mesenchymal Transition and the Tumor Microenvironment. Future Oncol. 2012;8:713-22.

M. Reyes García-De La Fuente*, Verònica Sanmartín-Novell y Josep Manel Casanova-Seuma

Servicio de Dermatología, Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida, España

*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mrgarcia dlf@hotmail.com (M. Reyes García-De La Fuente).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gastrohep.2013.09.005>



Institut de Recerca Biomèdica de Lleida
Fundació Dr. Pifarré

Francisco Javier Matias-Guiu Guia,

director científic de l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, Fundació Dr. Pifarré,

Certifico

Que **Maria Reyes García de la Fuente** ha obtingut el **PREMI AL MILLOR ARTICLE PUBLICAT L'ANY 2014** adreçat al personal en Formació Sanitària Especialitzada de la Gerència Territorial de Lleida convocat per la Comissió de Docència de l'Institut de Recerca Biomèdica de Lleida en col·laboració amb la Comissió de Docència de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida I, perquè consti, signo aquest certificat.

Lleida, 17 d'abril de 2015

Primary cutaneous small-to-medium-sized CD4+ T-cell lymphoma with a granulomatous component[☆]



Linfoma cutáneo primario T CD4+ de célula pequeña/mediana, granulomatoso

To the Editor:

We describe a patient with primary cutaneous small-to-medium-sized CD4+ T-cell lymphoma, according to the most recent World Health Organization (WHO) classification of cutaneous lymphomas.¹

This lymphoma, previously known as primary cutaneous small-to-medium-sized pleomorphic CD4+ T-cell lymphoma,¹ has a low incidence and good prognosis. The interest in the case presented in this report derives from a substantial granulomatous component in the

clinical-pathological study and the self-healing nature of the lesion. We discuss the possibility of a relationship between these 2 characteristics.

The patient was a 32-year-old woman with no clinical history of relevance who attended the clinic in December, 2012, due to a cutaneous lesion on the right breast related to an insect bite 3 months earlier. The lesion consisted of an itchy erythematous nodule measuring 2 cm in diameter with a smooth surface (Fig. 1). Biopsy showed a dense and diffuse infiltrate that occupied the entire thickness of the dermis, composed of small and medium sized cells alongside some eosinophils (Fig. 1). Epidermotropism was scarce. Abundant histiocytes and multinucleated giant cells were also observed, forming granulomatous aggregates (Fig. 2), interspersed with lymphoid proliferation. Immunohistochemistry showed CD3+ and CD4+ cells that were however negative for CD8 and CD30 (Fig. 3). Molecular study of the λ chain of the T-cell receptor showed monoclonal rearrangement, and so the patient was diagnosed with primary cutaneous granulomatous small-to-medium sized CD4+ T-cell lymphoma. An

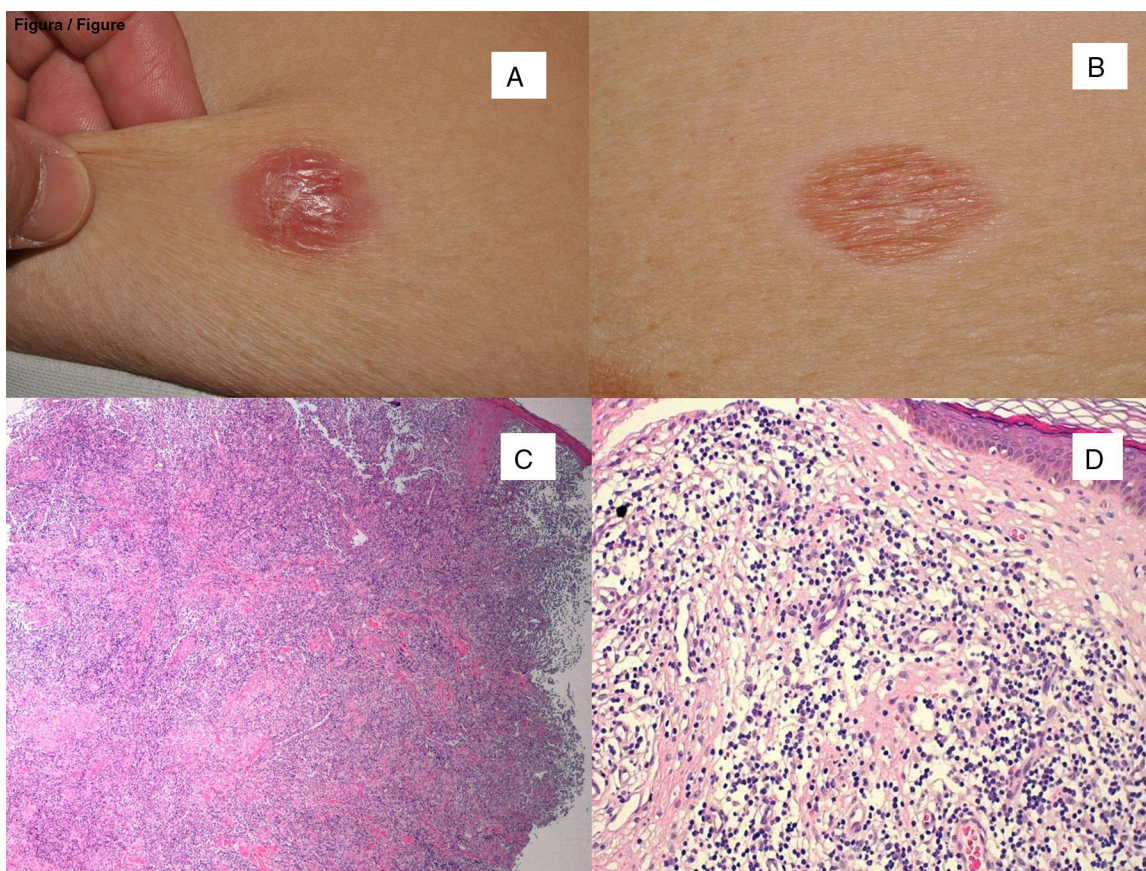


Figure 1 Clinical images of the lesion. A, At the first visit. B, 2 months later, with self-resolution. Histological appearance of the biopsies corresponding to the clinical images immediately above, with partial reduction of the tumor infiltrate in the second of them. C, Hematoxylin-eosin (H-E), x40. D, H-E, x400.

[☆] Please cite this article as: García de la Fuente MR, Vilardell-Villellas F, Martí-Laborda RM, Casanova-Seuma JM. Linfoma cutáneo primario T CD4+ de célula pequeña/mediana, granulomatoso. *Actas Dermosifiliogr.* 2016;107:89–91.

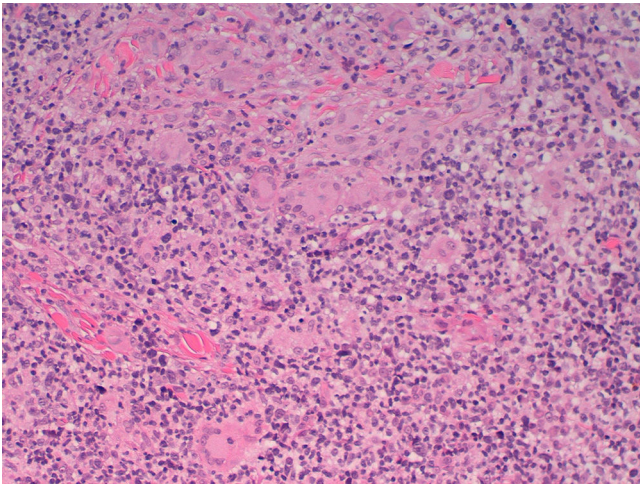


Figure 2 Histological appearance. Of note is the presence of numerous multinucleated giant cells (H-E, x200).

extension study was conducted, including study with lymphoid subpopulations, LDH, β 2-microglobulin, and positron emission tomography-computed tomography, with normal results. Surgical resection was proposed. On the day of surgery, 2 months later, the nodule had disappeared to leave a residual erythematous macule (Fig. 1). Excision biopsy of the lesion showed a considerable reduction in lymphoid infiltrate, but this remained positive for CD20, CD3, and

CD68, with predominance of CD4 over CD8; the infiltrate was negative for CD30. The same monoclonal pattern persisted.

The patient is still in follow-up in our department and is disease free after 2 years.

Primary cutaneous small-to-medium-sized CD4+ T-cell lymphoma is a rare T-cell lymphoid proliferation that usually presents as a single lesion on the head or trunk and whose histology findings coincide with the case described.^{2,3} Prognosis is good, with 5-year survival of 80%, with good response to chemotherapy or surgery. In aggressive cases, with multiple lesions, polychemotherapy such as CHOP is used.

The association of cutaneous lymphoma and granuloma is rare although well known. The presence of lymphoma and granuloma in biopsy can lead to erroneous diagnosis and enable the disease to progress undetected for months.⁴

In the literature review, this phenomenon occurs most frequently in mycosis fungoides and its clinical variant granulomatous slack skin,⁵ but there have also been isolated reports in Sézary syndrome,^{6,7} anaplastic CD30+ lymphoma,⁸ panniculitis-type T lymphoma,⁸ follicle center lymphoma,⁸ and in 4 cases of primary cutaneous small-to-medium-sized CD4+ T-cell lymphoma.⁸ A lymphoma is considered granulomatous when the granulomas occupy at least 25% of the infiltrate.⁹ This finding occurs in 1.8% of all cutaneous lymphomas.

It is not known whether the granuloma occurs as an immune response of the host to tumor cells or is a result of cytokine release, contributing to better prognosis.

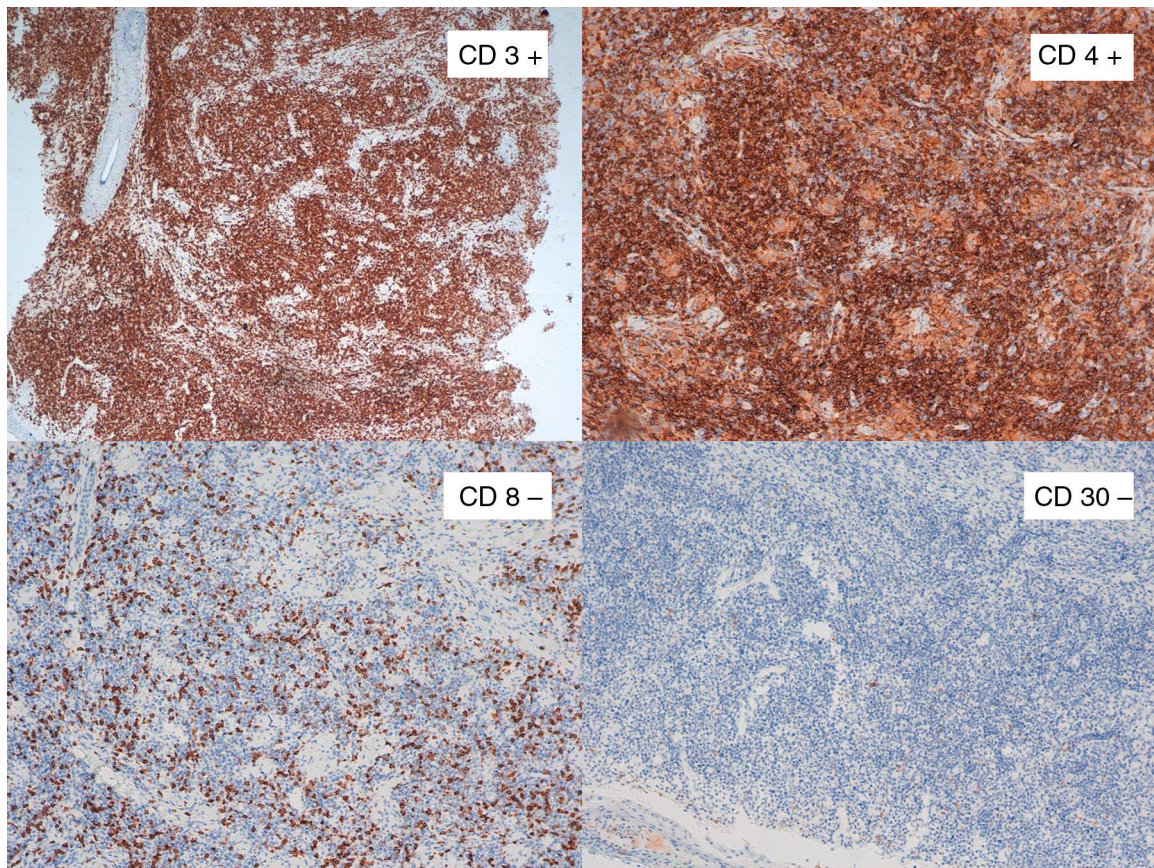


Figure 3 In the immunohistochemical study, of note was positivity for CD3 and CD4 in the upper images and negativity for CD8 and CD30 in the lower ones. The limited staining for CD8 corresponds to accompanying cellularity and not tumoral cellularity.

Beltraminelli et al.² went as far as to suggest that small granulomas could be secondary to destruction of skin appendages.

The extent to which this immune reaction could influence the prognosis of lymphoma has also not been established. Granulomatous cutaneous lymphomas normally have a slowly progressive course, although around 50% develop nodal lymphomas with a fatal outcome.

The incongruence between histological findings (pleomorphism, appendage destruction, T-cell monoclonality) and the favorable clinical outcome with a high percentage of remissions seems paradoxical. Histology and immunohistochemistry are, for the time being, not helpful in this case. The monoclonality found in the infiltrate is suggestive of a malign lymphoproliferative process but this finding is not exclusive as reactive inflammatory processes and other processes of unknown significance can also be monoclonal.² The pattern of PD-1 immunoreactivity, which we could not determine in our case, may have helped in the diagnosis of primary cutaneous small-to-medium-sized CD4+ T-cell lymphoma.¹⁰

Patients with solitary lesions usually have an indolent course. Aggressive treatments should be avoided and these patients should be managed differently to those with multiple cutaneous lesions, in whom prognosis may not be favorable.

In summary, we describe a case of granulomatous primary cutaneous small-to-medium-sized CD4+ T-cell lymphoma with partial self-resolution. The lymphoma has remained in complete remission after surgical excision. Although the presence of granulomas in the histology may hinder diagnosis of the primary tumor,⁹ and enable its progression, in other cases it may be a true host-versus-tumor reaction and favor self-resolution.

References

1. Cerroni L, Wiesner T. Cutaneous lymphomas: From morphology to chip technology. *Actas Dermosifiliogr.* 2009;100 Supl. 1: 3–17.
2. Beltraminelli H, Leinweber B, Kerl H, Cerroni L. Primary cutaneous CD 4+ small/medium sized pleomorphic T-cell lymphoma: A cutaneous nodular proliferation of pleomorphic T lymphocytes of undetermined significance? A study of 136 cases. *Am J Dermatopathol.* 2009;31:317–22.
3. Messegueur F, Gimeno E, Agusti-Mejias A, San Juan J. Primary cutaneous CD4+ small to medium sized pleomorphic T-cell lymphoma: Report of a case with spontaneous resolution. *Actas Dermosifiliogr.* 2011;102:636–8.
4. Brady B, Kamel D, Kiely J, Hennessy B. Dual diagnosis of sarcoidosis and lymphoma. *Ir J Med Sci.* 2013;182:283–6.
5. Shah A, Safaya A. Granulomatous slack skin disease: A review, in comparison with mycosis fungoides. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012;26:1472–8.
6. Dabiri S, Morales A, Ma L, Sundram U, Kim YH, Arber DA, et al. The frequency of dual TCR-PCR clonality in granulomatous disorders. *J Cutan Pathol.* 2011;38:704–9.
7. Carrozza PM, Kempf W, Kazakov DV, Dummer R, Burg G. A case of Sézary's syndrome associated with granulomatous lesions, myelodysplastic syndrome and transformation into CD30-positive large-cell pleomorphic lymphoma. *Br J Dermatol.* 2002;147:582–6.
8. Gallardo F, García-Muret MP, Servitje O, Estrach T, Bielsa I, Salar A, et al. Cutaneous lymphomas showing prominent granulomatous component: Clinico-pathological features in a series of 16 cases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009;23:639–47.
9. Scarabello A, Leinweber B, Ardigó M, Rütten A, Feller AC, Kerl H, et al. Cutaneous lymphomas with prominent granulomatous reaction: A potential pitfall in the histopathologic diagnosis of cutaneous T- and B-cell lymphomas. *Am J Surg Pathol.* 2002;26:1259–68.
10. Cetinözman F, Jansen PM, Willemze R. Expression of programmed death-1 in primary cutaneous CD4-positive small/medium-sized pleomorphic T-cell lymphoma, cutaneous pseudo-T-cell lymphoma, and other types of cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol.* 2012;36:109–16.

M.R. García de la Fuente,^{a,*} F. Vilardell-Villellas,^b
R.M. Martí-Labordá,^a J.M. Casanova-Seuma^a

^a Servicio de Dermatología, Hospital Universitario Arnau de Vilanova, Lérida, Spain

^b Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Arnau de Vilanova, Lérida, Spain

* Corresponding author.

E-mail address: mrgarcia_dlf@hotmail.com
(M.R. García de la Fuente).

Vulvar Basal Cell Carcinoma: Four Case Reports With Immunohistochemical Study

Journal of Cutaneous Medicine and Surgery

1-3

© The Author(s) 2017

Reprints and permissions:

sagepub.com/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/1203475417712498

jcms.sagepub.com



M^a Reyes García-de-la-Fuente^{1,2}, Maria Santacana^{2,3},
Felip Vilardell³, R. M. Pujol⁴, Eloi Gari^{2,5}, and J. M. Casanova^{1,2,6}

Abstract

Basal cell carcinomas (BCC) are the most frequent tumours in humans and normally appear in photoexposed areas of the skin. It is widely accepted that BCCs originate at follicular stem cells and consequently are very rare in nonhairy areas. Here, we report 4 cases of vulvar BCC, 3 of which were located in a vulvar semimucous area, a nonphotoexposed area, and a nonhairy area. We have determined the CK7 and CK19 profile of all cases; both are markers of simple epithelium with glandular differentiation. Interestingly, all cases were positively stained for CK7 and CK19. Considering that the vulvar region is rich in sebaceous and apocrine units, we hypothesise a glandular origin of BCCs situated in the vulvar region.

Keywords

apocrine glands, basal cell carcinoma, cytokeratins, hair follicle

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common tumour among the white population. It is considered to arise from the follicular stem cells and the bulge area and often grows on sun-exposed areas. Development of BCC in nonhairy regions is quite infrequent. As far as we know, less than 300 cases of vulvar BCC have been described, representing 0.01% to 1.75% of all BCCs and 2.7% of vulvar carcinomas.¹ Vulvar BCCs exhibit a more aggressive clinical behaviour compared with BCCs arising in sun-exposed areas. Higher frequency of clinical recurrences and regional or distant metastasis (10 out of 300 cases described) have been reported for vulvar BCCs.²⁻⁴

We describe 4 cases of vulvar BCCs, 3 of which were located in the inner side of the labia majora and 1 on the hairy zone of the vulva. In all these cases, we describe also the expression pattern of different cytokeratins and proliferation markers by immunohistochemistry. Based on our data, we discuss the characteristics of these infrequent forms of BCCs.

Case 1

A 62-year-old woman consulted for a vulvar lesion, which was an indurated, smooth, ulcerated, shiny plaque, 13 × 9 mm in diameter, located on the vulvar hairy area (Figure 1). After excision, histological examination showed a superficial BCC.

Case 2

A 66-year-old woman was referred to our department for evaluation of a solitary vulvar plaque lesion that the patient had noticed 2 months before. The patient indicated that this

lesion had bled on several occasions during the past month. Physical examination disclosed an indurated and eroded plaque 1.5 cm in diameter, located on the posterior third of the labia majora, near the fourchette, containing pigmented areas on the margin. The lesion was surgically excised, and histopathological examination revealed a superficial BCC. After 3 years of follow-up, a small ulcerative 0.8-cm plaque was detected in the area corresponding to the surgical scar of the previous lesion. A 4-mm punch biopsy was obtained, again disclosing the presence of a recurrence of the BCC, and a wide surgical excision was performed.

Case 3

An 86-year-old woman, with a medical history of several BCCs on the facial area, was checked for 2 vulvar lesions on

¹Department of Dermatology, University Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

²Biomedical Research Institute of Lleida (IRBLLEIDA), Lleida, Spain

³Department of Pathology, University Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain

⁴Department of Dermatology, Hospital del Mar. Parc de Salut Mar, Barcelona

⁵Department of Basic Medical Sciences, University of Lleida, Lleida, Spain

⁶Department of Medicine, University of Lleida, Lleida, Spain

Corresponding Author:

M^a Reyes García de la Fuente, Department of Dermatology, University Hospital Arnau de Vilanova. Avenida Alcalde Rovira Roure, 80, 25198 Lleida.

Email: mrgarcia_dlf@hotmail.com

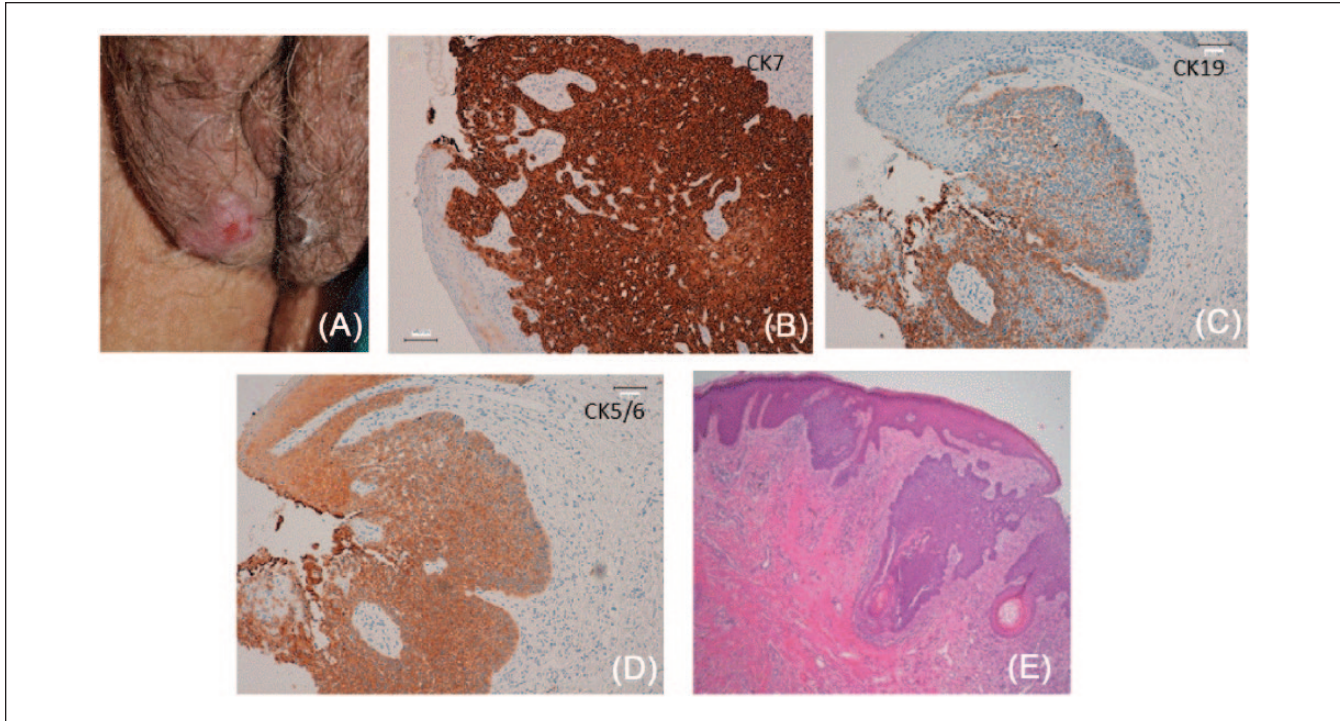


Figure 1. Clinico-pathological features of case 1. (A) The basal cell carcinoma was an indurated plaque, located on the vulvar hairy area. (B) Immunohistochemical stain for cytokeratin 7 was positive in the entire tumour ($\times 100$). (C) Immunohistochemical stain for cytokeratin 19 was focally positive in tumour cells ($\times 100$). (D) Immunohistochemical stain for cytokeratin 5/6 was positive in the entire tumour ($\times 100$). (E) Histopathology of the excised basal cell carcinoma (hematoxylin and eosin, $\times 40$).

each side of the vulva that the patient noticed 3 months before consultation. Two flesh-colored papules, 0.5 and 0.7 cm in diameter, were present in the vulvar semimucosa (Figure 2). A punch biopsy specimen was obtained that confirmed the diagnosis of nodular BCC.

An immunohistochemical study of the 3 cases was performed. Several biomarkers, including anticytokeratins CK5/6 (clone D5/16 B4), which are expressed in the basal keratinocytes of stratified epithelia⁵; anti-CK7 (clone OV-TL 12/30) and anti-CK19 (clone RCK108), expressed in simple epithelia with glandular differentiation cells⁶; anti- β -catenin (clone β -catenin-1); and anti-p63 (DAKO-p63) were semi-quantitatively evaluated by 2 observers. The degree of expression was graded as follows: -, negative; +, mild; ++, moderate; and +++, high. The results are shown in Table 1. An intense expression of CK7 and CK19 was observed in all evaluated lesions. As expected, all BCCs were positive for CK5/6, β -catenin, and p63, which are expressed in most BCCs independently of their localisation.

Vulvar BCC is a non-human papillomavirus-related neoplasm that seems to be commonly associated with chronic vulvar irritation.⁷ Abnormal (cytoplasmic/nuclear) β -catenin staining is a frequent feature in several neoplastic vulvar lesions such as squamous cell carcinoma (SCC) and extramammary Paget disease and has been postulated as an useful marker to differentiate neoplastic from non-neoplastic vulvar lesions.⁸ An abnormal β -catenin expression in vulvar BCC was observed in

this work, consistent with their neoplastic nature⁸ (Table 1). Expression of p63 protein (a protein required for cutaneous development and frequently overexpressed in SCC and BCC) was detected in our 4 vulvar BCC cases. Finally, a cytokeratin profile could be useful to discern among different tumours. In fact, a cytokeratin profile could be used to determine the origin from metastases of unknown origin.⁹ All cases of vulvar BCC in this work were positive for staining in CK7 and CK19 (Table 1). Interestingly, the staining for CK7 and CK19 is less frequent and partially depends on the histological type in photoexposed BCC.¹⁰ Overall, our initial data suggest that vulvar BCCs share a similar molecular profile with other malignant lesions that could appear in this region.

Mutations induced by ultraviolet radiation on stem cells from hair follicles and mechanosensory niches represent the more accepted theory regarding the potential origin of BCC. Three of 4 vulvar BCCs developed in areas with abundant sebaceous glands but devoid of hair follicles (inner aspect of the labia majora), whereas 1 appeared on the hairy side, rich in apocrine glands. This epithelium, rich in apocrine or sebaceous glands, may participate in the origin of vulvar BCC. All vulvar BCCs in our study were CK7 positive, a cytokeratin that stains the simple glandular epithelia and glandular tumours. As far as we know, the cytokeratin profile has not been evaluated in a series of vulvar BCCs. Alessi et al¹⁰ in 2010 analysed the cytokeratin profile of different subtypes of BCCs independently of their location.

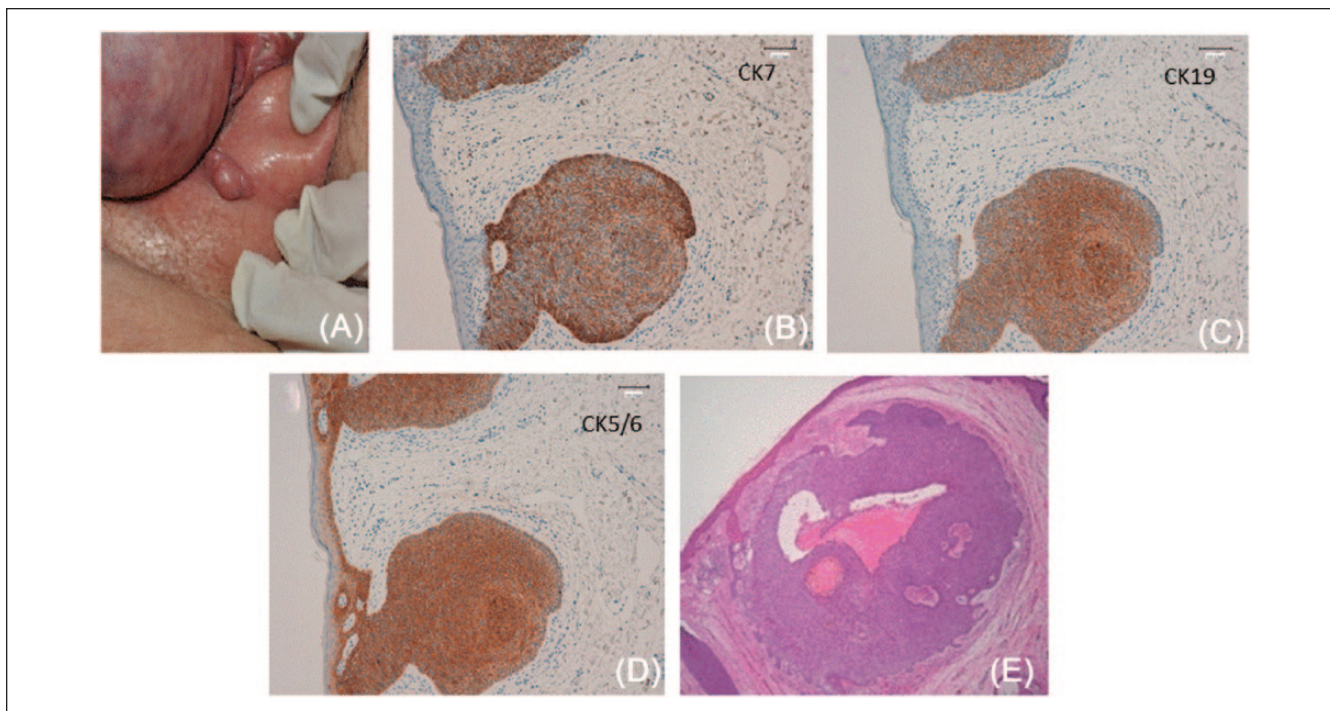


Figure 2. Clinicopathological features of one of the basal cell carcinomas (BCCs) in case 3. (A) BCC on the vulvar semimucosa, a nonhairy area. (B) Immunohistochemical stain for cytokeratin 7 was positive in tumour cells ($\times 100$). (C) Immunohistochemical stain for cytokeratin 19 was also positive in the entire tumour area ($\times 100$). (D) Immunohistochemical stain for cytokeratin 5/6 was positive too ($\times 100$). (E) Histopathology of the excised BCC (hematoxylin and eosin, $\times 40$).

Table 1. Immunohistochemical Pattern.^a

Case	CK5/6	CK7	CK19	β -Catenin	p63
Case 1	++	+++	+	++	++
Case 2	+++	+++	++	++	+++
Case 3a	++	++	++	++	+++
Case 3b	++	++	++	++	+++

^aIntensity levels: -, negative; +, mild; ++, moderate; +++, high.

Expression of CK7 was uncommon in the 52 BCCs evaluated, but 15 of 17 BCCs with adnexal differentiation were CK7 positive. The authors proposed that BCC could also originate in stem cells of sebaceous or apocrine units. In agreement with this hypothesis, we have observed a high expression of CK7 in the 4 vulvar BCCs.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

- Sakai T, Goto M, Kai Y, et al. Vulvar basal cell carcinoma with bone metastasis. *J Dermatol*. 2011;38:97-100.
- Mulayim N, Foster Silver D, Tolgay Ocal I, Babalola E. Vulvar basal cell carcinoma: two unusual presentations and review of the literature. *Gynecol Oncol*. 2002;85:532-537.
- Blok JL, Reesink-Peters N, Diercks GF, Reyners AK, Terra JB. Vulvar basal cell carcinoma with destructive consequences. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2012;156:A5391.
- Watson GA, Kelly D, Prior L, et al. An unusual case of basal cell carcinoma of the vulva with lung metastases. *Gynecol Oncol Rep*. 2016;18:32-35.
- Ansai S, Arase S, Kawana S, Kimura T. Immunohistochemical findings of sebaceous carcinoma and sebaceoma: retrieval of cytokeratin expression by a panel of anti-cytokeratin monoclonal antibodies. *J Dermatol*. 2011;38:951-958.
- Van der Linden M, Meeuwis KA, Bulten J, Bosse T, van Poelgeest MI, de Hullu JA. Paget disease of the vulva. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;101:60-74.
- Kara M, Colgecen E, Yildirim EN. Vulvar basal cell carcinoma. *Indian J Pathol Microbiol*. 2012;55:583-584.
- Li B, Zhang Q, Ouyang L, et al. Aberrant staining patterns of E-cadherin and β -catenin: a potential diagnostic value for distinguishing vulvar intraepithelial neoplasia from non-neoplastic vulvar lesions. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6:1362-1366.
- Reyes García-De la Fuente M, Sanmartín-Novell V, Casanova-Seuma JM. Cutaneous metastasis from a pancreatic adenocarcinoma as a form of presentation of tumoral recurrence. *Gastroenterol Hepatol*. 2014;37:299-301.
- Alessi E, Venegoni L, Fanoni D, Berti E. Cytokeratin profile in basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol*. 2008;30:249-255.

Cytokeratin Profile of Basal Cell Carcinomas According to the Degree of Sun Exposure and to the Anatomical Localization

M^a Reyes García-de-la-Fuente, MD,† Maria Santacana, PhD,‡§ Joan Valls, PhD,† Felip Vilardell, MD, PhD,‡ José Manuel Fernández Armenteros, MD,* Ramon Pujol, MD, PhD,§ Eloi Gari, PhD,†¶ and Josep Manel Casanova, MD, PhD*†¶*

Abstract: Basal cell carcinoma (BCC) seems to originate from ultraviolet light-induced mutations involving the bulge or the outer sheath of the hair follicle cells. However, the etiopathogenic mechanisms involved in the development of these tumors in nonphotoexposed and in hairless areas remain unclear. The cytokeratin (CK) profile (including CK5/6, CK7, CK14, CK15, CK17, and CK19) from a series of different BCC subtypes developing in sun-exposed and non-sun-exposed areas, including hairless regions, was evaluated. The authors have observed that CK7 expression in BCC is associated with the anatomical localization of the tumor and its sun-exposition, but not with other factors such as histological subtype. The expression of this CK is higher in BCCs located in non-sun-exposed and nonhairy areas, such as the vulvar semimucosa and the nipple. Because CK7 is a marker of simple glandular epithelia, the authors suggest a glandular origin for BCCs located in hairless and nonphotoexposed areas.

Key Words: basal cell carcinoma, cytokeratins, hair follicle, sebaceous gland, photoexposition

(*Am J Dermatopathol* 2017;0:1–7)

INTRODUCTION

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common malignancy in whites. BCC often arises on sun-exposed areas such as the face and upper trunk and shows slow growth

and a variable locally aggressive behavior.¹ The cellular origin of the BCC is not completely elucidated, but development of BCC from both the *stem cell* of the outer sheath of the hair follicle or hair bulge has been hypothesized.² Some authors have suggested that a subset of BCC may arise from the interfollicular epithelium.^{3,4} In patients with Gorlin syndrome (nevroid BCC syndrome), germ-line mutations in the *PTCH1* gene have been demonstrated and molecular somatic mutations in the *PTCH1* gene and other genes encoding proteins of the hedgehog pathway have also been detected in sporadic BCC.^{5–8} However, somatic mutations in BCC usually show the characteristic pattern of UV-induced mutations.⁹

Cytokeratins (CK) constitute intermediate filaments of epithelial cells, forming part of the cellular cytoskeleton.¹⁰ Malignant tumor cells tend to retain the CK expression pattern of the original cells and can be used as potential markers to determine either the origin of a tumor and to confirm the nature of metastatic cancer of unknown origin.¹¹ Several studies have been performed to evaluate CK expression in BCC.^{12–16} However, in large series of tumors, no clear-cut differences regarding the expression pattern in different clinical and histopathological variants of BCC have been detected. However, as far as we are concerned, no previous studies have evaluated the CK expression profile in BCC in relation to both the exposure to sunlight and anatomic location.

MATERIALS AND METHODS

Biopsies

Sixty-seven skin biopsy samples were retrospectively obtained from the Dermatology Pathology files at the Arnau de Vilanova University Hospital (Hospital Universitari Arnau de Vilanova), and Biomedical Research Institute's Biobank (IRBLleida Biobank) in Lleida, Spain. Both institutions were authorized by the Department of Health of the Government of Catalonia as from April 29, 2013, and registered on the National Register of Biobanks of the Carlos III Health Institute (Spain) under reference number B.0000682. The Biobank guarantees the traceability and quality of the samples and the consent process undertaken in accordance with the protocols approved by the Local Ethical Committee following the basic principles (respect for the individual), operational risk-management (risk–benefit), and guidelines (good clinical

From the *Department of Dermatology, University Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain; †Biomedical Research Institute of Lleida (IRBLleida), Lleida, Spain; ‡Department of Pathology, University Hospital Arnau de Vilanova, Lleida, Spain; §Department of Dermatology, Hospital del Mar, Parc de Salut Mar, Barcelona, Spain; and ¶Department of Medicine, University of Lleida, Lleida, Spain.

The authors declare no conflicts of interest.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.amjdermatopathology.com). Reprints: Ma Reyes García-de-la-Fuente, MD, Department of Dermatology, University Hospital Arnau de Vilanova, Avenida Alcalde Rovira Roure, 80, 25198 Lleida, Spain (e-mail: mrgarcia_dlf@hotmail.com).

Copyright © 2017 The Author(s). Published by Wolters Kluwer Health, Inc. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial-No Derivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND), where it is permissible to download and share the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially without permission from the journal.

practice) of the Declaration of Helsinki (World Medical Association, 1964). The included samples had been selected according to the area involved, including only samples of BCC developing in chronic or intermittent sun-exposed areas and in non-sun-exposed areas.

The following data were recorded for each patient with BCC: sex, age, solar elastosis, tumor differentiation, and tumoral localization (see **Tables 1–3, Supplemental Digital Content 1**, <http://links.lww.com/AJDP/A59>). Thirty BCCs had developed in a chronic photoexposed area (face) (group 1); 22 BCCs arising in an intermittent photoexposed area (upper trunk) (group 2), including a case of BCC on a man’s nipple, and 15 BCCs developing in nonphotoexposed locations (group 3), including 5 vulvar BCCs (hairy area), 4 BCCs located on the inner part of the labia majora (semimucous membrane) (a hairless area), 1 on the perineum, 1 on the female mons pubis, 1 on the female breast, and 3 on axillae.

Histopathological Evaluation

Following a systematized protocol, a panel of histopathological features was blindly evaluated by 2 independent observers. BCCs were classified as superficial, nodular, or infiltrating BCC. Tissue blocks were sectioned at a thickness of 3 μm, dried for 1 hour at 65° before pretreatment procedure of deparaffinization, rehydration, and epitope retrieval in the Pre-Treatment Module, PT-LINK (DAKO) at 95°C for 20 minutes in x50 Tris/EDTA buffer, pH 9. Before staining the sections, endogenous peroxidase activity was blocked. Anti-CK monoclonal antibodies against CK5/6 (DAKO, Glostrup, Denmark), CK7 (DAKO, Glostrup, Denmark), CK14 (Leica, Newcastle, United Kingdom), CK15 (Leica, Newcastle, United Kingdom), CK17 (DAKO, Glostrup, Denmark), and CK19 (DAKO, Glostrup, Denmark) were evaluated (Table 1).¹⁷ After incubation, the reaction was visualized with the EnVision FLEX Detection Kit (DAKO, Glostrup, Denmark) using diaminobenzidine chromogen as a substrate. Sections were counterstained with hematoxylin.

Immunohistochemical results were evaluated by following uniform preestablished criteria. Immunoexpression was graded semiquantitatively (histoscore) by considering the

percentage of cells stained (0%, 25%, 50%, 75%, and 100%) and intensity of the staining (negative staining, 0; light, 1; moderate, 2; and intense, 3). The maximum value was 300. Results of this histoscore were subjected to statistical analysis. Mean and SD were computed to define immunoexpression levels. The Mann–Whitney or Kruskal–Wallis test was conveniently used to assess the differences between sample types. A linear model was also used to adjust for potentially confounding variables (sex and age). A multivariate logistic regression model was fitted to determine a molecular-based profile associated with photoexposure. Sensitivity and specificity analysis was performed to assess its reproducibility, computing the area under the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve. All analyses were performed using R statistical package, and the threshold for significance was set at 5% (α = 0.05).

Other histopathological data were also analyzed as a second objective such as tumor differentiation (follicular, apocrine/eccrine or sebaceous) and BCC subtype to correlate with the CK expression. The criteria used in this work to diagnose adnexal differentiation in BCC were as follows¹⁸ (see **Figure 1, Supplemental Digital Content 1**, <http://links.lww.com/AJDP/A58>).

Apocrine/Eccrine Differentiation

Decapitated cells, ducts (lined by cuboidal cells with an eosinophilic cuticular border or vacuolated alveolar units).

Sebaceous Differentiation

Sebocytes and sebaceous ducts.

Follicular Differentiation

Bulb and papilla (papillary mesenchymal bodies including circular-shaped papilla). Isthmus (cells with abundant pink cytoplasm that cornify into compact keratin without keratohyalin granules).

The degree of solar elastosis was evaluated by a pathologist, and those referred to as positive included from the mildest (presence of single-scattered elastotic fibers) to the most severe (clumps of elastotic fibers).

TABLE 1. Expression Pattern for the CK in Normal Skin and the Antibodies Used in the Immunohistochemistry¹⁷

Antigen	Antibody-Clone	Dilution	Source	Skin Targets
CK5/6	D5/16 B4	Ready to use	DAKO, Glostrup, Denmark	Epidermis (basal and parabasal cells), hair follicle (all parts except the inner sheath), sebaceous gland (all parts), sweat glands (all parts except secretory cells)
CK7	OV-TL 12/30	Ready to use	DAKO, Glostrup, Denmark	Sebaceous gland (sebocytes and undifferentiated cells) and sweat glands (secretory cells)
CK14	LL002	1:100	Leica, Newcastle, United Kingdom	Epidermis (all layers except the corneum layer), hair follicle (all parts except the inner sheath), sebaceous gland (all parts), sweat glands (all parts except secretory cells)
CK15	LHK15	1:100	Leica, Newcastle, United Kingdom	Hair follicle (only in the bulge and follicular germinative cells), sebaceous gland (undifferentiated cells), and sweat glands (only in secretory cells)
CK17	E3	Ready to use	DAKO, Glostrup, Denmark	Hair follicle (isthmus and outer sheath) and sebaceous gland (only sebaceous ducts)
CK19	RCK108	Ready to use	DAKO, Glostrup, Denmark	Hair follicle (only in the bulge and follicular germinative cells) and sweat gland (only secretory cells)

RESULTS

The histoscore results with the expression of CK in each of the 3 anatomical locations are reflected in **Supplemental Digital Content 1** (see **Tables 1–3**, <http://links.lww.com/AJDP/A59>). CK5/6 expression showed significant differences depending on the anatomical BCC localization (adjusted $P = 0.0002$) (**Supplemental Digital Content 1, Table 4**, <http://links.lww.com/AJDP/A60>). Higher expression levels were detected in facial lesions, whereas in trunk samples, low CK5/6 were noted (Fig. 1), and nonphotoexposed samples exhibited an intermediate level of CK5/6 expression. CK7 expression showed also significant differences depending on the BCC localization (adjusted $P = 0.009$) (see **Table 4, Supplemental Digital Content 1**, <http://links.lww.com/AJDP/A60>). Most BCC samples arising in nonphotoexposed areas showed high CK7 expression levels, whereas tumors located on the trunk and face (sun-exposed areas) exhibited negative or barely detectable levels (Fig. 1). In 5 of 30 facial samples, maximum levels of CK7 histoscore were detected, which suggests that different subsets of nodular facial BCCs regarding CK7 expression may exist (Figs. 2B, D). CK7 expression was also

detected in all BCC located on the inner part of the labia majora ($n = 4$), a nonphotoexposed area devoid of hair follicles, and BCC arising in the nipple, another hairless area derived from a modified apocrine gland but located in an intermittent photoexposed area (Figs. 3B, D). In addition, on the axilla, a nonphotoexposed area where apocrine glands are abundant, the expression of CK7 was also highly positive (Figs. 2A, C). No statistically significant differences in the expression of CK14, CK15, CK17, and CK19 were detected among the different anatomical localizations.

To assess possible differences between sun-exposed and non-sun-exposed areas, all patients included in groups 1 and 2 (BCC from both chronic and intermittently photoexposed areas) were compared with patients with lesions arising in nonphotoexposed areas (group 3) (Table 2). No differences were detected regarding CK5/6 expression when comparing the degree of sun exposure. Only significant differences for the CK7 histoscore were detected (adjusted $P = 0.002$) in which photoexposed areas showed a histoscore level of 86.06 (± 101.63), whereas non-sun-exposed areas showed 181.67 (± 104.57). Moreover, because the solar elastosis degree is

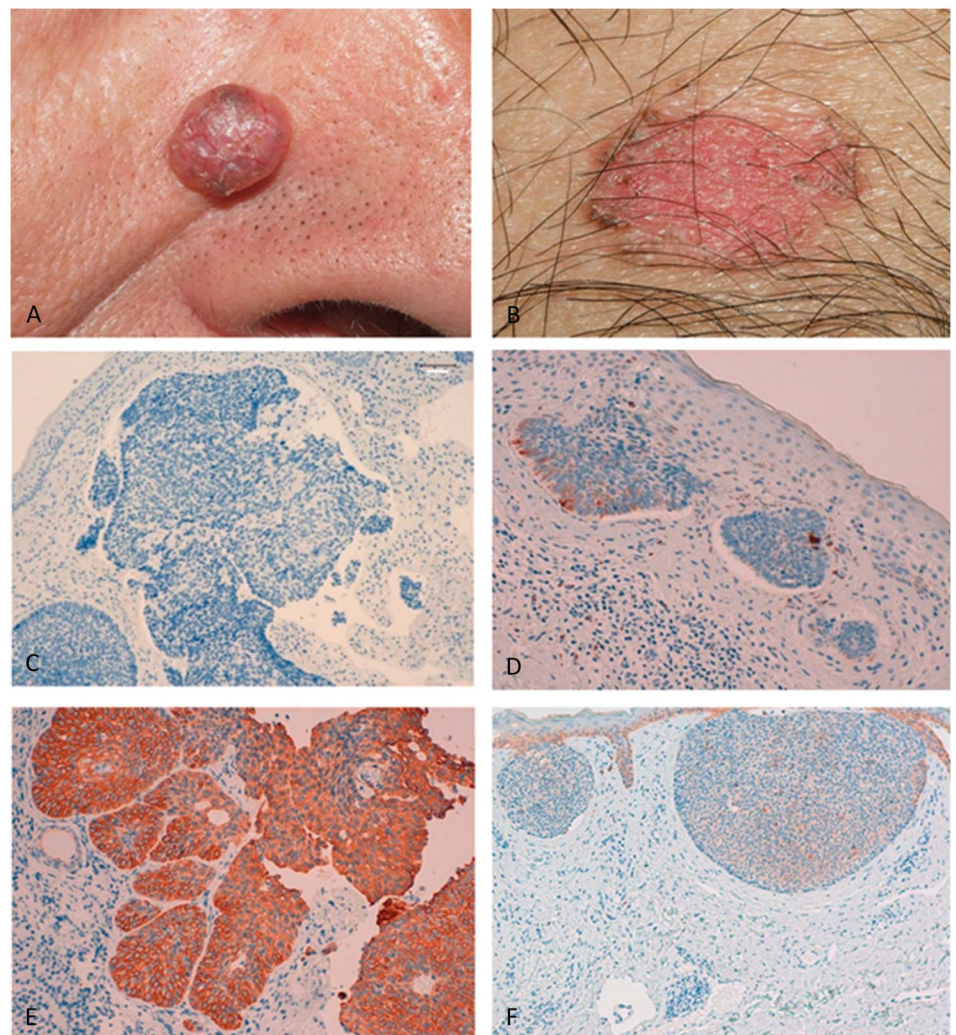


FIGURE 1. Representative images of nodular and superficial BCCs. A, Clinical image of a facial nodular BCC. B, Clinical image of a superficial BCC from the trunk (C) nodular BCC with negative CK7 expression. D, Superficial BCC with low CK7 expression. E, Nodular BCC with high CK5/6 expression. F, Superficial BCC with low CK5/6 expression. Original magnification: (C) $\times 100$; (D) $\times 40$; (E) $\times 100$; (F) $\times 40$.

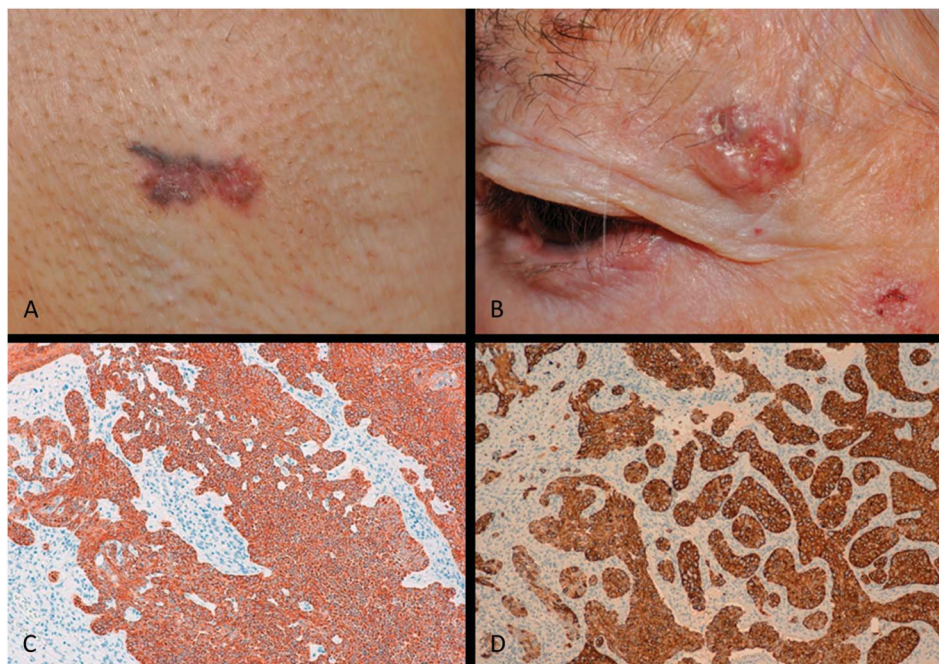


FIGURE 2. A, Nonphotoexposed BCC on the axilla showing intense expression of CK7 (C). B, Nodular BCC on the face with a very intense CK7 expression (D). Original magnification: (C) $\times 40$; (D) $\times 100$.

an additional manner to measure sun exposure, as expected, we have observed the same results while comparing CK expression with either the elastosis degree or anatomical location (Table 2 and see **Table 5, Supplemental Digital Content 1**, <http://links.lww.com/AJDP/A61>). However, to assess whether the data obtained in our CK profile were reliable enough in the degree of photoexposure, we generated an ROC curve. We achieved an area under the curve of a 95% (AUC 0.95), which indicates that the CK profile correlates with the localization of BCCs in sun-exposed and non-sun-exposed areas (Fig. 4).

The secondary analysis of sex and age did not provide relevant information (see **Table 6, Supplemental Digital Content 1**, <http://links.lww.com/AJDP/A62>). As expected, a relationship between those factors and the CK expression was not detected, except for CK14. Intriguingly, CK14 shows a significant *P* value when compared with sex. The mean histoscore of CK14 is slightly higher in women, but this finding needs further investigation.

We have also assessed the correlation of keratins with the histological BCC subtype irrespective of the anatomical location. We have observed a significant association of the

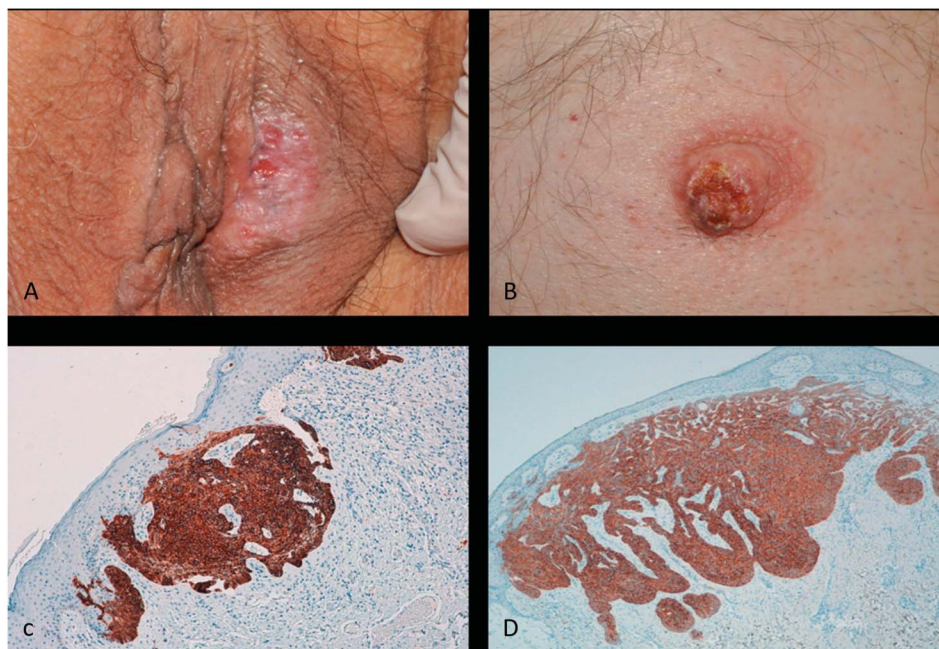


FIGURE 3. Nonphotoexposed BCCs showing high CK7 expression. A, Vulvar BCC showing an intensive CK7 expression (C). B, Ulcerated BCC from the nipple with high CK7 expression (D). Original magnification: (C) $\times 100$; (D) $\times 40$.

TABLE 2. Keratin Immunoexpression With Relation to Sun Exposure (Photoexposed vs. Nonphotoexposed)

	Totals, n = 67 (100%)	Photoexposed, n = 52 (77.61%)	Nonphotoexposed, n = 15 (22.39%)	P	Adjusted P
CK7	107.46 (109.15)	86.06 (101.63)	181.67 (104.57)	0.001	0.002
CK5/6	158.21 (68.17)	160.58 (62.10)	150.00 (88.14)	0.58	0.60
CK19	47.39 (66.02)	41.83 (61.58)	66.67 (78.87)	0.11	0.20
CK14	215.67 (51.65)	219.23 (39.80)	203.33 (81.21)	0.51	0.28
CK17	209.33 (65.83)	212.98 (62.72)	196.67 (76.69)	0.44	0.40
CK15	24.22 (42.72)	19.00 (38.98)	42.86 (51.36)	0.08	0.06

Mean (and SD) presented for each marker, assessing the differences with a Mann–Whitney. *P* values are adjusted by sex and age obtained with an analysis of variance test.

expression of CK5/6 and the histological subtype. The mean histoscore of this CK distinctly increases in nodular BCC compared with superficial ones (Table 3).

Finally, we have evaluated the association of CK expression with the pattern of adnexal differentiation. The samples were analyzed by the pathologist, and 3 groups of differentiation were defined: follicular (11 samples), apocrine/eccrine (11 samples), and sebaceous (3 samples). In total, 37% of the samples showed adnexal differentiation. Our data show that CK7 is highly expressed in BCC with apocrine/eccrine adnexal differentiation (see **Table 7, Supplemental Digital Content 1**, <http://links.lww.com/AJDP/A63>). However, because of the low number of samples, statistical analyses are not reliable (ie, sebaceous differentiation).

DISCUSSION

Stem cells from the outer sheath of the hair follicle or hair bulge are the most widely accepted theory on the cellular origin of BCC. The histological similarities between some

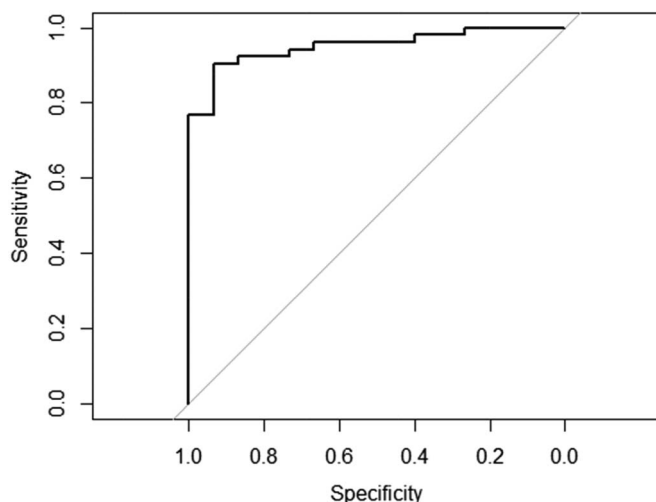


FIGURE 4. ROC curve to assess the predictive value of the multivariate logistic regression model to discriminate the samples corresponding to the photoexposed versus nonphotoexposed site. Estimation of the area under the curve (AUC) = 0.95. This mathematical model allows us to predict correctly where a BCC is located, photoexposed versus nonphotoexposed site, according to the CK profile (CK5/6, CK7, CK14, CK17, and CK19) in the 95% of all the cases.

clear-cut follicular tumors and BCC along with the low frequency of BCC arising in hairless areas^{19,20} and the development of BCC on follicular stem cell CK15⁺¹⁴ seem to support this hypothesis. A possible origin from the interfollicular epithelium has also been suggested, based on studies in murine models.^{3,4,21}

The underlying molecular alterations in BCC have been studied extensively. In Gorlin syndrome, an autosomal dominant genetic disorder characterized by the early development of multiple BCCs, a constitutive mutation of the *sonic hedgehog* pathway, alongside loss of the inhibitory function of the membrane receptor, PTCH, has been seen. In sporadic BCC, the sonic hedgehog pathway seems to be altered in 40%–60% of cases: 20%–40% as a result of a double mutation in the *PTCH1* tumor suppressor gene and in 10%–20% of patients because of a single mutation of the *SMO* oncogene.^{5–8} Ultraviolet (UV) radiation may induce deleterious mutations in one or both alleles giving rise to pathway activation. In rare instances, alterations of the Wnt pathway and the involvement of β -catenin or the ERK (MAP kinase) pathway have been found.^{22,23}

Not exceptionally, BCC may arise in non-sun-exposed areas, such as the axilla or pubic region, and the etiopathogenic role of UV exposure in those areas could not be responsible. Additionally, in rare instances, BCC is observed to develop in hairless areas such as the vulvar semimucosa or the nipple, resulting in some controversies regarding its unequivocal follicular origin. The CK profile has been used to establish the tissue origin of the tumor because it is commonly conserved during cancerous transformation. However, it is important to take into account different aspects when interpreting CK data: the degree of tumor differentiation, the specificity and reliability of antibodies, and also the tumor heterogeneity. To ascertain the real niche involved in the origin of the neoplasia, the CK profile may be used in conjunction with other features such as morphological data.²⁴ In this work, the CK profile we found suggests a glandular origin of BCC arising in nonhairy and non-sun-exposed areas, but our data cannot exclude the other possible hypothesis. We have compared CK expression patterns in a series of BCCs arising in areas chronically exposed to sunlight, BCCs developing in areas with acute and intermittent photoexposure, and BCCs arising in nonphotoexposed areas. To our knowledge, no previous studies comparing CK expression in BCC with the anatomical location or the degree of exposure to sunlight have been published.

TABLE 3. Association of the BCC Subtype Group With CKs

	Totals	BCC Subtypes			P
		Infiltrative	Nodular	Superficial	
CK7	107.46 (109.15)	141.67 (137.69)	103.68 (120.94)	108.33 (94.99)	0.46
CK5/6	158.21 (68.17)	158.33 (72.17)	196.32 (46.11)	115.00 (64.53)	<0.00001
CK19	47.39 (66.02)	50.00 (50.00)	46.32 (64.59)	48.33 (70.69)	0.89
CK14	215.67 (51.65)	233.33 (57.74)	222.06 (51.04)	206.67 (52.08)	0.52
CK17	209.33 (65.83)	200.00 (0.00)	219.12 (53.68)	199.17 (79.73)	0.81
CK15	24.22 (42.72)	58.33 (80.36)	25.76 (48.20)	18.75 (29.36)	0.55

Mean (and SD) are shown. P values from a Mann–Whitney test shown to assess the relationship.

CK7, a protein mainly expressed in the secretory cells of sweat and sebaceous glands,¹⁷ showed a significantly higher expression in anatomic areas not exposed to sunlight and specifically in apocrine gland-rich areas such as genital and axillary regions and the nipple. Expression of CK7 is usually observed in glandular epithelia such as mammary ductal, pancreatic, or urothelial epithelia. CK7 is expressed also in normal or tumor-derived apocrine and sebaceous glands^{12,17} and is considered a marker of mammary and extramammary Paget disease.^{25,26} The possibility that BCC-developing apocrine-rich areas such as the axilla and pubic areas may have a common origin in the stem cells of apocrine gland could be speculated. In fact, fewer than 100 cases of axillary BCCs have been published in the literature^{27–29} (Fig. 2), but no studies evaluating the CK profile in such tumors have been reported. A similar situation could be postulated for the rare observation of BCC developing on the nipple,³⁰ an apocrine-rich area, devoid of hair follicles,³¹ in which we have also observed an intense CK7 expression (Figs. 3B, D). Among other nonphotoexposed regions, in some cases of vulvar BCC developing on the inner part of the labia majora, another hairless region containing noncanonical sebaceous glands and no traces from apocrine glands, we have also observed high expression of CK7 (Figs. 3A, C), a feature that may also suggest a possible sebaceous stem cell³² as the origin of these tumors.³³

As expected, CK7 is also significantly associated with negative elastosis in agreement with its higher expression in non–sun-exposed areas (see **Table 5, Supplemental Digital Content 1**, <http://links.lww.com/AJDP/A61>). However, in our series, 14 of 30 facial nodular BCCs were CK7 negative, whereas 5 of 30 showed an intense CK7 expression (histoscore 300) (see **Table 1, Supplemental Digital Content 1**, <http://links.lww.com/AJDP/A61>). Alessi et al¹² analyzing different series of BCC tumors showed that only a subgroup of BCC, BCC with adnexal differentiation, exhibited high positivity of CK7 (88%), whereas in the other subgroups, CK7 positivity was only 42%. These authors postulated a possible glandular origin of some BCC. Consistently, we have observed apocrine/eccrine differentiation in non–sun-exposed samples and follicular differentiation in facial samples. Then, we can obtain a significant association of CK7 expression and apocrine/eccrine differentiation. This result is consistent with our proposal, but we believe that the compilation of additional samples (ie, sun-exposed BCC with eccrine or sebaceous differentiation) will be required in future works

to confirm these results (see **Table 7, Supplemental Digital Content 1**, <http://links.lww.com/AJDP/A61>).

In our study, we have been unable to detect a correlation between CK7 and CK19 expression levels. This feature has been previously reported by other authors.¹⁷ We have observed low levels of CK15, a potential marker of the stem cells of the hair bulge,¹⁴ in all the BCCs studied. Similar results have been described in previous studies.^{14,17} However, histoscore levels of CK15 and CK19 were higher in nonphotoexposed regions, although that was not statistically significant (Table 2). Both CKs are expressed in the secretory cells of sweat glands¹⁷ and in the bulge of the hair follicle. As reported in other studies, CK17 was positive in all the BCCs studied.^{12,15,34–36} CK17 is a marker of follicular differentiation because it is weakly positive in the upper portion of the outer root sheath of the hair follicle and is also expressed in the deep portion. CK14 was also positive in all the BCCs studied.^{15,34–37} CK14 was expressed primarily in the subinfundibular outer sheath region of the hair follicle.¹² No significant differences among the evaluated groups were detected regarding the expression of this CK.

We have studied, as a secondary objective, whether some differences are detected in the CK profile in the different BCC subtypes (nodular BCC, superficial BCC, and infiltrative BCC), and we obtained differences in CK5/6 expression in nodular BCC. Facial BCC showed high levels of CK5/6, and this association is not detected when comparing sun-exposed and non–sun-exposed BCC (Table 2). Because we have obtained almost all nodular BCCs from the face and most of the superficial ones from the trunk, the same significant association is observed with the expression of CK5/6 and the anatomical location (see **Table 4, Supplemental Digital Content 1**, <http://links.lww.com/AJDP/A61>). From our data, we cannot, therefore, conclude whether the association is with either the anatomical localization or the histological subtype. However, Alessi et al 2008¹² did not find any association of CK5/6 expression with the histological subtype. Taking these data into account, the possibility of a different expression of CK5/6 depending on the anatomical localization, face (chronic sun-exposed) versus trunk (discontinuous sun-exposed), is open.

In conclusion, according to the expression of CK7 and its correlation with BCCs located in nonphotoexposed areas, we suggest that those BCCs are derived from simple glandular epithelia. In agreement with this, nonphotoexposed areas such as the axilla and pubis or in some special locations such as the

nipple or the vulvar semimucosa are rich in apocrine and sebaceous glands. In such instances, etiopathogenic factors other than ultraviolet light exposure could be responsible.

REFERENCES

- Bath-Hextall FJ, Perkins W, Bong J, et al. Interventions for basal cell carcinoma of the skin. In: *The Cochrane Library*. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd; 2009:1–60. Search date 2009.
- Wang GY, Wang J, Mancianti ML, et al. Basal cell carcinomas arise from hair follicle stem cells in Ptch 1 (+/-) mice. *Cancer Cell*. 2011;19:114–124.
- Zackheim HS. Origin of the human basal cell epithelioma. *J Invest Dermatol*. 1963;40:283–297.
- Youssef KK, Van Keymeulen A, Lapouge G, et al. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol*. 2010;12:299–305.
- Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol*. 2006(suppl 19):S127–S147.
- Lacour JP. Carcinogenesis of basal cell carcinomas: genetics and molecular mechanisms. *Br J Dermatol*. 2002(suppl 146):17–19.
- Wicking C, Smyth I, Bale A. The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene*. 1999;18:7844–7851.
- Daya-Grosjean L, Couvé-Privat S. Sonic hedgehog signalling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett*. 2005;225:1814–1892.
- Sehgal VN, Chatterjee K, Pandhi D, et al. Basal cell carcinoma: pathophysiology. *Skinmed*. 2014;12:176–181.
- Toivola DM, Boor P, Alam C, et al. Keratins in health and disease. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;32:73–81.
- Reyes García-De la Fuente M, Sanmartín-Novell V, Casanova-Seuma JM. Cutaneous metastasis from a pancreatic adenocarcinoma as a form of presentation of tumoral recurrence. *Gastroenterol Hepatol*. 2014;37:299–301.
- Alessi E, Venegoni L, Fanoni D, et al. Cytokeratin profile in basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol*. 2008;30:249–255.
- Sellheyer K. Basal cell carcinoma: cell of origin, cancer stem cell hypothesis and stem cell markers. *Br J Dermatol*. 2011;164:696–711.
- Abbas O, Bhawan J. Expression of stem cell markers nestin and cytokeratin 15 and 19 in cutaneous malignancies. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25:311–316.
- Kurzen H, Esposito L, Langbein L, et al. Cytokeratins as markers of follicular differentiation: an immunohistochemical study of trichoblastoma and basal cell carcinoma. *Am J Dermatopathol*. 2001;23:501–509.
- Hida T, Saga K, Kimura T. Cytokeratin expression patterns in multiple infundibulocystic basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2011;38:309–313.
- Ansai S, Arase S, Kawana S, et al. Immunohistochemical findings of sebaceous carcinoma and sebaceoma: retrieval of cytokeratin expression by a panel of anti-cytokeratin monoclonal antibodies. *J Dermatol*. 2011;38:951–958.
- Chu SW, Biswas A. Basal cell carcinomas showing histological features generally associated with cutaneous adnexal neoplasms. *J Cutan Pathol*. 2015;42:1049–1062.
- Donovan J. Review of the hair follicle origin hypothesis for basal cell carcinoma. *Dermatol Surg*. 2009;35:1311–1323.
- Grachtchouk M, Pero J, Yang SH, et al. Basal cell carcinomas in mice arise from hair follicle stem cells and multiple epithelial progenitor populations. *J Clin Invest*. 2011;121:1768–1781.
- Panteleyev AA, Rosenbach T, Paus R, et al. The bulge is the source of cellular renewal in the sebaceous gland of mouse skin. *Arch Dermatol Res*. 2000;292:573–576.
- Aguayo RS, Rafel M, Santacana M, et al. β -catenin and cyclin D1 expression in Gli1-independent basal cell carcinomas. *Eur J Dermatol*. 2013;23:734–736.
- Aguayo RS, Rafel M, Santacana M, et al. Erk 1/2 activation in stromal fibroblasts from sporadic basal cell carcinomas. *Dermatol Surg*. 2015;41:677–684.
- Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002;40:403–439.
- Böer-Auer A, August C, Falk JM, et al. Benign mucinous metaplasia of the genital mucosa: histomorphological and immunohistochemical features and criteria for differentiation from extramammary Paget disease. *Br J Dermatol*. 2011;165:1263–1272.
- Hendi A, Perdikis G, Snow JL. Unifocality of extramammary Paget disease. *J Am Acad Dermatol*. 2008;59:811–813.
- Wani GM, Ahmad SM, Qayoom S, et al. Neglected Basal cell carcinoma in axilla. *J IMA* 2012;44:1–4.
- Betti R, Crosti C, Moneghini L, et al. Axillary basal cell carcinoma: additional 25 patients and considerations. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2011;25:858–860.
- Cohen PR. Axillary basal cell carcinoma in patients with Goltz-Gorlin syndrome: report of basal cell carcinoma in both axilla of a woman with basal cell nevus syndrome and literature review. *Dermatol Online J*. 2014;20:13030.
- Chun KA, Cohen PR. Basal cell carcinoma of the nipple-areola complex: a comprehensive review of the world literature. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2016;6:379–395.
- Zucca-Matthes G, Urban C, Vallejo A. Anatomy of the nipple and breast ducts. *Gland Surg*. 2016;5:32–36.
- Reuter K, Niemann C. The sebaceous gland stem cell niche. In: *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. Cham, Switzerland: Springer International Publishing; 2015:27–43.
- García-de-la-Fuente MR, Santacana M, Vilardell F, et al. Vulvar basal cell carcinoma: four case reports with immunohistochemical study. *J Cutan Med Surg*. 2017;21:457–459.
- Asada M, Schaart FM, de Almeida HL Jr, et al. Solid basal cell epithelioma (BCE) possibly originates from the outer root sheath of the hair follicle. *Acta Derm Venereol*. 1993;73:286–292.
- Schirren CG, Rütten A, Kaudewitz P, et al. Trichoblastoma and basal cell carcinoma are neoplasms with follicular differentiation sharing the same profile of cytokeratin intermediate filaments. *Am J Dermatopathol*. 1997;19:341–350.
- Apaydin R, Gürbüz Y, Bayramgürler D, et al. Cytokeratin contents of basal cell carcinoma, epidermis overlying tumour, and associated stromal amyloidosis: an immunohistochemical study. *Amyloid*. 2005;12:41–47.
- Krüger K, Blume-Peytavi U, Orfanos CE. Basal cell carcinoma possibly originates from the outer root sheath and/or the bulge region of the vellus hair follicle. *Arch Dermatol Res*. 1999;291:253–259.

Efficacy and mechanism of action of topical ingenol mebutate 0. 05% gel in basal cell carcinoma.

Authors: M R García-de-la-Fuente^{1,2} M.D., M Santacana^{2,3} PhD, J Verdaguer M.D., PhD^{2,4}, F Vilardell³ M.D.,PhD, E Garí^{2,5}PhD, JM Casanova^{1,2,6} M.D., PhD

1. Department of Dermatology, University Hospital Arnau de Vilanova, Lleida.
2. Lleida Institute for Biomedical Research Dr. Pifarré Foundation (IRBLleida).
3. Department of Pathology, University Hospital Arnau de Vilanova, Lleida.
4. Department of Experimental Medicine, Immunology Unit, University of Lleida.
5. Department of Basic Medical Sciences at University of Lleida, Lleida, Catalonia, Spain.
6. Department of Medicine, University of Lleida.

Running head: Topical ingenol mebutate in basal cell carcinoma.

Word count: 2991

Table count: 2

Figure count: 6

Corresponding author:

Dra. M^a Reyes García de la Fuente; e-mail: mrgarcia_dlf@hotmail.com

Address: Department of Dermatology, University Hospital Arnau de Vilanova. Avenida Alcalde Rovira Roure, 80, 25198 Lleida.

Phone number: 973248100.

Fax: 973248754

ABSTRACT

Background: Ingenol mebutate gel (IMG) is a chemotherapeutic agent with an unclear mechanism of action approved for actinic keratosis field therapy. Little evidence has been published about IMG in basal cell carcinoma (BCC).

Objective: To evaluate the efficacy and safety of IMG for the treatment of BCC and to characterize the histopathological changes and the infiltrating cell populations to better understand its mechanism of action.

Methods: Sixteen patients with BCC (10 superficial BCC (sBCC), 5 nodular BCC and 1 infiltrative BCC) located in low risk areas were prospectively evaluated and treated once daily for two consecutive days with IMG 0.05% under occlusion. Patients were randomized in two arms: the first arm was biopsied between the third and the tenth day after treatment initiation ('early immune response'), and the second arm was biopsied at day 30 after treatment initiation ('late immune response'). We evaluated the histopathological changes and the immunopathology by immunohistochemistry: anti-CD3, -CD4, -CD8, -CD20, -CD56, -CD68, -Bcl-2, -CASP3, -FoxP3, -GrzB and -TIA-1.

Results: Among the sixteen BCC patients treated with IMG, ten (62.5%) were in complete remission after two years of follow-up. Treatment with IMG induces inflammation, primary necrosis of tumor cells, and neutrophils' recruitment. The early immune response was characterized by a quick recruitment of T-lymphocytes, macrophages, and natural killer cells. At later timepoints T-regulatory cells and some pro-apoptotic markers were detected and might be responsible for halting the immune response towards the baseline situation. Treatment-related adverse events included erythema, severe flaking/scaling/dryness extending beyond the application site and application-site pain.

Conclusion: IMG demonstrated to be effective in treating basal cell carcinoma, triggering a transient immuno-inflammatory response and producing an important necrosis reaction. Results from larger studies, including dose-escalation trials, will be required to determine the maximum effective tolerated dose of IMG for BCC.

Key words: Basal cell carcinoma (BCC), CD4+, CD68+, immune response, ingenol mebutate gel (IMG), natural killer (NK) cells.

INTRODUCTION

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common malignancy in the Caucasian population. It accounts for around 80% of all non-melanoma skin cancers (NMSC). It is typically slow growing and rarely metastatic but its location, tendency to relapse, multiplicity and possibility to invade and destroy local tissues¹ delimit disease

morbidity. Surgical approaches are the standard strategy for well-defined BCC. Mohs micrographic surgery is generally applied to high-risk tumors or those tumors placed in cosmetically sensitive areas whereas cryotherapy or electrodesiccation and curettage (EDC) are acceptable treatment options for small size superficial BCC (sBCCs) in the trunk and limbs. However, for patients who are poor candidates for

surgery, or have low-risk BCC, as is the case of sBCC, non-surgical methods such as topical treatment or photodynamic therapy may be alternative treatment options which may also reduce the risk of scarring compared to the surgical approach.^{2,3}

Among some already known topical treatments such as 5-fluoracil cream and imiquimod gel, topical ingenol mebutate gel (PEP005), a diterpene ester extracted from the plant *Euphorbia Peplus*, is only approved for actinic keratosis treatment. In actinic keratosis, IMG 0.05% is applied once daily for 2 consecutive days in affected areas of 25 cm² of the trunk and limbs. IMG has demonstrated therapeutic effects on various cutaneous neoplasms including warts, corns, and cancerous lesions⁴. Although IMG is not considered the first option for the treatment of BCC; there is some evidence supporting its efficacy and safety⁴⁻¹¹. In a phase II randomized study, 60 patients with sBCC were placed on varying dosing regimens and concentrations of either IMG or the gel vehicle. Significant histologic clearance at 85 days post-treatment was observed in 63% of patients when 0.05% IMG was applied for two consecutive days ($p < 0.031$)⁵.

IMG induces mitochondria swelling of dysplastic keratinocytes and cell death by primary necrosis. Topical application generates neutrophilic infiltration due to protein kinase C activation, causing effective wound healing. Its dual mechanism of action is characterized by a rapid necrosis lesion beginning 1 to 2 hours after application (causing an increase of intracellular calcium, mitochondrial swelling, and loss of cells membrane integrity) followed by tumor cell apoptosis via neutrophil-mediated cellular cytotoxicity occurring within days. At this time, there is also an increase of TNF- α and IL-8, which recruits and subsequently activates neutrophils towards the

inflammatory infiltrate¹². However, the exact mechanism of action of IMG has not been fully elucidated.

Here, we describe our experience using topical treatment IMG, 0.05% under occlusion in a group of patients with BCC in low-risk locations (trunk and limbs). Our aim was to assess the efficacy and safety of IMG in this indication but also to characterize the inflammatory cell infiltration at different timepoints to better understand IMG's mechanism of action. To our knowledge, this is the first study that, beyond clinical evaluation, analyses the immunoinflammatory infiltrate post IMG treatment in BCC tumors.

MATERIALS AND METHODS

Between May and September 2015, a prospective, parallel, interventional, and randomized clinical study on the efficacy of IMG in BCC was conducted. Twenty one patients were chosen for the screening visit of which five of them were excluded due to incorrect treatment compliance: a total of 16 BCC patients were included. Inclusion criteria was: Caucasian adults above 18 years of age with a histologically confirmed primary BCC (superficial, nodular or infiltrating histological subtypes defined in accordance with published criteria²), located in low risk zones (trunk and limbs) with an extension up to 1 cm². Exclusion criteria was: pregnant and breast feeding women, immunocompromised patients, genetic predisposition to BCC or recurrent BCCs. The study was approved by the Independent Ethics Committee at the Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, Spain.

Informed consents and samples from patients were obtained with support from IRB Lleida Biobank (B.0000682) and PLATAFORMA BIOBANCOS

(PT13/0010/0014). Biobank is an authorized institution of the Health Department of Catalonia as from the 29th of April, 2013 and registered in the National Register of Biobanks of the Carlos III Health Institute (Spain). The Biobank guarantees the traceability and quality of the samples, plus the consent process undertaken in accordance with the protocols approved by the Local Ethical Committee; following the basic principles (respect for the individual), operational risk-management (risk-benefit) and guidelines (good clinical practice) of the Declaration of Helsinki (World Medical Association, 1964).

IMG 0.05% was applied on the lesion site and on a 1 cm perimeter surrounding the lesion site, once daily for two consecutive days. Considering BCC as more locally invasive than actinic keratosis, we applied the gel under occlusion with aluminum disks. Lesions were observed in the following days after treatment according to randomization groups: biopsies were taken between the third and the tenth day after treatment initiation in the first group as an 'early immune response model', coinciding with the maximum clinical inflammation (10

patients, Group 1) and the second group was biopsied at day 30 after treatment initiation as a 'late immune response model' (6 patients, Group 2); (Fig. 1).

Control samples consisted of five biopsies obtained from the first treatment group before starting IMG application (untreated samples). Treatment efficacy was assessed in terms of clinical and histological complete response. We used the local skin reaction (LSR) grading scale to describe side effects related to therapy¹¹. This scale is based on a 0–4 numerical index (being 4 the highest grade of severity) related to 6 specific clinical parameters (erythema, scaling, crusting, swelling, and vesiculation/pustulation, erosion/ulceration) accompanied by a characteristic photographic image for each rating. Total LSR (Local Skin Reaction) score ranges from 0 to 24 points¹³. The LSR test was evaluated one week after treatment initiation for every patient. Pictures were also taken in every patient at the screening visit, before treatment initiation, and during the follow up visits depending on each arm. Patients were randomized in group 1 and group 2 according to the physician's agenda. An additional follow up after 3 months, 6

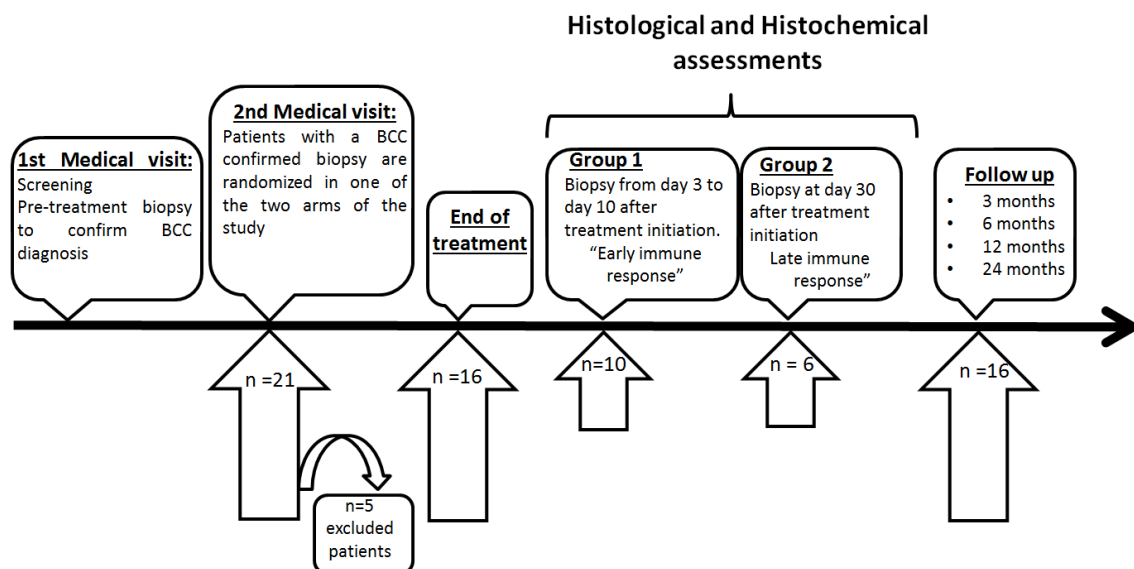


Figure 1. Study design (timing and assessment visits).

months, 1 year, and 2 years after treatment was conducted in every case. Patients with no tumor clearance in the follow-up biopsies discontinued the study and any remaining tumor was treated by surgery.

Immunohistochemical study

Histopathological changes including necrosis and type and degree of the inflammatory infiltrate were analyzed. All post-treatment biopsies and the 5 screening biopsies (control) were analyzed by immunohistochemistry with different antibodies: antiCD3, -CD4, -CD8, -CD20, -CD56, -CD68, -Bcl-2, -CASP3, -FoxP3, -GrzB and -TIA1. See Table 1.

Tissue blocks were sectioned at 3 μ m-thickness, dried for 1 hour at 65°C before pre-treatment procedure of deparaffinization, rehydration and epitope

retrieval in the pre-Treatment Module, PT-LINK (DAKO) (at 95°C for 20 min in 50 x Tris/EDTA buffer and pH 9). Before staining, endogenous peroxidase activity was blocked with peroxidase blocking solution (Dako, Glostrup, Denmark). After incubation with primary antibodies, the reaction was visualized with the EnVision™ FLEX Detection Kit (DAKO, Glostrup, Denmark) using diaminobenzidine chromogen as a substrate according to manufacturer's instructions. Sections were counterstained with hematoxylin. Primary antibodies used in this study are listed in Table 1.

All tissue samples were histologically reviewed by 2 members of the team. For the staining scoring, an automated imaging system, the ACIS® III Instrument (DAKO, Denmark, Glostrup), was used. The mean percentage of positive cells was obtained after evaluating regions of interest

Antigen	Clone	Catalog number	Dilution	Source	Cell marker
CD3	Polyclonal	IR503	Ready to use	DAKO, Glostrup, Denmark	T lymphocytes
CD4	4B12	IR649	Ready to use	DAKO, Glostrup, Denmark	Helper lymphocytes
CD8	C8/144B	IR623	Ready to use	DAKO, Glostrup, Denmark	Cytotoxic lymphocytes
CD20	L26	IR604	Ready to use	DAKO, Glostrup, Denmark	B lymphocytes
CD56	123C3	IR628	Ready to use	DAKO, Glostrup, Denmark	Natural killers lymphocytes
CD68	PG-M1	IR613	Ready to use	DAKO, Glostrup, Denmark	Macrophages
Bcl-2	124	IR614	Ready to use	DAKO, Glostrup, Denmark	Antiapoptotic protooncogen
Cleaved caspase 3 (CASP3)	Polyclonal	9661	1:100	Cell signaling, Massachusetts, USA	Apoptotic marker
FoxP3	D2W8E	98377	1:100	Cell signaling, Massachusetts, USA	Regulatory lymphocytes
Granzyme B (GrzB)	GrB-7	M7235	1:50	DAKO, Glostrup, Denmark	Cytotoxicity marker
TIA1	TIA-1	Ab2712	1:100	Abcam, Cambridge, UK	Natural killers and cytotoxic lymphocytes

Table 1. Primary antibodies used in the study to evaluate inflammatory cell infiltration in groups 1 and 2 after treatment with IMG.

coincident with areas of higher infiltration.

Immunohistochemical post-treatment results were normalized by a control group and were analyzed by ANOVA statistical test.

RESULTS

Efficacy and safety of IMG 0.05% under occlusion in BCC

A total of sixteen patients were included in the study. Clinical and tumor baseline variables are shown in Table 2. The majority of patients were women (62.5%) with a mean age of 66 and more than half of the lesions were located in the trunk (56.25%). There were ten superficial BCCs, five nodular BCCs and one infiltrative BCC.

Patients	n (%)
Men	6 (37.5%)
Women	10 (62.5%)
Mean Age	66
BCC subtype	n (%)
Superficial	10 (62.5%)
Nodular	5 (31.25%)
Infiltrative	1 (6.25%)
Localization	n (%)
Trunk	9 (56.25%)
Abdomen	1 (6.25%)
Neck	2 (12.5%)
Upper extremities	0
Lower extremities	4 (25%)

Table 2. Clinical and pathological data from the 16 patients with BCC included in the study.

After treatment, complete tumor clearance was observed in 8/10 (80%) sBCC, 2/5 (40%) nodular BCCs and 0/1 (0%) infiltrative BCC. At the 2-year follow-up there was no evidence of recurrence in any case.

Regarding adverse events, 10/16 (62.5%) patients experienced a significant local inflammatory reaction with marked tumor erosion and the LSR grading scale was over 20. Four out of sixteen (25%) patients had medium LSR score (values between 12-18) and 2/16 (12.5%) patients had low LSR score (LSR score < 8). Interestingly, patients with medium or low values in LSR score did not show clinical nor histological clearance.

The first day of treatment, some patients experienced severe pain and flaking/blistering/erythema extending beyond the application site (Fig. 2). From the third day, pain was gradually relieved (with all symptoms disappearing after 1 week) and an erosive patch developed after blister rupture (Fig. 3).

At the end of treatment (days 3 to 5), erythema was present in 100% of BCCs and erosions and bulla were present in 85% of the cases. LSRs lasted about 2 weeks and we observed almost complete resolution after 5 weeks from treatment initiation. No systemic features as headache or malaise were reported.

Overall, this study showed that 10/16 (62.5%) patients were in complete remission after 2 years of follow-up. LSRs started the first day of treatment but resolved almost completely after 5 weeks.



Figure 2. Local skin reaction after IMG treatment. (a) Nodular BCC in lower limbs. (b) Clinical reaction after 3 days from treatment initiation. Note the extending erythema with an important blister in the middle which produced severe pain to the patient. (c) Clinical appearance 30 days from treatment initiation (group 2). (d) Clinical appearance after 6 months of follow up; no evidence of recurrence was detected but a residual hiperpigmentation and a scar were observed.

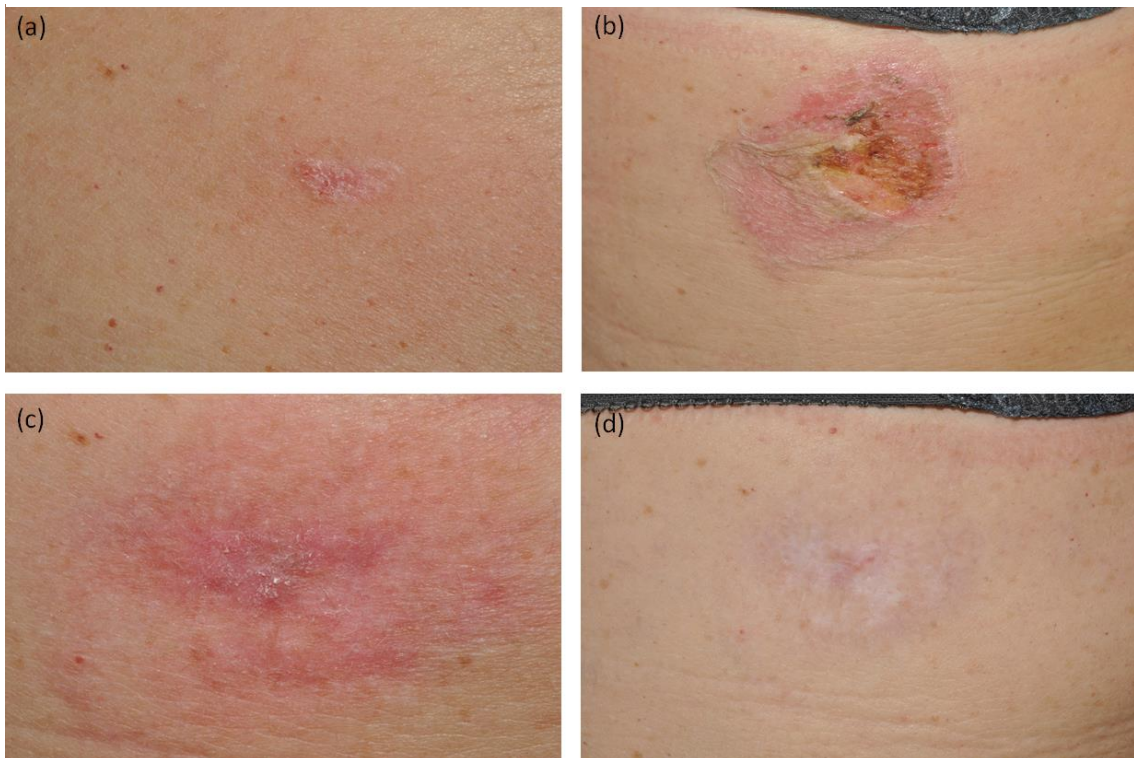


Figure 3. Follow up of a patient treated with IMG. (a) Superficial BCC in the back at baseline. (b) An erosive patch after blister rupture was observed 10 days after treatment. (c) Residual erythema after 2 months of treatment initiation. (d) Residual scar after 6 months of follow up.

Histopathology

An important epithelial and superficial dermal necrosis was observed in biopsies taken from Group 1 accompanied by an important inflammatory cell infiltration mainly composed of polymorphonuclear (PMN) cells (Fig. 4) and some mononuclear cells. Necrosis and inflammatory infiltrate gradually decreased over time. In biopsies taken at day 30 after treatment initiation (Group 2) necrosis degree and inflammatory infiltrate were lower than in Group 1, and necrosis was replaced by fibrosis although a mild-moderate mononuclear cell infiltration was still evident in most of the samples (Fig. 4).

Immunohistochemistry

After treatment administration (early immune response; group 1) there was a high recruitment of inflammatory innate immune cells. In addition to neutrophils, an increase of macrophages (CD68; $p=0.03$ compared to control) and natural killer cells (NK; CD56) was observed. This recruitment gradually decreased over time (Fig 5, 6).

Regarding the adaptive immune response, a similar pattern was observed. A high increase of CD3+ cells was observed at early timepoints ($p=0.013$ compared to control), mainly composed by cytotoxic CD8+ and CD4+ T cells ($p=0.16$ and $p=0.016$

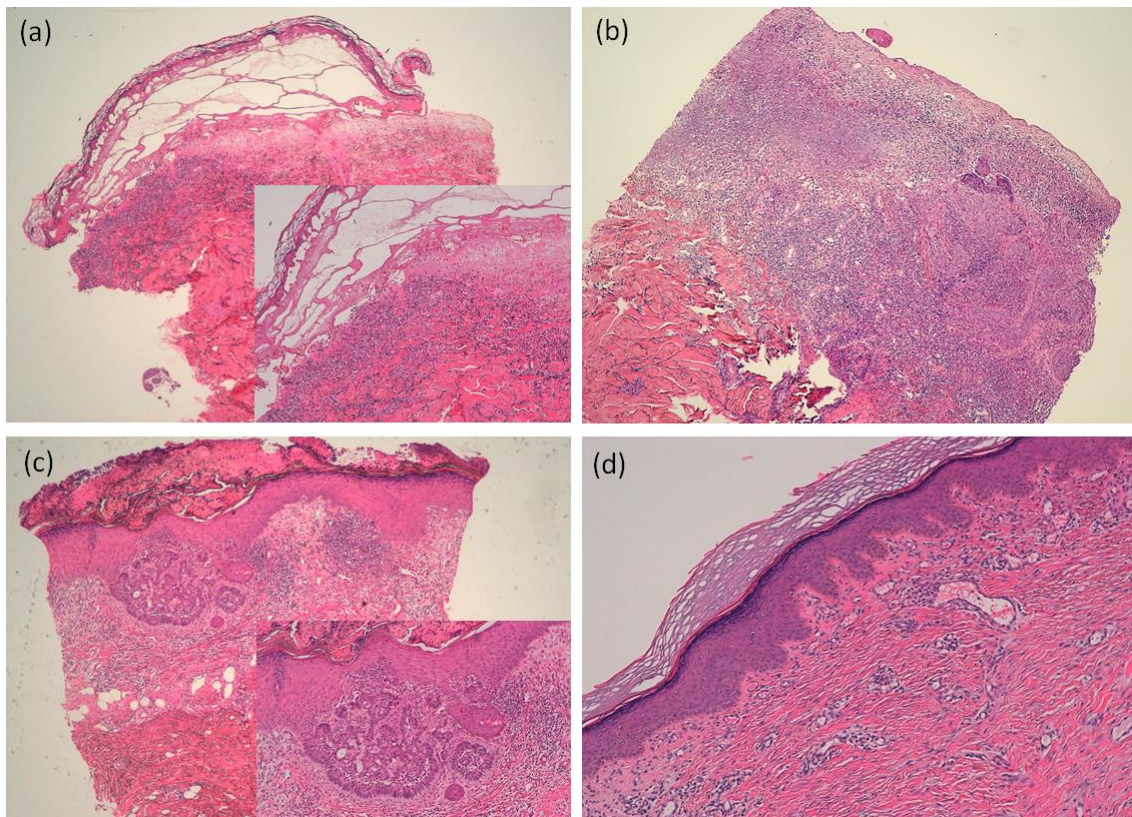


Figure 4. Different degrees of necrosis were observed according to the timepoint when biopsies were collected. (a,b) Relevant epidermal and dermal necrosis appearing in certain areas reaching the middle dermis after 3 days from treatment initiation with IMG were observed. Image (a) emphasizes a huge sub-epidermal blister while image (b) emphasizes the intense neutrophilic infiltrate accompanied by an important inflammatory cell infiltration mainly composed by polymorphonuclear cells. (c) Reduction of necrosis and the intensity of the immune cell infiltration were observed 10 days after treatment initiation with IMG. Some tumor areas were still present. (d) Day 30 post-treatment biopsy. A residual immune cell infiltration and fibrosis tissue were observed. Original magnification: (a,b,c) Hematoxylin and eosin (4X); (d) Hematoxylin and eosin (10X).

respectively compared to control). T cell recruitment also decreased over time, but while CD4+ T cells returned to control levels at day 30 after treatment initiation (group 2), residual presence of CD8+ T cells was observed although not statistically significant. These results suggest that some cytotoxic activity was present at the BCC zone at late timepoints considering the presence of CD8+ T cells and NK (CD56+) within the infiltrate. Moreover, remaining expression of TIA-1 (cytotoxic marker) was also observed.

Reduction of T-cell recruitment in the late immune response coincided with a high presence of regulatory T cells (Tregs); FoxP3+ *in situ* cells. This subpopulation suppresses effector T cells activity (CD4+ and CD8+). There was also some B-cell recruitment

(CD20) possibly induced later in the immune response cascade compared with effector T-cell recruitment and remaining for longer time. Although this tendency, presence of both cell subtypes is not statistically significant (data not shown; Fig. 6).

Regarding apoptotic markers, we observe a high expression of active caspase 3 and granzyme B at early timepoints ($p=0.13$ and $p=0.06$ respectively compared to control) whereas the transcription factor Bcl-2, inducing an antiapoptotic protein, decreased gradually until day 30 after treatment initiation (group 2), reaching lower levels than in control samples. This apoptosis might be induced to stop the immune response from all recruited inflammatory cells once the tumor is cleared. (Fig. 5, 6).

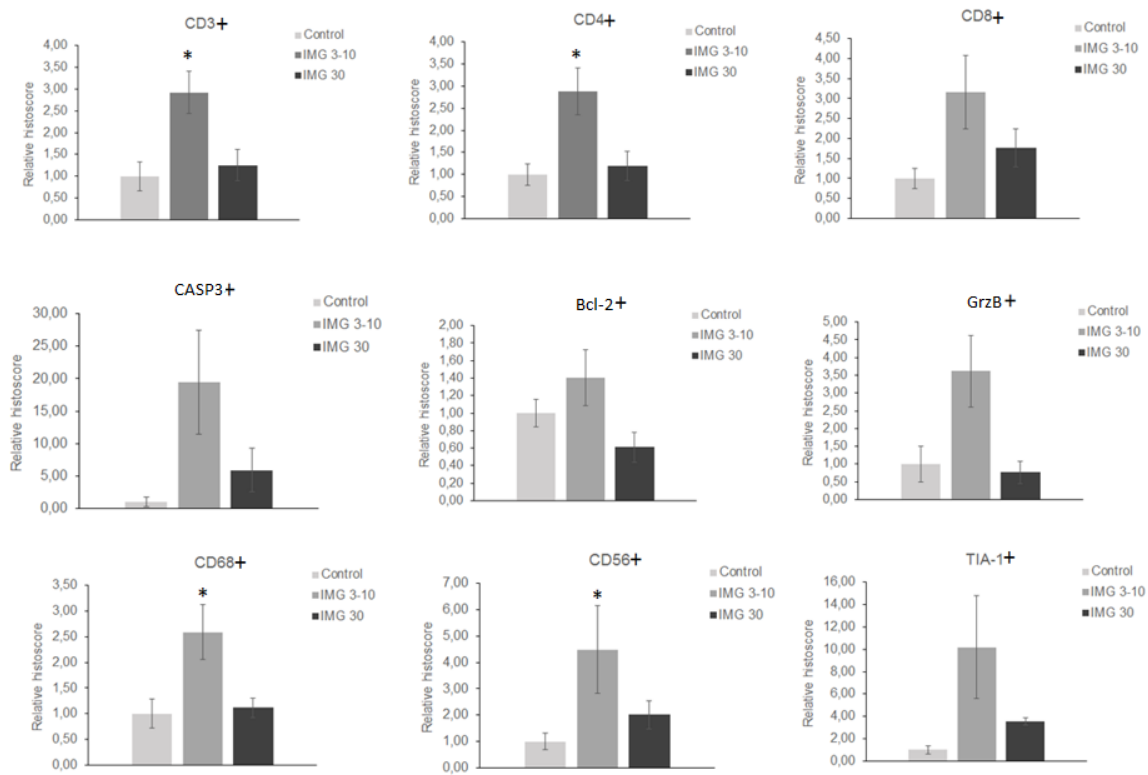


Figure 5. Bar chart with the results of all analyzed markers. ANOVA statistical test, * =P<0.05.

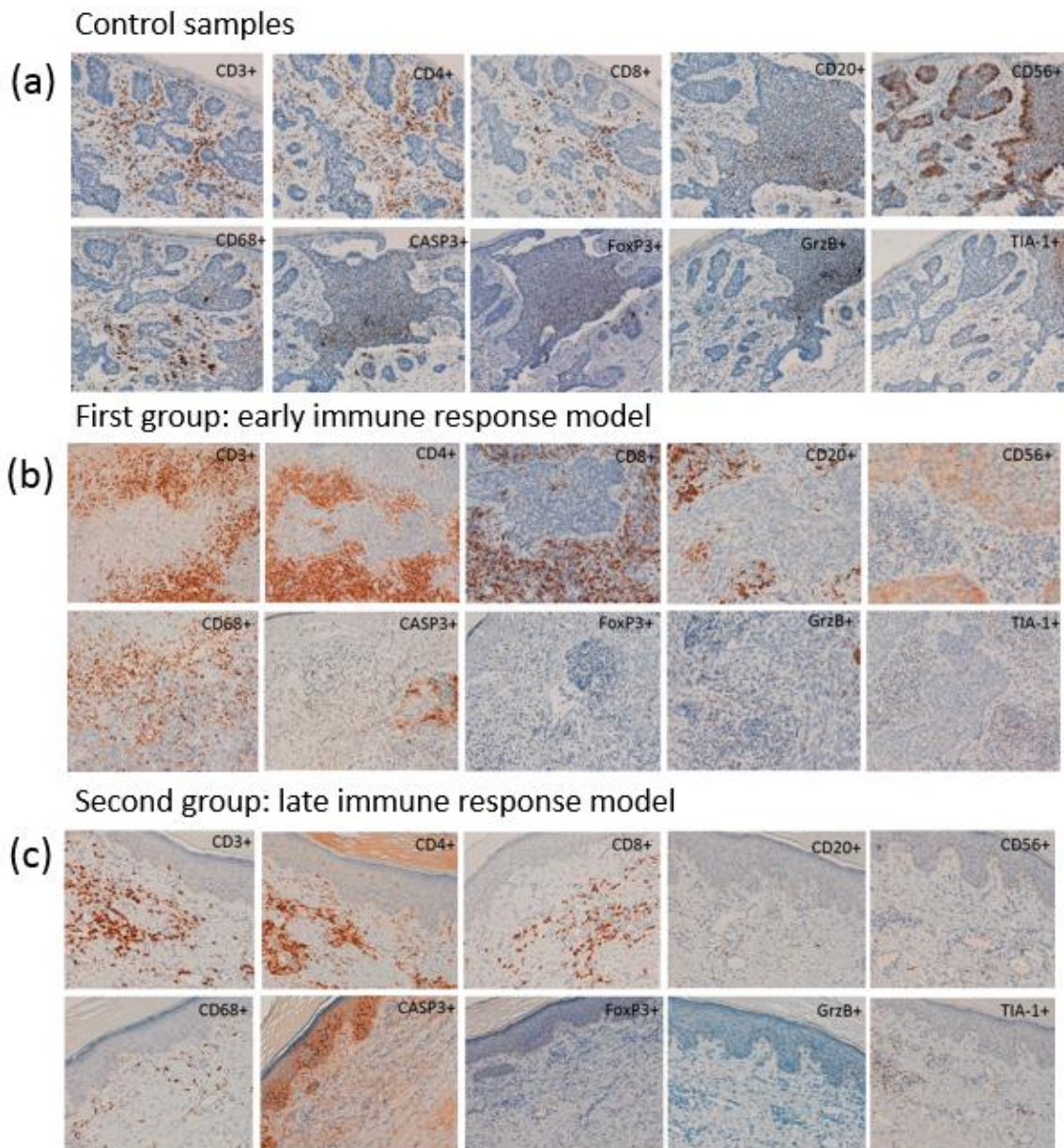


Figure 6. Immunohistochemistry results in the control samples and in the different groups. (a) Control samples. (b) Group 1(early immune response). (c) Group 2 (late immune response).

DISCUSSION

The incidence of non-melanoma skin cancers is undergoing a drastic global increase. The continuous search for non-invasive treatments has encouraged the development of new therapeutic agents. An understanding of the history, mechanism of action, and recent trial evidence for emerging therapies may help physicians in counseling patients on available treatment options and to select the appropriate therapy^{7,8}.

In this study we demonstrated the efficacy of IMG 0.05% in BCC under occlusion, especially for the superficial subtype, where 80% of the cases achieved complete remission and maintained this response after 2 years of follow-up.

Published clinical trials where sBCC were treated with IMG show similar or lower responses rates: in a phase II randomized study, 60 patients with sBCC were placed on varying dosing regimens and concentrations of either IMG or the gel vehicle. Significant

histologic clearance at 85 days post-treatment was observed in 63% of patients when 0.05% IMG was applied for two consecutive days ($p < 0.031$)⁵. In a phase I/II clinical study, 82% of patients who failed or refused conventional treatment for sBCC achieved a complete clinical response one month after *Euphorbia peplus* treatment and 57% continued after a mean follow-up of 15 months⁶.

Safety profile in those trials was favorable with mild to moderate adverse events including erythema, flaking, scaling, erosion, and ulceration. LSRs appeared to be dose-dependent and developed rapidly after application (within the first day), peaked in severity shortly after the end of the treatment (one week) and returned to near baseline levels within two weeks⁵.

There are also some other case reports⁷ and short patient series with BCC, treated with different IMG posology (0.015 or 0.05%), time length and number of cycles with complete clearance outcomes⁵⁻¹⁰.

The main difference between our study and those reported in the literature is the use of IMG under occlusion; it may be the reason why we obtained higher rates of complete response in sBCC. High efficacy of IMG 0.05% under occlusion has already been shown in a short series (n=7) where patients with sBCC in the trunk achieved complete response within 2 to 4 weeks¹⁰.

Apart from sBCC cases, our study included other BCC subtypes (superficial, nodular or infiltrating histological subtypes). The results indicate that 2/5 (40%) nodular BCC resolved whereas none (0/1; 0%) of the infiltrative BCC had a successful response. We may conclude that IMG under occlusion was more efficacious in treating sBCC rather than other subtypes despite the limitation of

having collected very low number of lesions. To our knowledge there is not much evidence of nodular or infiltrative BCCs treated with IMG reported in the literature. More studies should be done in order to reach stronger conclusions about the use of IMG in those BCC subtypes. Overall, our study showed that 10/16 (62.5%) of patients obtained complete remission after treatment.

We would like to highlight that 2/5 patients that were withdrawn from the study due to incorrect treatment compliance, had tumor residues confirmed by biopsy. However, some weeks later, when those skin lesions were about to be removed by surgery, no tumor was detected at that time. In some cases, the immune system may take longer to completely destroy the tumor since patients that were considered as non-complete responders actually were complete responders. We hypothesize that this finding may correlate with our observation that some cytotoxic cells remained at the tumor site even 30 days after treatment initiation, meaning that some cytotoxic activity may be present at the late immune response timepoint, even after LSRs resolution.

Regarding safety, we observed remarkable adverse events in 10/16 (62.5%) of the patients. Erythema and blister formation started within the first day of treatment and an extensive necrosis was present at day 3 after treatment initiation concurring with a high inflammatory response. IMG produces a non-specific epidermal and superficial dermal necrosis at the very beginning leading to a release of the cytosolic components within the tumor site, acting as antigens triggering the activation of both the innate and the adaptive immune responses. This papillar dermal necrosis produced by occlusive treatment may be responsible for scarring in some patients and might also be

the reason why we observed longer duration of LSRs in our patients compared to other studies found in the literature. It is also important to notice that 6 patients with medium or low LSR score did not show tumor regression, suggesting that an incomplete immune response is unable to induce tumor clearance.

Regarding cell recruitment at tumor site, in terms of innate response we observed a high neutrophilic infiltration (PMN) reinforced by macrophages ($p=0.03$) and NK cells (even if not statistically significant).

In terms of adaptive immune response, we observed an important recruitment of T-cells (lymphocytes): CD4+ ($p=0.016$) and CD8+ (non statistically significant) at early timepoints. Interestingly, CD4+ T cells return to control levels whereas the recruitment of NK cells, CD8+ T cells, and the presence of TIA-1 show that some cytotoxic activity may remain within the tumor site at late immune response timepoints.

There is also a high expression of active caspase 3 and granzyme B at early timepoints (10 days after treatment initiation; data not shown), at the same time when we observed an increase of Tregs cells; a T-cell subpopulation able to downregulate and suppress T effector cells by several mechanisms, including apoptosis. The real mechanism of action of Tregs cells has not been fully elucidated¹⁴, but Tregs cells may induce the apoptotic activity to decrease the recruitment and activity of T effector cells (CD4+ and CD8+) as we observe.

Similar results were obtained in a phase I randomized trial in which 26 patients with actinic keratosis were treated with IMG 0.05%. One day after treatment initiation, inflammatory cell infiltration was dominated by CD4+ and CD8+ T cells as well as

neutrophils and macrophages within both dermis and epidermis. Fewer changes were observed for CD20+ B-cells which might be produced later, as we observed in our study. Apoptosis (caspase 3) was also found at early timepoints after treatment.¹⁵

Overall, we found that ingenol mebutate gel was an effective drug to treat basal cell carcinoma, especially the superficial subtype. Necrosis reaction accompanied by both innate and adaptive immune cells recruitment mainly occurring at early response timepoints after treatment initiation may be responsible for the observed efficacy rates. Cytotoxic markers observed at late response timepoints may ensure complete response by destroying residual tumor cells. Further research about the ingenol mebutate mechanism of action needs to be done.

ACKNOWLEDGEMENTS

This was an investigator initiated study funded by LEO Pharma. The design of the study and analysis and interpretation of study results are exclusive responsibility of investigators. Work supported by IRBLleida Biobank (B.0000682) and PLATAFORMA BIOBANCOS (PT13/0010/0014). We would like to thank Lidia Rodriguez, Scientific Affairs LEO Pharma SA for support and medical writing.

REFERENCES

1. Trakatelli M, Morton C, Nagore E *et al*. BCC subcommittee of the Guidelines Committee of the European Dermatology Forum. Update of the European guidelines for basal cell carcinoma management. *Eur J Dermatol* 2014; 24: 312-29.
2. Clark CM, Furniss M, Mackay-Wiggan JM. Basal cell carcinoma: an evidence-based

- treatment update. *Am J Clin Dermatol* 2014; 15: 197-216.
3. Jansen MHE, Mosterd K, Arits AHMM, Roozeboom MH, Sommer A, Essers BAB. Five-year results of a randomized controlled trial comparing effectiveness of photodynamic therapy, topical imiquimod and topical 5-fluorouracil in patients with superficial basal cell carcinoma. *J Invest Dermatol* 2017; (Epub ahead of print)
 4. Cantisani C, Paolino G, Cantoresi F, Faina V, Richetta AG, Calvieri S. Superficial basal cell carcinoma successfully treated with ingenol mebutate gel 0,05%. *Dermatol Ther* 2014; 27: 352-4.
 5. Siller G, Rosen R, Freeman M, Welburn P, Katsamas J, Ogbourne SM. PEP005 (ingenol mebutate) gel for the topical treatment of superficial basal cell carcinoma: results of a randomized phase IIa trial. *Australas J Dermatol* 2010; 51: 99-105.
 6. Ramsay JR, Sunrbier A, Aylward JH *et al.* The sap from *Euphorbia peplus* is effective against human nonmelanoma skin cancers. *Br J Dermatol* 2011; 164: 633-6.
 7. Jung YS, Lee JH, Bae JM, Kim GM. Superficial Basal Cell Carcinoma Treated with Two Cycles of Ingenol Mebutate Gel 0,015. *Ann Dermatol* 2016; 258: 796-7.
 8. Diluvio L, Bavetta M, Di Prete M, Orlandi A, Bianchi L, Campione E. Dermoscopic monitoring of efficacy of ingenol mebutate in the treatment of pigmented and non-pigmented basal cell carcinomas. *Dermatol Ther* 2017; 2017 Jan; 30(1). doi: 10.1111/dth.12438. Epub 2016 Nov 12.
 9. Izzi S, Sorgi P, Piemonte P, Carbone A, Frascione P. Successfully treated superficial basal cell carcinomas with ingenol mebutate 0, 05% gel: Report of twenty cases. *Dermatol Ther* 2015; 29: 470-2.
 10. Bettencourt MS. Treatment of superficial basal cell carcinoma with ingenol mebutate gel, 0, 05%. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2016; 9: 205-9.
 11. Del Rosso JQ. Ingenol Mebutate Topical Gel A Status Report On Clinical Use Beyond Actinic Keratosis. *J Clin Aesthet Dermatol* 2016; 9:S3-S11.
 12. Hui A, Markowitz O. Ingenol mebutate for the treatment of actinic keratosis. *Curr Derm Rep* 2013; 2: 172–6.
 13. Rosen R, Marmur E, Anderson L, Welburn P, Katsamas J. A new, objective, quantitative scale for measuring local skin responses following topical actinic keratosis therapy with ingenol mebutate. *Dermatol Ther (Heidelb)* 2014; 4: 207-19.
 14. Yolcu ES, Ash S, Kaminitz A, Sagiv Y, Askenasy N, Yarkoni S. Apoptosis as a mechanism of T-regulatory cell homeostasis and suppression. *Immunol Cell Biol* 2008; 86: 650-8.
 15. Emmert S, Haenssle HA, Zibert JR *et al.* Tumor-Preferential Induction of Immune Responses and Epidermal Cell Death in Actinic Keratoses by Ingenol Mebutate. *PLoS One* 2016; 11:e0160096.

ARCHIVOS
CLÍNICOS en
**Carcinoma
basocelular**

LOCALMENTE AVANZADO
O METASTÁSICO

1.2017

TRATAMIENTO INTERMITENTE CON VISMODEGIB. A PROPÓSITO DE UN CASO

María Reyes García de la Fuente^{1, 2}
Eugenia Ortega Izquierdo³

¹Servicio de Dermatología. Hospital Universitario Arnau de Vilanova. Lleida

²Instituto de Investigación Biomédica (IRB Lleida). Lleida

³Servicio de Oncología Médica. Hospital Universitario Arnau de Vilanova. Lleida

ANTECEDENTES

Paciente varón de 76 años de edad. Exfumador desde hacía 24 años, hipertenso, diabético y dislipémico, en tratamiento con enalapril-hidroclorotiazida, metformina, simvastatina y ácido acetilsalicílico. Como antecedente quirúrgico destacaba herniorrafia inguinal bilateral.

DIAGNÓSTICO

Carcinoma basocelular (CBC) localizado en región periorbitaria izquierda, recidivado tras múltiples cirugías y refractario al tratamiento con radioterapia.

TRATAMIENTO Y EVOLUCIÓN

Presentamos un paciente con larga historia de CBCs múltiples, que se remonta al año 1999. Los CBCs siempre habían afectado a la región periorbitaria izquierda, comprendiendo la sien, la región frontal y la mejilla ipsilateral, requiriendo más de 5 intervenciones quirúrgicas.

En junio de 2009 sufrió una recidiva tumoral en el canto interno del ojo izquierdo, que precisó nuevamente exéresis quirúrgica, resultando los márgenes afectados por la neoplasia. Ante esta situación, se decidió completar el tratamiento con radioterapia con dosis final de 54 Gy, sometiéndose a 27 sesiones.

El paciente se mantuvo libre de enfermedad hasta agosto de 2011, momento en que presenta recidiva clínica que requirió la enucleación del globo ocular izquierdo, con la confirmación histológica de CBC morfeiforme con infiltración perineural y perivascular, sin afectación ósea. Se realiza una ampliación de márgenes, quedando los bordes libres de neoplasia. En

noviembre de 2011 se vuelve a realizar radioterapia para completar tratamiento de una recidiva. En esta ocasión, se alcanza una dosis total de 50 Gy.

A pesar de la cirugía tan mutilante practicada y la administración de radioterapia complementaria, el paciente vuelve a presentar nueva recidiva tumoral en julio de 2012 en región supraciliar izquierda, que requiere nueva intervención quirúrgica, y en esta ocasión se desestima la administración de radioterapia, al haberse realizado en dos ocasiones, alcanzando dosis máximas. Más de un año después, en enero de 2014, el paciente presenta una nueva recidiva en puente nasal y en la zona superior del colgajo, que requiere nueva cirugía, con cobertura con un nuevo colgajo, pero con afectación de todos los márgenes, incluyendo el canto interno del ojo izquierdo y a nivel óseo sobre arco ciliar izquierdo. Se valora en comité de tumores cutáneos, desestimando nueva cirugía, por lo que se plantea tratamiento sistémico con vismodegib, pero al no estar todavía aprobado en España, inicia terapia de primera línea con carboplatino y paclitaxel, suspendiéndose tras primer ciclo por reacción anafiláctica severa y mala tolerancia, iniciando observación en abril de 2014. En este momento, el paciente no evidenciaba enfermedad medible ni lesión macroscópicamente visible.

En mayo de 2015, ante la presencia de múltiples lesiones cutáneas de CBC recidivado y confirmado mediante biopsia, se decide iniciar, el 22 de julio, tratamiento con vismodegib, previa aprobación por la Comisión de Farmacia, a dosis de 150 mg/día por vía oral (Fig.1).

El 21 de octubre de ese año, tras tres meses de tratamiento, el paciente ya pre-

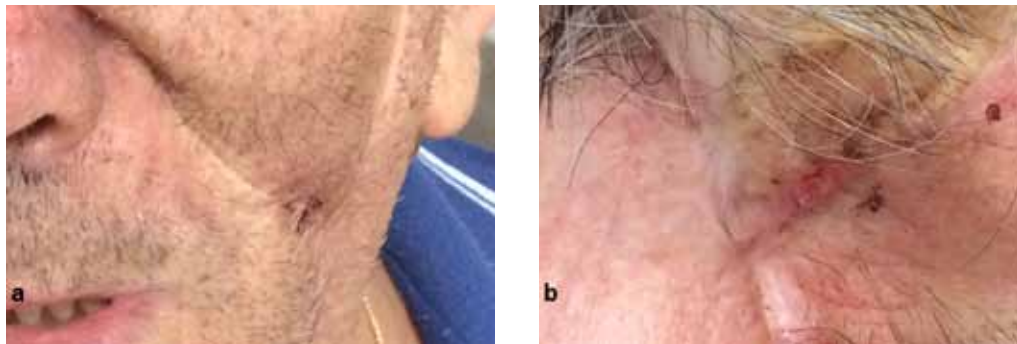


Figura 1. a) Obsérvese la lesión costrosa correspondiente a una de las recidivas clínicas que presentaba el paciente justo antes de iniciar tratamiento con vismodegib. b) Detalle de otra de las recidivas tumorales en la sien izquierda antes de iniciar el tratamiento

senta respuesta clínica completa pero el 2 de diciembre, en la visita de control se decide suspender el tratamiento con vismodegib por la pérdida de 12 kg de peso, probablemente secundario a la disgeusia producida por el fármaco. El paciente se mantiene en respuesta clínica completa sin vismodegib hasta que en febrero de 2016 se objetiva una nueva lesión en región temporal izquierda, confirmada mediante biopsia de CBC con focos esclerodermiformes (Fig. 2). Ante la recidiva tumoral, se reintroduce vismodegib el 2 de marzo y se cita a control en un mes, con analítica, que sorprendentemente muestra una alteración leucemoide antes no detectada, que no se relaciona con la administración del fármaco. El paciente es derivado a Hematología para su estudio y en el mes de mayo se decide suspender de nuevo vismodegib, tras dos meses y medio de tratamiento, en espera a los resultados del estudio hematológico y en vista de haber alcanzado respuesta clínica completa. Finalmente, el paciente es diagnosticado de un síndrome mieloproliferativo crónico, compatible con trombocitosis esencial forma mixta, e inicia trata-

miento con hidroxycarbamida y alopurinol. El tratamiento con el primer fármaco tuvo posteriormente que reducirse dosis por anemia y finalmente por intolerancia al mismo, cambiándose por anagrelida. El paciente vuelve a presentar recidiva tumoral, en esta ocasión a nivel de dorso nasal, región supraciliar y mejilla izquierda, confirmado histológicamente mediante biopsia por curetaje, con lo que se vuelve a reintroducir vismodegib el 6 de octubre de 2016, pero el 21 de diciembre se vuelve a suspender, tras dos meses y medio de tratamiento, por disgeusia G2 y astenia G2, presentando un ECOG 1, sin evidencia de progresión hasta 2 meses más tarde (febrero 2017) (Fig. 3).

DISCUSIÓN

Vismodegib se trata de la primera molécula comercializada, que actúa como un inhibidor oral y selectivo de la vía de señalización *Sonic hedgehog* al actuar sobre la proteína transmembrana *Smoothed* (Smo). Su indicación clínica sería el carcinoma basocelular localmente avanzado y metastásico y el CBC no tributario a radioterapia ni a cirugía (1).

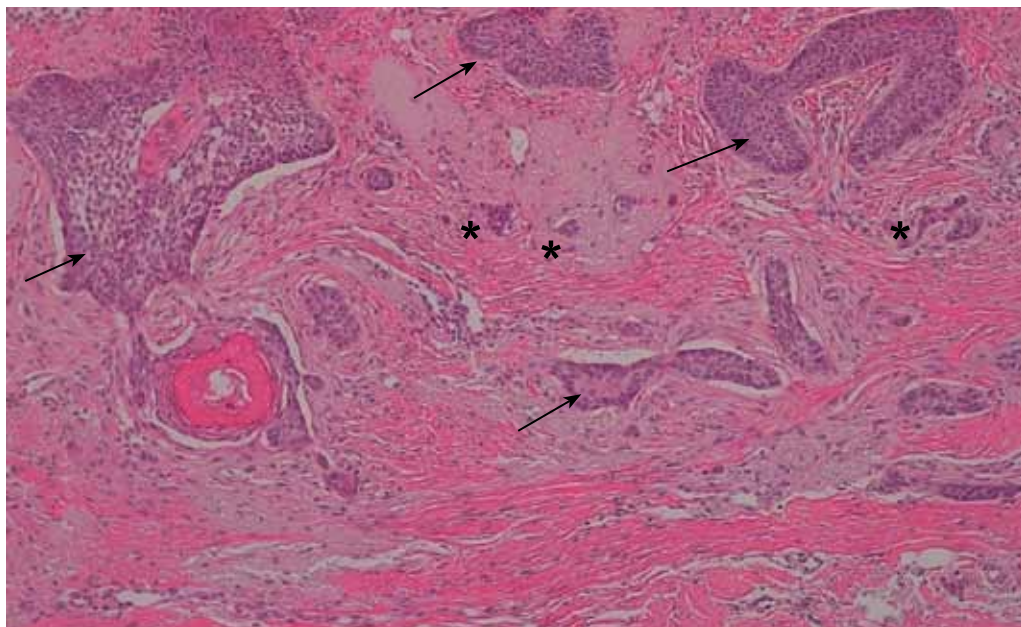


Figura 2. Imagen histológica de carcinoma basocelular recidivado, donde se aprecian los nidos tumorales de CBC (flechas) y los focos esclerodermiformes (asteriscos). HE10x



Figura 3. Imagen clínica del paciente sin evidencia de progresión hasta 2 meses más tarde, donde se observan las secuelas de las múltiples cirugías recibidas alrededor de la región periorbital izquierda que comportó la enucleación del globo ocular y la cobertura del defecto mediante colgajo local. Sin signos de recidivas clínicas.

El caso clínico presentado sería un claro ejemplo del uso de vismodegib en la indicación en la que está aprobado, ya que se trata de un CBC no reseccable y resistente

al tratamiento con radioterapia. Lo deseable hubiese sido haber tratado al paciente antes de practicarle una cirugía tan mutilante como constituye la enucleación del

globo ocular y no tener que administrarlo cuando el tumor está tan avanzado.

Antes de iniciar el tratamiento con vismodegib conviene conocer sus efectos secundarios y su manejo. Los efectos secundarios que se dan con mayor frecuencia son los espasmos musculares, la alopecia, la disgeusia, la pérdida de peso, la astenia, las náuseas y las diarreas (2). Prácticamente todos los pacientes que inician tratamiento con vismodegib desarrollarán alguno de estos efectos secundarios, aunque en la mayor parte de los casos no supondrá una situación de gravedad para el paciente. Por ejemplo, la alopecia como efecto secundario en un hombre mayor no nos preocupará desde el punto de vista médico; diferente sería en una mujer joven. Por otro lado, la disgeusia no representaría un efecto secundario que ponga en peligro la vida del paciente pero sí que deteriora su calidad de vida, y consecuentemente puede conducir a una pérdida ponderal, como le sucedió a nuestro paciente. Los espasmos musculares tampoco constituyen gravedad, pero incomodan al paciente al no disponer de ningún tratamiento eficaz, y más cuando hablamos de un tratamiento continuo y a largo plazo, al tratarse de una enfermedad de larga evolución. Todos los efectos secundarios nombrados son reversibles tras la suspensión del tratamiento, y actualmente la interrupción temporal es la única recomendación eficaz, ya que no es posible la reducción de dosis al tratarse de cápsulas, sin ser válida su administración a días alternos, ya que las concentraciones óptimas del fármaco se consiguen con su administración diaria.

La suspensión del fármaco es una opción a tomar cuando se consigue respuesta

clínica completa. Sin embargo, cuando la interrupción de vismodegib no es factible porque todavía no se ha conseguido el resultado esperado, se puede realizar tratamiento sintomático de los efectos secundarios. Por ejemplo, ante los espasmos musculares grados 1-2 se pueden utilizar tratamientos como antagonistas de calcio, estabilizadores nerviosos, magnesio, lidocaína, vitamina B, naftidrofuril, ciclobenzaprina (2).

En nuestro caso, el paciente desarrolló disgeusia, que aun no siendo un efecto secundario preocupante médicamente, para el paciente fue angustioso, ocasionándole una pérdida ponderal de 12 kg, motivo principal por el cual se suspendió el tratamiento en la primera ocasión. Como era de esperar, el gusto lo recobró a las pocas semanas de la suspensión del tratamiento y durante un periodo de tres meses el paciente estuvo libre de enfermedad. Es cierto que presentó recurrencias clínicas a los pocos meses de haber dejado el fármaco y fue justo en ese momento cuando se volvió a reintroducir vismodegib, con respuesta clínica completa.

Es importante resaltar este punto, a pesar de suspender el tratamiento y reintroducirlo según recurrencias del paciente, nunca se desarrollaron resistencias al fármaco y siempre se obtuvo respuesta clínica al poco tiempo de reintroducir el mismo. La estrategia de suspender temporalmente el fármaco fue evaluada en un subanálisis del estudio de seguridad STEVIE (3), objetivando que la suspensión no comprometía ni supervivencia libre de progresión ni tasa de respuestas, probablemente porque se trata de una enfermedad que evoluciona lentamente

y el fármaco vuelve a actuar cuando se reintroduce.

Vale la pena comentar que el paciente desarrolló un síndrome mieloproliferativo crónico, consistente en una trombocitosis esencial durante el periodo pautado con vismodegib. Durante el estudio hematológico, se decidió suspender el tratamiento con el fármaco, al haber alcanzado respuesta clínica plena, en espera de que se completasen todas las pruebas pendientes por parte de Hematología, como medida cautelar.

La trombocitosis esencial no se puede considerar secundaria a la administración de vismodegib y el paciente lo habría desarrollado igualmente sin haberle sometido al tratamiento.

Por otra parte, nos gustaría comentar que tampoco observamos la aparición de ninguna lesión cutánea que se correspondiera con carcinoma escamoso, ni con ningún otro tipo de cáncer cutáneo no melanoma. Gran parte de las recurrencias clínicas que presentó el paciente fueron biopsiadas y se confirmaron las recidivas de CBC mediante estudio histológico convencional. Resaltamos este aspecto debido a un estudio realizado, donde los autores comentaban que los pacientes en tratamiento con vismodegib, o que habían recibido terapia, tenían mayor riesgo de padecer carcinoma escamoso (4).

Nosotros no hemos reportado la aparición de otros cánceres cutáneos en nuestro paciente. Con posterioridad, se ha publicado un nuevo trabajo en la misma revista, donde evidencian que el diseño del trabajo anterior era erróneo y que a través de dicho estudio no se podía llegar a dicha conclusión (5).

En cualquier caso, las vías moleculares involucradas en el CBC y en el carcinoma escamoso son diferentes y no existe relación entre ambas.

CONCLUSIONES

Vismodegib es una herramienta más para tratar el CBC con la que podemos contar actualmente. Especialmente útil para aquellos pacientes que presentan fracaso a la radioterapia o al tratamiento quirúrgico. Se podría plantear como primera opción terapéutica en aquellos tumores irreseccables o que requieran cirugías mutilantes que afecten a órganos sensoriales, como fue el caso de nuestro paciente. Las ventajas de vismodegib son la fácil administración, un comprimido al día por vía oral en el domicilio del paciente, la presentación de efectos secundarios por lo general leves y reversibles tras la suspensión del fármaco y la ausencia de resistencias tras la reanudación del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ficha Técnica Erivedge.
2. Lacouture ME, Dréno B, Ascierto PA, Dummer R, Basset-Seguín N, Fife K et al. Characterization and Management of Hedgehog Pathway Inhibitor-Related Adverse Events in Patients with advanced Basal cell carcinoma. *Oncologist* 2016; 21: 1218-1229.
3. Dummer R, Basset-Seguín N, Hansson J, Grob JJ, Kunstfeld R, Dréno B et al. Impact of treatment breaks on vismodegib patient outcomes: Exploratory analysis of the STEVIE study. *J Clin Oncol* 33, 2015 (suppl; abstr 9024).
4. Mohan SV, Chang J, Li S, Henry AS, Wood DJ, Chang AL. Increased risk of cutaneous squamous cell carcinoma after vismodegib therapy for basal cell carcinoma. *JAMA Dermatol.* 2016;152:527-32.
5. Puig S, Sampogna F, Tejera-Vaquero A. Study on the risk of cutaneous squamous cell carcinoma after vismodegib therapy for basal cell carcinoma: Not a case-control study. *JAMA Dermatol.* 2016;152: 1172-1173.