

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

Caracterización de células mieloides supresoras (MDSCs) en pacientes con melanoma metastático.

TRABAJO FIN DE GRADO

ALUMNA: GLORIA CARRUANA SALAS

TUTOR: RAFAEL SIRERA PÉREZ

COTUTORAS: ELOÍSA JANTUS LEWINTRE Y SILVIA CALABUIG FARIÑAS

Grado en Biotecnología

Curso 2018-2019

Tipo de licencia: *Creative Commons*

VALENCIA, Julio de 2019

TÍTULO: Caracterización de células mieloides supresoras (MDSCs) en pacientes con melanoma metastático.

RESUMEN:

El melanoma es una neoplasia originada en los melanocitos curable durante la etapa inicial pero que, sin tratamiento, es de rápido avance, pudiendo provocar metástasis. Normalmente, el melanoma se diagnostica en etapas tempranas, por lo que la escisión quirúrgica representa el tratamiento de elección. Sin embargo, aproximadamente el 10% de los casos de melanoma se diagnostican en una etapa avanzada, y no son resecables o ya son metastásicos. Es para estos pacientes para los que actualmente se recurre a las terapias antitumorales dirigidas molecularmente o bien a la inmunoterapia. Asimismo, diversos estudios sobre el melanoma confirman que el microambiente tumoral es un elemento clave en el pronóstico del paciente y una posible diana sobre la que dirigir los tratamientos. Es por esto por lo que en el presente proyecto se caracterizan células mieloides supresoras (MDSCs), en concreto, macrófagos, presentes en el microambiente de muestras de melanoma metastático.

Los macrófagos se caracterizan por su elevada plasticidad dependiente de las señales del ambiente externo y pueden modificar su metabolismo o bien para promover la cicatrización/crecimiento (macrófagos M2/antiinflamatorios), o bien para la inhibición/muerte (macrófagos M1/proinflamatorios). Generalmente, la presencia macrofágica en el melanoma está asociada a un mal pronóstico puesto que los macrófagos asociados al tumor (TAM), generalmente con fenotipo M2, participan fomentando el crecimiento del tumor, así como suprimiendo la actuación del sistema inmune en este.

Este estudio se basa en el ensayo mediante inmunohistoquímica (IHC) y PCR cuantitativa (qPCR) de 30 muestras de pacientes con melanoma metastático. Así pues, se estudia la presencia de 8 marcadores característicos del fenotipo antiinflamatorio de los macrófagos: ARNT2, CCL19, CD163L1, ADGRE1, RGS16, SOCS2, MMP12 y BMP6, usando como marcador característico para la identificación de infiltrado monocitario por IHC el CD68, y para el análisis de la expresión relativa por qPCR, el housekeeping *GAPDH* y un cDNA de referencia comercial.

La evaluación de las muestras por IHC permitió conocer que la regulación positiva en células tumorales de las moléculas BMP6, CCL19 y MMP12, así como la reducida expresión de ARNT2, RGS16 y SOCS2, caracterizaba las muestras de estudio. Asimismo, se confirmó que ADGRE1 seguido de CD163L1 son los marcadores para macrófagos más específicos de todos los estudiados. Por otro lado, el estudio por qPCR demostró que los genes *CCL19* y *ADGRE1* presentaban una expresión relativa incrementada, mientras que *RGS16* mostraba infraexpresión en las muestras evaluadas. El estudio de las posibles correlaciones de los marcadores en las células tumorales demostró nuevos patrones de asociación hasta el momento no reportados, mientras que el estudio de las correlaciones en macrófagos corroboró el perfil de coexpresión esperado por tratarse de marcadores de macrófagos antiinflamatorios.

Con todo ello, este estudio demuestra el alto contenido monocitario presente en muestras de melanoma metastático, así como la expresión de los marcadores evaluados no sólo en macrófagos, sino también en células tumorales, indicando, por tanto, el alto potencial de estos como posibles dianas terapéuticas para el tratamiento del melanoma.

PALABRAS CLAVE: melanoma, metástasis, microambiente tumoral, macrófagos, inmunohistoquímica, PCR cuantitativa.

AUTORA: Gloria Carruana Salas.

LOCALIDAD Y FECHA: Valencia, Julio de 2019.

TUTORES ACADÉMICOS: Rafael Sirera Pérez y Eloísa Jantus Lewintre.

TUTOR/A INSTITUCIÓN: Rafael Sirera Pérez.

TIPO DE LICENCIA: *Creative Commons*.

TITLE: Characterization of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in patients with metastatic melanoma.

SUMMARY:

Melanoma is a neoplasm originated in melanocytes which can be curable at initial stages but, without treatment, it has a rapid progression, being able to cause metastasis. Usually, melanoma is diagnosed at early stages, therefore surgical excision represents the treatment of choice. However, approximately 10% of melanoma cases are diagnosed at an advanced stage and are not resectable or they are metastatic. Nowadays, for this type of patients, is common to use molecularly directed antitumor therapies or immunotherapy. Moreover, studies on melanoma confirm that tumor microenvironment is a key element in the study of patient's prognosis and a possible target to direct treatments for immunostimulation and removal of this tumor. That is why the present project characterizes myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), specifically, macrophages, present in the tumor microenvironment of melanoma samples.

Macrophages are characterized by their high plasticity dependent on signals from the external environment and may also modify their metabolism either promote healing/growth (M2 macrophages/anti-inflammatory), or inhibition/death (M1 macrophages/pro-inflammatory). Generally, presence of macrophages in melanoma is associated with poor prognosis due to tumor-associated macrophages (TAM), which generally have an M2-type phenotype, join in some ways to promote tumor growth, as well as suppressing immune system on it.

This study is based on immunohistochemistry (IHC) and real-time quantitative PCR (qPCR) assay of 30 samples from patients with metastatic melanoma. Thus, we studied the presence of 8 characteristic markers of anti-inflammatory phenotype of macrophages: ARNT2, CCL19, CD163L1, ADGRE1, RGS16, SOCS2, MMP12 and BMP6, using CD68 as a marker for IHC assay for the identification of monocytic infiltrate, and the housekeeping *GAPDH* and a commercial reference cDNA for the analysis of relative expression by qPCR.

IHC analysis showed us that our samples were characterized by the upregulation of BMP6, CCL19 and MMP12 molecules, as well as downregulation of ARNT2, RGS16 and SOCS2 in tumor cells. Likewise, it was confirmed that ADGRE1 followed by CD163L1 are the most specific markers for macrophages among the studied. On the other hand, qPCR analysis showed that *CCL19* and *ADGRE1* genes were overexpressed, whereas *RGS16* was underexpressed in the samples evaluated. The study of markers correlations in tumor cells showed new patterns of association so far not reported, while the study of gene correlations on macrophages corroborated the expected coexpression profile for being markers of anti-inflammatory macrophages.

Therefore, this study shows the high monocyte content present in metastatic melanoma samples as well as the expression of the evaluated markers not only in macrophages, but also in tumor cells, showing the high potential of these as possible therapeutic targets for the treatment of melanoma.

KEY WORDS: melanoma, metastasis, immunotherapy, tumor microenvironment, macrophages, immunohistochemistry, quantitative PCR.

AUTHOR: Gloria Carruana Salas.

LOCATION AND DATE: Valencia, Julio de 2019.

ACADEMIC SUPERVISORS: Rafael Sirera Pérez y Eloísa Jantus Lewintre.

INSTITUTION SUPERVISOR: Rafael Sirera Pérez.

LICENSE: *Creative Commons*.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría dar las gracias a todas las personas y entidades que han hecho posible la realización de este Trabajo Fin de Grado.

En primer lugar, agradecer la oportunidad brindada por la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV) para desarrollar el proyecto. En esta línea, quería destacar:

A mis tutores y cotutores en el centro de investigación, el Dr. Rafael Sirera, la Dra. Silvia Calabuig y la Dra. Eloísa Jantus por el apoyo prestado para conseguir que este trabajo salga adelante de la mejor forma posible.

A todos mis compañeros de laboratorio por la ayuda y apoyo recibido, en especial a Sandra Gallach y Andrea Moreno, por su disponibilidad y por haber resuelto cada una de mis dudas.

A Sandra Mínguez, por ayudarme con la inmunohistoquímica y por ser siempre tan atenta y comprensiva conmigo.

A M^a del Mar, por hacer el día a día más ameno y dulce con sus palmeritas de chocolate.

Al Dr. Víctor Alegre por el apoyo, comprensión y confianza prestada desde el primer momento en el que comencé el recuento celular en su departamento.

Al Dr. Cristian Valenzuela dado que, sin su ayuda, la laboriosa identificación de esas pequeñas y escondidas células no habría sido posible.

Al Dr. Ángel Luís Corbí, quién nos ha proporcionado los anticuerpos empleados en este estudio, y cuyas aportaciones en la materia han sido fundamentales para comprender los resultados obtenidos.

Asimismo, me gustaría también agradecer a la Universitat Politècnica de València por concederme la oportunidad de realizar este Trabajo Fin de Grado con la beca de Colaboración en el departamento de Biotecnología.

Dar las gracias a todos mis amigos por el ánimo y la comprensión que siempre me han prestado, por los momentos de distensión y por las tardes comentando los más y los menos de nuestros trabajos que, finalmente, todos hemos completado satisfactoriamente.

Por último y en especial a mi familia y pareja, a vosotros por saber escucharme, entenderme, apoyarme, animarme y siempre, siempre, hacerme entender que las cosas son así porque tienen que ser así, porque “Bien o mal, mal o bien, ¿quién sabe?”. Os quiero.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CONCEPTO DE TUMOR	1
1.2 MELANOMA: CONCEPTO E INCIDENCIA	2
1.3 TRATAMIENTOS	2
1.3.1 DACARBAZINA, IFN- α e IL-2.....	2
1.3.2 TERAPIA ANTITUMORAL DIRIGIDA.....	3
1.3.3 INMUNOTERAPIA	5
1.4 CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS	6
1.5 MACRÓFAGOS	7
1.5.1 CONCEPTO.....	7
1.5.2 FENOTIPOS FUNCIONALES DE LOS MACRÓFAGOS	7
1.5.3 MACRÓFAGOS EN MELANOMA	8
1.5.4 MARCADORES EN MACRÓFAGOS	8
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 COHORTE DE MUESTRAS	12
3.2 TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA	12
3.3 INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC)	12
3.4 ANÁLISIS DE IMAGEN	13
3.5 EXTRACCIÓN DE RNA	14
3.6 ANÁLISIS DE LA INTEGRIDAD DEL RNA	15
3.7 RETROTRANSCRIPCIÓN	15
3.8 PCR CUANTITATIVA (qPCR)	16
3.8.1 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA	17
3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	18
3.10 ANÁLISIS <i>IN SILICO</i>	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA COHORTE	19
4.2 ANÁLISIS DE LOS MARCADORES POR IHC	19
4.2.1 ARNT2.....	20
4.2.2 BMP6	21
4.2.3 CD163L1	22
4.2.4 ADGRE1 (F4/80).....	22
4.2.5 CCL19.....	23

4.2.6 MMP12	24
4.2.7 RGS16	24
4.2.8 SOCS2	25
4.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA	26
4.3.1 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA	26
4.3.2 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL RNA	27
4.3.3 EFICIENCIAS Y LINEALIDAD	27
4.3.4 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA	28
4.4 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE EXPRESIÓN	29
4.4.1 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES POR qPCR	29
4.4.2 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES POR IHC	30
4.4.3 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES POR qPCR E IHC	32
5. CONCLUSIONES	33
6. REFERENCIAS	34
7. ANEXOS	41
ANEXO I. FIGURAS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS	41
ANEXO II. REVELADO IHC CON POLÍMERO MARCADO CON PEROXIDASA	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hallmarks del cáncer.	1
Figura 2. Representación de los puntos de control inmunitarios en las respectivas células.	5
Figura 3. Estadios de diferenciación de células mieloides supresoras (MDSCs).....	7
Figura 4. Contaje de 100 células tumorales, positivas (puntos rojos) y negativas (puntos verdes), en la muestra del paciente 18 para el marcador ADGRE1 a un aumento de 40X.	13
Figura 5. Contaje de 30 macrófagos, positivos (puntos rojos) y negativos (puntos verdes), en la muestra del paciente 18 para el marcador ADGRE1 a un aumento de 40X.	14
Figura 6. Descripción del ensayo qPCR basado en sonda TaqMan® MGB.....	16
Figura 7. Marcador CD68 en la muestra del paciente 22.	19
Figura 8. Marcador CD163L1 en células tumorales: (A) IRS 12 y (B) IRS 1.....	20
Figura 9. Marcador ADGRE1 en macrófagos: (A) IRS 16 y (B) IRS 3.	20
Figura 10. Electroferograma RNA total (A) y mRNA (B).....	27
Figura 11. Electroferograma del RNA del paciente 1 (A) y del paciente 7 (B).	27
Figura 12. Expresión relativa de los 4 genes analizados por qPCR.	28
Figura suplementaria 1. Secuencia de respuestas inmunes antimelanoma inducidas por dacarbazina (DTIC).....	41
Figura suplementaria 2. Cascada de señalización de MAPK.....	42
Figura suplementaria 3. Tinción H&E de una sección de muestra de piel del paciente 16.....	42
Figura suplementaria 4. Correlación génica <i>CCL19-RGS16</i> experimental.....	43
Figura suplementaria 5. Correlación génica <i>CCL19-CD163L1</i> experimental.....	43
Figura suplementaria 6. Correlación génica <i>CCL19-ADGRE1</i> experimental.....	44
Figura suplementaria 7. Correlación génica <i>RGS16-CD163L1</i> experimental.....	44
Figura suplementaria 8. Correlación génica <i>RGS16-ADGRE1</i> experimental.....	45
Figura suplementaria 9. Correlación génica <i>CD163L1-ADGRE1</i> experimental.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Criterio clasificación por intensidad de tinción (A) y por porcentajes celulares (B).	14
Tabla 2. Programa de temperaturas y tiempos para la retrotranscripción.	16
Tabla 3. Programa de temperaturas de la qPCR.	17
Tabla 4. Genes analizados en este estudio y sus sondas Taqman® usadas para la qPCR.	17
Tabla 5. Eficiencias para las sondas Taqman usadas en este estudio	27
Tabla 6. Valores p-value para los 4 marcadores analizados por qPCR con el estadístico Spearman.	29
Tabla 7. Valores p-value para los 8 marcadores analizados por IHC con el estadístico Spearman en células tumorales.	30
Tabla 8. Valores p-value para los 8 marcadores analizados por IHC con el estadístico Spearman en macrófagos.	31
Tabla 9. Valores p-value para los 4 marcadores analizados por qPCR y IHC con el.	32
Tabla suplementaria 1. Características de los anticuerpos empleados en inmunohistoquímica.	46
Tabla suplementaria 2. Características clinicopatológicas de los pacientes incluidos en el estudio.	46

ABREVIATURAS

ACTB: *Actin beta*
ADGRE1: *Adhesion G protein-coupled receptor E1*
AHR: *Aryl Hydrocarbon Receptor*
APC: Célula presentadora de antígeno
ARNT: *Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*
bHLH-PAS: *Basic helix–loop–helix-PER-ARNT-SIM*
BMP: Proteína morfogenética ósea
BSA: Albúmina de suero bovino
CCL: *C-C Motif Chemokine Ligand*
CCR7: *C-C chemokine receptor type 7*
CD163L1: *CD163 Molecule Like 1*
CD28: *Cluster of differentiation 28*
CD68: *Cluster of differentiation 68*
CDKN1B: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario
CLEC5A: *C-Type Lectin Domain Family 5 member A*
COX-2: Ciclooxygenasa-2
CR: *Complete Remission*
Ct: *Cycle threshold*
CTLA-4: Antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico
DAB: Diaminobenzidina
DAMP: Patrones moleculares asociados al daño
DC: Células dendríticas
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNasa: Desoxirribonucleasa
dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato
DTIC: Dacarbazina
E: Eficiencia
EGF: Factor de crecimiento epitelial
EMA: *European Medicines Agency*
FDA: *Food and Drug Administration*
FRET: *Fluorescence-Resonance Energy Transfer*
GDP: Guanosín difosfato
GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GTP: Guanosín trifosfato
GTPasa: Guanosina trifosfatasa
GUSB: *Glucuronidase beta*
HIF: *Hipoxia inducible factor*
H&E: Hematoxilina y eosina
IFN: Interferón
IHC: Inmunohistoquímica
IL: Interleucina
iRNA: *interfering RNA*
IRS: Sistema de puntuación de inmunorreactividad

LPS: Lipopolisacárido
M-MDSCs: Células mieloides supresoras monocíticas
M1: Macrófagos proinflamatorios
M2: Macrófagos antiinflamatorios
mAb: Anticuerpo monoclonal
MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*
MDSC: Célula mioide supresora
MGB: *Minor groove binder*
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
MMP: *Matrix Metalloproteinase*
NK: Células Asesinas Naturales o Células *Natural Killer*
NKG2D: *Natural-killer group 2, member D*
NO: Óxido nítrico
NSCLC: Carcinoma de pulmón no microcítico
ORR: *Objective Response Rate*
PAMP: Patrón molecular asociado al patógeno
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1: Molécula 1 de muerte celular programada
PD-L1: Ligando 1 de muerte celular programada
PMN-MDSCs: Células mieloides supresoras polimorfonucleares
PP2A: *Serine/threonine-protein phosphatase 2A*
pRb: *Retinoblastoma-associated protein*
qPCR: Reacción de PCR en tiempo real
RGS: *Regulators of G protein signalling*
RNA: Ácido ribonucleico
RNasa: Ribonucleasa
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RT: Transcripción reversa
RTK: Receptores tirosina quinasa
RT-qPCR: *Quantitative real-time polymerase chain reaction*
SHP2: *Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11*
SIM: *Protein single-minded*
SOCS: *Suppressor of cytokine signaling*
SRCR: Receptor *Scavenger* con dominio rico en cisteína
TAM: Macrófagos asociados a tumores
TCR: Receptor de células T
TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta
TLR: Receptores de tipo Toll
Tm: Temperatura de fusión
UNG: *Uracil-DNA N-glycosylase*
VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CONCEPTO DE TUMOR

Los tumores o neoplasias son masas anormales de tejido que crecen de forma incontrolada, excesiva, autónoma e irreversible, superando a los tejidos normales en velocidad de crecimiento, y que poseen rasgos funcionales y morfológicos diferentes a los de sus precursoras. En ocasiones, estos tumores tienen la capacidad de invadir el tejido circundante y con ello de provocar metástasis en puntos distantes del organismo. Estos tumores son los denominados tumores malignos o comúnmente conocidos como cánceres, entre los que se encuentra el melanoma (Cooper y Hausman, 2000).

La investigación sobre el cáncer ha generado un conocimiento complejo y rico del mismo, proponiendo al cáncer como una enfermedad basada en cambios dinámicos tanto en el genoma como en el microambiente tumoral, esto es, en la matriz extracelular, fibroblastos, células neuroendocrinas, células adiposas, células inmunoinflamatorias, redes vasculares y sistema linfático que rodea al tumor (Wang *et al.*, 2017).

Han sido varias las investigaciones que han indicado que la tumorigénesis es un proceso de varios pasos y que cada uno de estos pasos supone alteraciones genéticas que, finalmente, conducen a la transformación de células normales en células malignas (Renan, 1993). Fue en el 2000 cuando Hanahan y Weinberg propusieron 6 de estas posibles modificaciones que compartían todas las células tumorales: autonomía en las señales de crecimiento, evasión de las señales inhibitorias de crecimiento, ilimitado potencial replicativo, evasión de la apoptosis, angiogénesis sostenida, e invasión tisular y metástasis. Más tarde, en el 2011 (Hanahan y Weinberg, 2011), estos mismos investigadores incorporaron 4 nuevos cambios identificados en las células tumorales, considerando esta vez, además de las alteraciones de estas propias células, el microambiente presente en las regiones afectadas. Estos son: metabolismo energético desregulado, inestabilidad genómica y mutagénesis, evasión de la respuesta inmune y microambiente inflamatorio. Así pues, cada uno de estos diez posibles cambios fisiológicos enumerados (*Figura 1*), representan la capacidad de las células tumorales para evitar los mecanismos anticancerígenos y continuar así su crecimiento y diseminación.



Figura 1. Hallmarks del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.2 MELANOMA: CONCEPTO E INCIDENCIA

El melanoma es una neoplasia originada en los melanocitos que han sido transformados en células malignas. Este tipo de tumor generalmente produce una neoformación cutánea pigmentada curable durante la etapa inicial pero que, sin tratamiento, es de rápido avance, pudiendo provocar metástasis que causan una alta mortalidad.

La mayor parte de los melanomas se localizan en la piel (95%). Con menor frecuencia (5%) pueden desarrollarse en mucosas (oral, digestiva, genital), retina o meninges y aproximadamente un 3% de los pacientes puede desarrollar melanomas ocultos (enfermedad metastásica sin evidencia de tumor primario) (Coricovac *et al.*, 2018).

Según datos recientes recogidos en el 2018 por Globocan (GLOBAL CANCER OBSERVATORY, 2018), la incidencia del melanoma en Europa es de un 3,84% del total de cánceres estudiados y la mortalidad de este tipo de tumor representa un 1,51%. Concretamente en España, la incidencia de este tumor es de un 2,21% y la mortalidad de un 1,11%.

La incidencia del melanoma aumenta linealmente tras los 25 años hasta la edad de 50 años, y más tarde disminuye, particularmente en el sexo femenino. No obstante, la incidencia de este tumor es muy variable y depende del país que se estudie, puesto que los diferentes patrones de incidencia se atribuyen, en rasgos generales, a las variaciones en el fenotipo racial de la piel y a las diferencias en la exposición al sol (Rastrelli *et al.*, 2014).

1.3 TRATAMIENTOS

La mayoría de los pacientes con melanoma recién diagnosticado tienen una enfermedad en etapa temprana. Para estos pacientes, la escisión quirúrgica representa el tratamiento de elección y es curativa en la mayoría de los casos. Sin embargo, aproximadamente el 10% de los casos de melanoma se diagnostican en una etapa avanzada, y no son resecables o ya son metastásicos. Para los pacientes que presentan esta enfermedad en etapa avanzada, hasta el año 2011, en el que surgieron nuevas opciones terapéuticas, se disponía de muy pocos tratamientos, entre ellos del agente citotóxico dacarbazina (DTIC), del interferón alfa y de la interleucina-2 (IL-2) (Zhu *et al.*, 2016). Sin embargo, el tratamiento del melanoma se ha visto revolucionado considerablemente desde 2011 con la aprobación de diversos agentes terapéuticos (Gershenwald *et al.*, 2017). A continuación se comentan brevemente todos ellos.

1.3.1 DACARBAZINA, IFN- α e IL-2

1.3.1.1 Dacarbazina (DTIC)

La dacarbazina es un agente quimioterápico alquilante que ha producido tasas de respuesta entre el 7% y el 25%; con duraciones medias de 5 a 6 meses; respuestas completas de menos del 5% y diversas toxicidades, las más comunes gastrointestinales y hematológicas, aunque generalmente es bien tolerada (Jilaveanu *et al.*, 2009).

Se ha demostrado de forma convincente que DTIC no es solo un fármaco citotóxico, sino que también ejerce efectos inmunoestimulantes, pues se confirmó que el tratamiento con DTIC provocaba la expresión de los ligandos del inmunorreceptor NKG2D en las células del melanoma (*Figura suplementaria 1* (Anexo I)) (Hervieu *et al.*, 2013). La unión de estos ligandos NKG2D con las células *Natural Killer* (NK) conduce a su activación y, por ende, a una mayor destrucción de las células tumorales y a la liberación de IFN- γ . Este interferón a su vez estimula el aumento en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo I en las células tumorales, lo que favorece su reconocimiento linfocitario y con ello, la muerte celular (Ugurel *et al.*, 2013).

1.3.1.2 IFN- α

El interferón alfa-2b (IFN- α), aprobado en 1995 por la FDA para el tratamiento adyuvante del melanoma de alto riesgo resecao, se asocia con una actividad antitumoral moderada (ORR 22%, CR <4%) en pacientes con melanoma metastásico. Este interferón estimula la respuesta llevada a cabo por las células T, células NK y macrófagos. Además, aumenta la expresión de los antígenos asociados al tumor, así como del MHC de tipo I, proporcionando a las células de melanoma una mayor susceptibilidad a los mecanismos efectores inmunológicos (Jilaveanu *et al.*, 2009).

Las toxicidades comunes asociadas al IFN- α , como fiebre, fatiga, mialgias, deterioro psicocognitivo y eventos autoinmunes, afectan negativamente a la calidad de vida del paciente, especialmente con la administración a largo plazo. Estos efectos junto con la baja probabilidad de respuesta hacen que la monoterapia con IFN- α tenga una utilidad limitada en el tratamiento del melanoma en estadios avanzados (Bhatia *et al.*, 2009).

1.3.1.3 IL-2

La interleucina-2 fue aprobada por la FDA en 1998 (Bhatia *et al.*, 2009) para el tratamiento de pacientes con melanoma en estadio avanzado. Se hipotetiza que la IL-2 ejerce su efecto de actividad antitumoral estimulando, regulando y reclutando otros tipos de citoquinas al sitio del tumor. Esta molécula se ha utilizado como monoterapia en varios ensayos clínicos, donde produjo tasas de respuesta generales de hasta el 22%, aunque generalmente, la probabilidad de respuesta a la IL-2 está asociada con el sitio de metástasis (siendo las metástasis subcutáneas o cutáneas las más probables de responder) y con la presencia de linfocitosis tras el tratamiento.

Los efectos secundarios del tratamiento con IL-2 están relacionados con las dosis y pueden ser muy severos, entre ellos se incluyen: fiebre, escalofríos, hipotensión, aumento de la permeabilidad capilar, arritmias cardíacas, oliguria, delirio y erupción cutánea (Bhatia *et al.*, 2009), por lo que el uso de regímenes de altas dosis está limitado a pacientes con un excelente estado de rendimiento y función normal de los órganos (Jilaveanu *et al.*, 2009).

1.3.2 TERAPIA ANTITUMORAL DIRIGIDA

1.3.2.1 Definición

La terapia antitumoral dirigida se basa en la administración de fármacos a genes o proteínas específicas de las células cancerosas o del microambiente tumoral para bloquear la proliferación celular, promover la regulación del ciclo celular, así como inducir la apoptosis o autofagia de estas células con el fin de eliminar el tumor (Padma, 2015).

1.3.2.2 Ruta de señalización MAPK

La ruta MAPK clásica consiste en Ras, Raf, Mek y Erk (*Figura suplementaria 2 (Anexo I)*), que transmiten secuencialmente señales proliferativas generadas en los receptores de la superficie celular a través de la señalización citoplásmica hacia el núcleo (Wong y Ribas, 2015).

La activación de la ruta MAPK se inicia en los receptores tirosina quinasa (RTK), que son proteínas transmembrana de la superficie celular que contienen un dominio N-terminal extracelular de unión al ligando y un dominio C-terminal intracelular tirosina quinasa. La mayoría de los RTK dimerizan tras la unión con su ligando, lo que induce la activación del receptor y la autofosforilación de residuos de tirosina en el dominio intracelular. Estas tirosinas fosforiladas sirven como sitios de unión para las proteínas adaptadoras responsables de la activación de varias moléculas, entre ellas la GTPasa de la familia Ras. Una vez activada, Ras recluta la quinasa Raf a la membrana plasmática, donde se fosforila y activa a la proteína quinasa, Mek, que a su vez activa a Erk. Esta última proteína Erk regula *downstream* factores de transcripción que afectan a los reordenamientos del citoesqueleto, el metabolismo y la expresión de varios genes

(Figura suplementaria 2 (Anexo I)) involucrados en la proliferación celular, la diferenciación, la angiogénesis y la supervivencia (Marquette *et al.*, 2007).

1.3.2.2.1 Ras

La familia Ras está constituida por proteínas G (K-Ras, H-Ras y N-Ras) ubicadas en la superficie interna de la membrana plasmática. Estas proteínas actúan como interruptores moleculares que están "activados" cuando están vinculados a GTP y "desactivados" cuando están vinculados a GDP. Cuando los receptores celulares reciben señales externas como la unión de citoquinas, factores de crecimiento o mitógenos, el complejo proteico Shc/Grb2/Sos se recluta en el receptor (Figura suplementaria 2 (Anexo I)) y el Ras inactivo intercambia el GDP por GTP, experimenta un cambio conformacional y se activa (Marquette *et al.*, 2007).

En un tercio de todos los cánceres humanos, incluido el melanoma, se han notificado mutaciones oncogénicas en miembros de la familia Ras. Aunque estas mutaciones se han notificado en los codones 12, 13 y 61 de *RAS*, la mutación más frecuente observada en los melanomas ocurre en el codón 61 de *N-RAS*. Este *RAS* mutante carece de actividad GTPasa y permanece activo, lo que lleva a una proliferación celular descontrolada y un fenotipo transformado (Evans *et al.*, 2012).

A pesar de la promesa de agentes dirigidos hacia Ras en estudios preclínicos, estos han fracasado en los ensayos clínicos, principalmente debido a que puede haber una desregulación de la vía por otros oncogenes no inhibidos. De esta forma, el objetivo terapéutico de Ras en el melanoma es relativamente ineficaz, lo que sugiere que otros puntos en la vía MAPK pueden resultar más prometedores (Marquette *et al.*, 2007; Evans *et al.*, 2012).

1.3.2.2.2 Raf

La familia Raf consta de A-Raf, B-Raf y C-Raf, y son proteínas efectoras de Ras (Wong y Ribas, 2015) que se reclutan en la membrana plasmática mediante la unión directa a Ras activado.

A pesar de que existen más de 65 mutaciones diferentes que ocurren en más de 30 codones *B-RAF*, en el melanoma predomina una *missense* de base única que supone un cambio de valina a ácido glutámico en el codón 600 (V600E) (Wong y Ribas, 2015) que genera una modificación conformacional en la estructura de la proteína con su consecuente activación e hiperactivación de la vía MAPK, que desencadena la activación de las vías de supervivencia y la división celular promoviendo el desarrollo tumoral.

Teniendo en cuenta la importancia de esta mutación activadora en *B-RAF* se han desarrollado fármacos que inhiben específicamente esta proteína. En concreto, existen dos tipos de inhibidores: de tipo I, que inhiben selectivamente la quinasa Raf activada, y los inhibidores de tipo II, que inhiben tanto a Raf activada como en reposo. Estos inhibidores de tipo II, como el Sorafenib, no tienen actividad potente en los tumores *B-RAF* V600E mutados, puesto que se considera que, posiblemente Sorafenib no sólo inhiba Raf sino también otras quinasas o factores angiogénicos necesarios para la supervivencia celular. Sin embargo, dos Inhibidores de tipo I han demostrado relevancia clínica como son el Vemurafenib y Dabrafenib (Evans *et al.*, 2012).

1.3.2.2.3 Mek

Mek-1 y Mek-2 son proteínas de doble especificidad, pues se trata de proteínas tirosina/treonina quinasas que se encuentran *downstream* de B-Raf y que están activas en aproximadamente el 30% de todos los cánceres humanos con señalización MAPK activada (Evans *et al.*, 2012).

Una amplia gama de líneas celulares de cáncer que poseen mutaciones *K-RAS*, *N-RAS* o *B-RAF* son sensibles a Selumetinib, que es un inhibidor alostérico selectivo y potente de Mek. Sin

embargo, se demostró que las líneas celulares de melanoma mutadas en *B-RAF* eran más sensibles a la inhibición de Mek que las líneas celulares mutadas en *RAS ex vivo*. Además, el bloqueo farmacológico de Mek inhibía completamente el crecimiento del tumor en xenoinjertos mutantes *B-RAF*, mientras que los tumores mutantes de *RAS* se inhibieron sólo de forma parcial (Solit *et al.*, 2005). Asimismo, poco después se demostró que las líneas celulares de melanoma mutado por *RAS* cambiaban su señalización de B-Raf a C-Raf (Dumaz *et al.*, 2006). Este hallazgo tuvo importantes implicaciones terapéuticas porque sugiere que tanto B-Raf como C-Raf son objetivos válidos en el melanoma, pero esto depende de si *B-RAF* o *RAS* están mutados en el tumor, por lo que resulta fundamental conocer el estado mutacional de *B-RAF* cuando se seleccionan inhibidores de Mek para la terapia del melanoma (Evans *et al.*, 2012).

1.3.3 INMUNOTERAPIA

1.3.3.1 Definición

La inmunoterapia se define como una estrategia de tratamiento que aprovecha la capacidad del propio sistema inmunitario, considerándose tanto las células, los anticuerpos y las citoquinas, para atacar y eliminar las células de los tumores (Alatrash *et al.*, 2013).

1.3.3.2. CTLA-4

El antígeno 4 del linfocito T citotóxico es un receptor para la familia de moléculas coestimuladoras B7, que se identificó como la primera molécula co-inhibitoria por Brunet J. *et al.* (1987). Este receptor de membrana se expresa en las células T, así como en otros tipos celulares como en las células B, monocitos y granulocitos, y comparte homología de secuencia con CD28. Sin embargo, mientras que CD28 aumenta la señalización, CTLA-4 tiene como función la inhibición de las células T citotóxicas una vez han sido activadas por el TCR (receptor de las células T). Esto sucede debido a que el dominio tirosina de CTLA-4, una vez fosforilado, puede interaccionar con las fosfatasas SHP2 y PP2A, ocasionando la inhibición de la señalización *downstream* del receptor TCR, que es posible por la mayor afinidad entre CTLA-4 y sus ligandos (B7-1 y B7-2), expresados en APCs (Figura 2), que entre CD28 y estos mismos ligandos (Deng *et al.*, 2016).

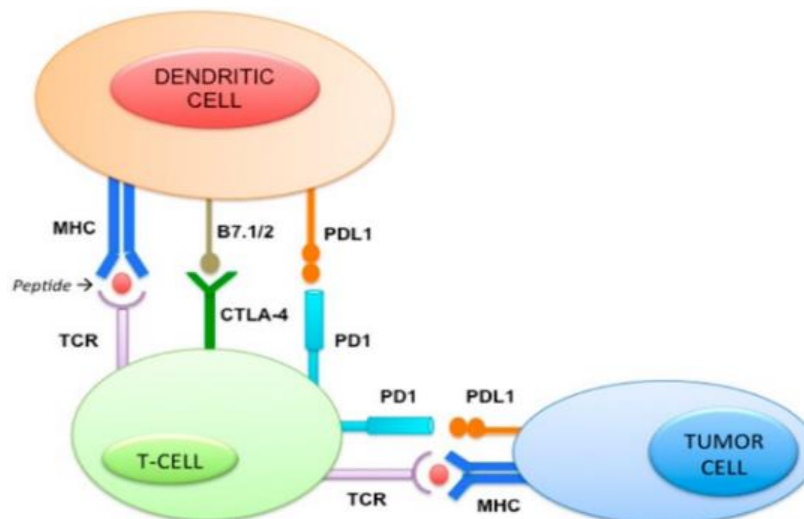


Figura 2. Representación de los puntos de control inmunitarios en las respectivas células (Toss *et al.*, 2017).

Así pues, en 1996 se demostró que el bloqueo de CTLA-4 provocaba un aumento de la respuesta inmune contra las células tumorales (Leach *et al.*, 1996). El primer fármaco aprobado que actuaba por este mecanismo fue el Ipilimumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra este receptor que obtuvo la aprobación por la FDA en el año 2011 para tratar el melanoma metastásico avanzado (Wang y Wang, 2016).

1.3.3.3 PD-1/PD-L1

PD-1 se expresa principalmente en la superficie de las células T, aunque también se ha demostrado su expresión en macrófagos, células B y células NK. Su ligando, PD-L1, se expresa en la superficie de las células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, células T y células tumorales (*Figura 2*) (Xu-Monette *et al.*, 2017).

La interacción de PD-1/PD-L1, descubierta en 2000 por Freeman *et al.*, regula negativamente la inmunidad antitumoral (Deng *et al.*, 2016). Molecularmente, esta unión de PD-1 inhibe la señalización de TCR en células T citotóxicas (CD8+) y helper (CD4+), reduce la expresión de citoquinas proinflamatorias y aumenta la expresión de la ubiquitina ligasa Cbl-b en células T CD8+. De esta forma, se ha demostrado que el bloqueo de este receptor y su ligando con anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-PD-1 y anti-PD-L1 puede aumentar la proliferación y la producción de citoquinas por las células T, expandir las frecuencias intratumorales, así como aumentar la citotoxicidad de estas mismas células (Xu-Monette *et al.*, 2017). Fue por esta razón por la que la FDA y la EMA aprobaron dos mAbs anti-PD-1, Nivolumab y Pembrolizumab; y tres mAbs anti-PD-L1, Atezolizumab, Avelumab y Durvalumab, para el tratamiento de diversos tipos de cáncer (Raju *et al.*, 2018).

1.4 CÉLULAS MIELOIDES SUPRESORAS

Las células mieloides derivan de la médula ósea y se dividen en dos poblaciones, los granulocitos (con sus representantes más abundantes, neutrófilos) y las células mononucleares: monocitos y macrófagos; y células dendríticas (DC) (Veglia *et al.*, 2018).

La activación de estos tipos celulares se produce en respuesta a señales relativamente fuertes provenientes de patógenos en forma de ligandos de receptores tipo toll (TLR), patrones moleculares asociados al daño (DAMP) y de moléculas del patrón molecular asociado al patógeno (PAMP). Como resultado se genera una rápida movilización de monocitos y neutrófilos desde la médula ósea, un aumento dramático en la fagocitosis, producción de citoquinas proinflamatorias, así como una regulación positiva del MHC de clase II y de moléculas coestimulantes, que genera una respuesta de corta duración que finaliza con la eliminación de la amenaza. Sin embargo, durante una inflamación no resuelta, como una infección persistente, el cáncer y otras afecciones crónicas, la naturaleza de las señales que activan las células mieloides difiere. Estas señales pasan a ser señales relativamente débiles y de larga duración, a menudo en forma de factores de crecimiento y mediadores inflamatorios. De este modo, los neutrófilos y monocitos generados muestran un fenotipo y una morfología inmaduros, una actividad fagocítica débil, un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la producción de óxido nítrico (NO), y alta expresión de arginasa, prostaglandina E2, así como de citoquinas inflamatorias. Este estado de activación no conduce a la eliminación de la amenaza o activación de la inmunidad, sino a la inhibición de la inmunidad adaptativa (supresión inmunitaria) y al apoyo de la progresión tumoral y las metástasis (Parker *et al.*, 2015). Las células en este estado patológico de activación se pueden identificar funcional, bioquímica y, en cierta medida, fenotípicamente, y ahora se denominan MDSCs, término que se introdujo en la literatura científica hace 12 años (Yang y Roden, 2007). Las MDSCs consisten en dos grandes grupos de células: granulocítica o polimorfonuclear (PMN-MDSC) y monocítica (M-MDSC). Los PMN-MDSCs son fenotípica y morfológicamente similares a los neutrófilos, mientras que los M-MDSCs son más similares a los monocitos (*Figura 3*) (Veglia *et al.*, 2018).

En los tejidos tumorales, las M-MDSCs se diferencian rápidamente en macrófagos asociados a tumores (TAM) y DC inflamatorias. Estas células pueden persistir en los tejidos durante mucho tiempo y en concreto, los TAM, actuando como inhibidores de las respuestas inmunes y promotores de la progresión tumoral (Veglia *et al.*, 2018), por lo que se hace evidente que neutralizar los MDSCs puede resultar una excelente estrategia para mejorar la inmunidad antitumoral natural y aumentar la eficacia de las inmunoterapias (Parker *et al.*, 2015).

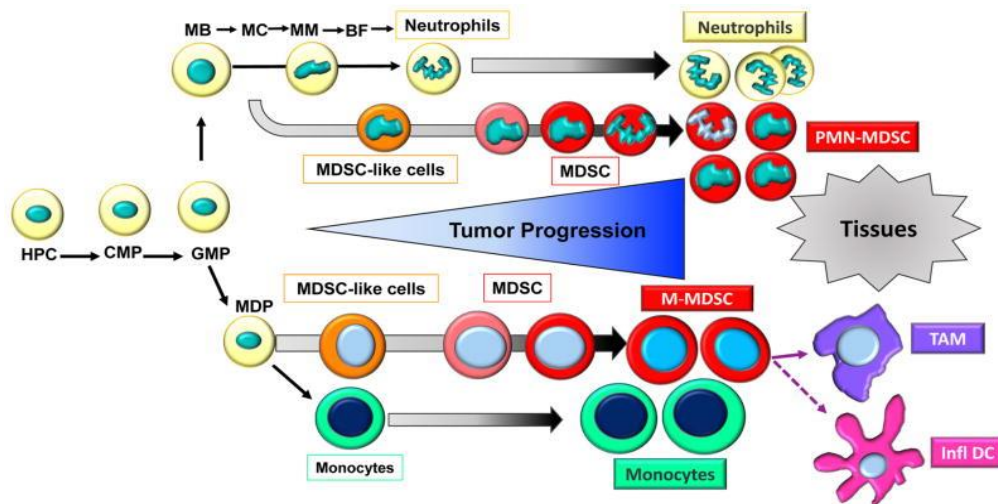


Figura 3. Estadios de diferenciación de células mieloides supresoras (MDSCs) (Veglia *et al.*, 2018).

1.5 MACRÓFAGOS

1.5.1 CONCEPTO

El macrófago fue descrito por primera vez por Elie Metchnikoff en 1893 y está caracterizado por su elevada plasticidad dependiente de las señales del entorno externo. Los macrófagos reciben diferentes nombres en función de la ubicación en los tejidos, por ejemplo: osteoclastos (hueso); macrófagos alveolares (pulmón); células microgliales (sistema nervioso central); histiocitos (tejido conectivo); células de Kupffer (hígado) y células de Langerhans (piel). Todas estas poblaciones tienen perfiles transcripcionales tan diferentes que podrían considerarse como clases diferentes y únicas de macrófagos, sin embargo, las funciones generales de estos son las mismas en todos los tejidos, siendo responsables, en términos generales, del desarrollo del tejido, de la respuesta inmune a los patógenos, de la vigilancia y el monitoreo de los cambios en el tejido, así como del mantenimiento de la homeostasis del tejido (Italiani y Boraschi, 2014).

1.5.2 FENOTIPOS FUNCIONALES DE LOS MACRÓFAGOS

La polarización de los macrófagos se produce a través de diferentes programas de activación mediante los cuales los macrófagos llevan a cabo sus funciones. Esencialmente, los macrófagos pueden modificar sus funciones metabólicas desde un entorno que promueve la cicatrización/crecimiento (macrófagos M2/antiinflamatorios), a una capacidad de inhibición/muerte (macrófagos M1/proinflamatorios) (Italiani y Boraschi, 2014).

La principal diferencia entre estas células es que en los macrófagos M2 el metabolismo de la arginina se desplaza a ornitina y poliaminas, mientras que en las células M1 se desplaza a NO y citrulina (Wang *et al.*, 2017). La ornitina producida por M2 puede promover la proliferación y reparación celular mediante la síntesis de poliamina y colágeno, la fibrosis y otras funciones de remodelación tisular, mientras que el NO producido por M1 es una molécula con actividad microbicida y capacidad inhibidora de la proliferación celular. Además, se ha demostrado que estos fenotipos también difieren en términos de sus perfiles de producción de quimiocinas y metabolismo del hierro y la glucosa (Italiani y Boraschi, 2014).

Los macrófagos se activan hacia un fenotipo M1 por moléculas relacionadas con microorganismos infecciosos (por ejemplo, el lipopolisacárido (LPS)), por citoquinas relacionadas con la inflamación TNF- α o IFN- γ y por el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Además, estos macrófagos se caracterizan por disponer de un fenotipo *in vitro* IL-12^{high}, IL-23^{high} e IL-10^{low}; por ser productores eficientes de moléculas efectoras tóxicas (ROS y NO) y citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-6); por una

regulación positiva de las moléculas del MHC II, B7-1 y B7-2; por su participación como inductores y células efectoras en respuestas de células T CD4+; y por mediar la resistencia contra parásitos intracelulares (Mignogna *et al.*, 2017).

Por su parte, la polarización tipo M2 se ha observado *in vitro* en respuesta a las citoquinas IL-4 o IL-13; a complejos inmunes; al factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF); y a moléculas antiinflamatorias tales como IL-10, TGF- β 1 y glucocorticoides. Además, estos macrófagos se caracterizan *in vitro* por un fenotipo IL-12^{low}, IL-23^{low}, IL-10^{high}, TGF- β ^{high}; por producir citoquinas inmunosupresoras (IL-10, IL-23); por una regulación negativa de las moléculas del MHC II, B7-1 y B7-2; y por presentar altos niveles de receptores de manosa, scavenger y galactosa (Mignogna *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2017). En general, estos macrófagos participan en la alergia, la eliminación de parásitos, la amortiguación de la inflamación, la remodelación de tejidos, la angiogénesis, la regulación inmune y la promoción de tumores.

En lo referente a los estudios *in vivo*, se ha demostrado que los macrófagos pueden adoptar una amplia variedad de fenotipos funcionales dependiendo de los cambios sutiles y continuos en el microentorno del tejido. Por lo tanto, la polarización M1/M2 de los macrófagos puede tomarse como un marco conceptual simplificado que describe diversos estados funcionales, de los cuales, los estados de activación M1 y M2 representan los extremos (Italiani y Boraschi, 2014).

1.5.3 MACRÓFAGOS EN MELANOMA

Las células de melanoma son capaces de producir múltiples factores que modulan tanto su actividad como la actividad de las células de respuesta inmune. En concreto, los factores autocrinos estimulan a las células del melanoma para que continúen la proliferación descontrolada, y aquellos con actividad paracrina modulan el microentorno para que se promueva el crecimiento del tumor y la capacidad invasiva del tumor. Entre los factores paracrinos, GM-CSF y CCL2 tienen el mayor impacto en los macrófagos del melanoma. El GM-CSF inhibe el efecto citotóxico de los macrófagos, mientras que la acción de CCL2 es dependiente de las concentraciones: una alta concentración de CCL2, induce a la infiltración de la lesión primaria por macrófagos, principalmente M1, que apunta a destruir el tumor. Sin embargo, con la disminución de la concentración de CCL2, los macrófagos M2 se acumulan y dan como resultado la promoción del crecimiento tumoral (Pieniazek *et al.*, 2018).

Por su parte, los macrófagos asociados al tumor disponen de una alta expresión de PD-L1 que favorece el microentorno inmunosupresor. Asimismo, actualmente se ha demostrado que estos macrófagos sintetizan: IL-10 y TGF- β , que inhiben la diferenciación de células de médula ósea en células dendríticas, promoviendo su diferenciación en macrófagos infiltrantes; grandes cantidades de la proteína proinflamatoria ciclooxigenasa-2 (COX-2), que promueve la migración de las células del melanoma y la angiogénesis; metalopeptidasa 9 de la matriz (MMP9), que descompone el colágeno IV y los complejos latentes de TGF- β , que intensifican la transición epitelio mesénquima (Fujimura *et al.*, 2018); TNF- α , IL-1 α y adrenomedulina, que favorecen la neoangiogénesis y progresión tumoral (Wang *et al.*, 2017); así como también presentan el receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa, que participa en múltiples procesos proteolíticos que resultan en la reorganización y degradación de la matriz extracelular, favoreciendo la progresión y crecimiento del tumor (Pieniazek *et al.*, 2018).

1.5.4 MARCADORES EN MACRÓFAGOS

La elevada plasticidad de los macrófagos, así como sus tan diversas funciones e implicaciones en la progresión tumoral, hacen que el estudio de posibles marcadores identificativos del fenotipo antiinflamatorio M2 sean de gran interés. A continuación, se describen varios marcadores característicos de este fenotipo.

1.5.4.1 ADGRE1

La glicoproteína ADGRE1 (F4/80), identificada hace más de 20 años como el antígeno para el mAb F4/80, se ha establecido como uno de los marcadores de superficie celular más específico para los macrófagos (Waddell *et al.*, 2018). Se trata de una proteína con un dominio extracelular similar al factor de crecimiento epitelial y un motivo de siete transmembranas, similares a los observados en los receptores acoplados a la proteína G. Esta molécula se encuentra altamente expresada y de forma constitutiva en la mayoría de los macrófagos tisulares residentes, incluidos los macrófagos de pulpa roja en el bazo, la microglía en el cerebro, las células de Kupffer en el hígado y las células de Langerhans en la piel (Lin *et al.*, 2005).

La expresión exclusiva de esta molécula de superficie en los macrófagos ha alentado al estudio de su papel funcional, por lo que diversos estudios se han llevado a cabo con este fin. Así pues, se ha demostrado que la molécula ADGRE1 desempeña un papel fundamental en el desarrollo de linfocitos T reguladores que pueden suprimir la inmunidad específica de antígeno (tolerancia inmunológica) y que el empleo de anticuerpos monoclonales frente a esta molécula previene esta tolerancia (Vandenberg y Kraal, 2005; Lin *et al.*, 2005).

1.5.4.2 BMP6

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), con más de 20 subtipos, son la subfamilia más grande dentro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). Al igual que el TGF- β , las BMPs existen como grandes proproteínas diméricas en el citoplasma y se escinden por las proteasas durante la secreción. Una vez secretados, los ligandos diméricos maduros se unen a los receptores de membrana en las células diana. Cuando los receptores de BMPs se activan, las Smads activadas por receptores (R-Smads) se fosforilan e interactúan con el mediador común Smad (Co-Smad), se trasladan al núcleo y regulan la expresión génica específica (Hong *et al.*, 2009).

Las BMPs y sus receptores suelen presentar una expresión alterada en diversos tipos de tumores. En concreto, BMP6 se encuentra implicada en la proliferación e invasión celular, así como en la metástasis, por lo que está asociada a peores pronósticos y a bajas tasas de supervivencia (Darby *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2016).

1.5.4.3 CD163L1

CD163L1 es una molécula que pertenece a la superfamilia SRCR (*Scavenger receptor cysteine-rich domain*). Se expresa en células de origen mieloide, predominantemente en células mieloides que residen en tejidos linfoides, mientras que su presencia es mínima en macrófagos específicos de tejido de larga vida, como células de Kupffer, macrófagos alveolares y microglía.

Diversos estudios han demostrado que se trata de una molécula característica del fenotipo antiinflamatorio de macrófagos, puesto que la estimulación con LPS y TNF- α regula negativamente la expresión de CD163L1 y, sin embargo, la estimulación con IL-10 y M-CSF aumenta la expresión de CD163L1 (Moeller *et al.*, 2012; Gonzalez *et al.*, 2015).

1.5.4.4 CCL19

Las quimiocinas constituyen un grupo de más de 40 péptidos secretados que son importantes para el control de la migración de leucocitos durante la homeostasis y la inflamación. Estudios recientes han implicado a los ligandos CCL19 y CCL21 y su receptor, CCR7, en la migración específica de linfocitos vírgenes y células dendríticas maduras a órganos linfoides secundarios durante la homeostasis inmune (Gibejova *et al.*, 2003).

CCL19 es un quimioatrayente para células dendríticas maduras e induce su actividad inflamatoria, favoreciendo con ello la proliferación celular y la disminución de la apoptosis de las células T. Todo ello genera un microambiente con una alta inflamación, lo que se correlaciona positivamente con la progresión de diversos tipos tumorales. Es por ello por lo que esta

quimiocina es considerada una molécula característica del fenotipo M2 de los macrófagos (Hwang *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017).

1.5.4.5 ARNT2

ARNT2 fue descubierto en 1996 por el grupo de Yoshiaki Fujii-Kuriyama (Hankinson, 2008) y es uno de los miembros de la familia bHLH-PAS que incluye los factores de transcripción AhR, HIF y SIM. Se trata de un homólogo cercano de ARNT, pero cuyos patrones de expresión difieren enormemente. En concreto, ARNT2, a diferencia de ARNT, se expresa en los diversos fenotipos de macrófagos siguiendo un patrón concreto: en macrófagos M2 presenta una elevada expresión, mientras que en macrófagos M1 esta es muy baja (Delgado, 2017).

1.5.4.6 MMP12

La elastasa de macrófagos MMP12 se secreta en forma de proproteína y en su forma activa degrada varias proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno de tipo IV, la fibronectina y la elastina. La expresión de esta proteína *in vivo* se ha demostrado no sólo en macrófagos, sino también en células epidérmicas transformadas. En función del tipo celular en el que se exprese, esta molécula parece tener diferentes funciones en la progresión de los tumores. No obstante, se considera que en los macrófagos esta molécula es característica del fenotipo antiinflamatorio, fenotipo que participa fomentando el remodelado del tejido y la progresión tumoral (Kerkelä *et al.*, 2000).

1.5.4.7 RGS16

Las proteínas RGS pueden clasificarse en diversas subfamilias basándose en la homología de secuencia primaria y en la presencia de dominios de señalización adicionales. Concretamente, dentro de la subfamilia B/R4 de proteínas RGS destaca RGS16, que presenta un tamaño de 20–25 kDa. La sobreexpresión de esta proteína en monocitos humanos estimulados con LPS disminuye la producción de citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8 y TNF α , mientras que la eliminación de *RGS16* por iRNA tiene el efecto opuesto (Xie *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que RGS16 es capaz de restringir la migración de células T, puesto que inhibe la correcta señalización en este tipo celular, todo ello indicando que esta molécula es característica del fenotipo antiinflamatorio de macrófagos (Suurväli *et al.*, 2014).

1.5.4.8 SOCS2

El supresor de la familia de señalización de citoquinas (SOCS) incluye ocho miembros de los cuales, cada uno de ellos, desempeña un papel único modulando la señalización celular. Estudios previos han demostrado que las expresiones de los genes *SOCS1*, *SOCS2* y *SOCS3* inducibles por citoquinas pueden ser reguladas por la estimulación de LPS en macrófagos de ratón (Hu *et al.*, 2009). Con respecto a la proteína *SOCS2*, se ha demostrado que actúa como un importante regulador de las respuestas inflamatorias en la periferia y se ha sugerido su expresión en macrófagos con fenotipo M2 (Delgado, 2017).

1.5.4.9 CD68

La molécula CD68 es una glicoproteína intracelular que se ha sido ampliamente utilizada para identificar células del linaje monocítico en condiciones normales y patológicas (Medrek *et al.*, 2012). Este antígeno se localiza en lisosomas, fagosomas y gránulos primarios de neutrófilos y está catalogado como un marcador pan para macrófagos, dado que permite identificar tanto macrófagos tipo M1 como M2, aunque se emplea frecuentemente como marcador para TAMs, usualmente con fenotipo M2 (Jeong *et al.*, 2019).

2. OBJETIVOS

La presencia de macrófagos se ha demostrado en diversos melanomas y generalmente está asociada a un mal pronóstico. Una de las posibles razones es que los macrófagos asociados al tumor (TAM), que generalmente presentan un fenotipo M2 (antiinflamatorio), participen fomentando el crecimiento del tumor suprimiendo la actuación del sistema inmune sobre el mismo. De esta forma, el principal objetivo de este trabajo es analizar y caracterizar la expresión de diversos marcadores en los macrófagos presentes en muestras de melanoma metastásico.

Los objetivos específicos de este estudio son:

1. Analizar la expresión de marcadores característicos del fenotipo antiinflamatorio de macrófagos mediante inmunohistoquímica, tanto en macrófagos como en células tumorales, siendo estos: *ARNT2*, *CCL19*, *CD163L1*, *ADGRE1*, *RGS16*, *SOCS2*, *MMP12* y *BMP6*.
2. Analizar la expresión de 4 marcadores característicos del fenotipo antiinflamatorio de macrófagos mediante qPCR, siendo estos: *CCL19*, *CD163L1*, *ADGRE1* y *RGS16*.
3. Estudiar las posibles correlaciones de expresión génica de los genes estudiados.
4. Analizar la asociación entre la expresión de los marcadores de estudio y el pronóstico de los pacientes en diversos tipos de cáncer.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 COHORTE DE MUESTRAS

En este estudio multicéntrico se emplearon 30 muestras parafinadas de tejido de pacientes con melanoma metastásico procedentes del biobanco de la Fundación de Investigación del Hospital General Universitario de Valencia (FIHGUV). Los pacientes fueron informados e invitados a participar en el estudio de acuerdo con la Declaración de Helsinki, firmando el correspondiente consentimiento aprobado por el *Comité Ético de Investigación Clínica* (CEIC) de la institución.

3.2 TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA

La técnica de coloración de hematoxilina y eosina (H&E) es la más empleada en histología y se introdujo en 1876 (Kumar *et al.*, 2010). Este tipo de tinción se emplea de forma rutinaria en los laboratorios de histopatología, ya que proporciona al patólogo/investigador una visión muy detallada del tejido, a menudo suficiente para permitir un diagnóstico de enfermedad basado simplemente en el estudio de la distribución y morfología celular (Anderson, 2019).

En este estudio se desparafinaron las muestras en una estufa a 70°C durante 60 minutos y a continuación se sumergieron en xilol para conseguir el completo desparafinado. A continuación, se usaron diversos alcoholes de graduación descendente para hidratar los tejidos. Seguidamente se empleó la Hematoxilina de Harris potenciada con ácido acético glaciar, que potencia la coloración azulada, y, *a posteriori*, el alcohol ácido al 1% (99 mL alcohol 70% + 1 mL de ácido clorhídrico), que consiste en un diferenciador que permite eliminar el exceso de hematoxilina de las láminas de tejido. A continuación, la solución de Scott's, que potencia la unión de la hematoxilina en las zonas teñidas con esta y, como segundo colorante, la eosina-floxina, que colorea los componentes catiónicos del tejido. Finalmente, se emplearon alcoholes de graduación ascendente para deshidratar los tejidos, así como xilol para aclarar las muestras.

En la *Figura suplementaria 3* (Anexo I) se muestra una sección de piel observada en un microscopio óptico con una lente de 40X, donde la hematoxilina tiñe los núcleos de las células en azul púrpura y la eosina colorea otros elementos celulares en los tejidos en una tonalidad del rosa al rojo.

En la valoración de las láminas, este tipo de tinción nos permitió identificar las zonas con mayor cantidad de melanina (marrón), para así evitar confundirlas con las regiones positivas, es decir, con presencia del marcador evaluado y por tanto con reacción de la diaminobenzidina (DAB) con la peroxidasa (marrones).

3.3 INMUNOHISTOQUÍMICA (IHC)

La inmunohistoquímica es una técnica que consiste en determinar la presencia de antígenos en secciones de tejido mediante el empleo de anticuerpos específicos. Así pues, esto es posible dado que la molécula de inmunoglobulina tiene sitios de unión para antígenos y para otros marcadores o anticuerpos, de forma que la unión específica antígeno-anticuerpo se demuestra con una reacción histoquímica coloreada visible por microscopía óptica o fluorescente (Brandtzaeg, 1998).

En este estudio se trabajó con 9 bloques de muestras parafinadas, por lo en primer lugar se obtuvieron secciones del tejido para su posterior estudio. Los sucesivos pasos fueron llevados a cabo en el equipo *MD stainer* (Vitro-Master Diagnóstica, España). En esta, se desparafinaron las secciones mediante una mezcla de buffers y detergentes (DS5 y DS6) y se empleó una solución a pH 6 (TR2) para desenmascarar los antígenos de las muestras. A continuación, se bloqueó la superficie con bloqueante de peroxidasa para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos primarios. Seguidamente se incubaron las secciones con los respectivos anticuerpos primarios proporcionados por el grupo de investigación del Dr. Corbí del Centro de

Investigaciones Biológicas (CSIC) (anti-ARNT2; anti-CCL19; anti-ADGRE1; anti-RGS16; anti-MMP12 (Proteintech, UK) y anti-SOCS2; anti-CD163L1; anti-BMP6; anti-CD68 (Antibodies online, USA)), y cuyas características se especifican en la *Tabla Suplementaria 1* del Anexo I. A continuación, se incorporó el *Polymer Enhancer*, que consiste en una solución que mejora la interacción específica entre el antígeno y el anticuerpo primario. Para el revelado, se empleó *HRP 2-Step Polymer*, un polímero marcado con peroxidasa (ver Anexo II), que tras la adición del sustrato cromogénico diaminobencidina (DAB), generó una coloración marrón en las zonas con presencia del antígeno evaluado. Finalmente, se adicionó la hematoxilina, colorante de contraste por excelencia, que facilitó los análisis posteriores de las muestras.

3.4 ANÁLISIS DE IMAGEN

El análisis de imagen, es decir, la visualización de las muestras de inmunohistoquímica se llevó a cabo empleando un microscopio óptico. De esta forma, se pudo determinar cualitativamente el grado de tinción aproximado de las muestras gracias a la colaboración de dos especialistas en dermatología. Esta valoración cualitativa de las muestras nos permitió determinar si la inmunohistoquímica había resultado satisfactoria y, por tanto, se observaba expresión de las moléculas de interés en las muestras de melanoma metastásico.

Para llevar a cabo un análisis más exhaustivo de las muestras, se realizó un conteo celular con *Leica DMD108 Digital Microimaging Network* (Leica Microsystems, España), tanto de células positivas, con presencia del marcador, como de células negativas, sin expresión del marcador. El conteo se llevó a cabo a un aumento 40X en dos campos aleatorios de la muestra, realizando un recuento final de 200 células tumorales, 100 células en cada campo (*Figura 4*), y 60 macrófagos, 30 en cada campo. El recuento de macrófagos fue menor debido a la gran dificultad para ser identificados en las muestras, pues este tipo celular es mucho más pequeño que las células tumorales y generalmente se encuentra disperso entre estas células tal y como se muestra en la *Figura 5*. Es por ello por lo que, para la identificación de los macrófagos, nos hemos basado en la búsqueda de células pequeñas, dispuestas entre las células tumorales, con morfología circular y en ocasiones, con varios núcleos (Gordon y Taylor, 2005).

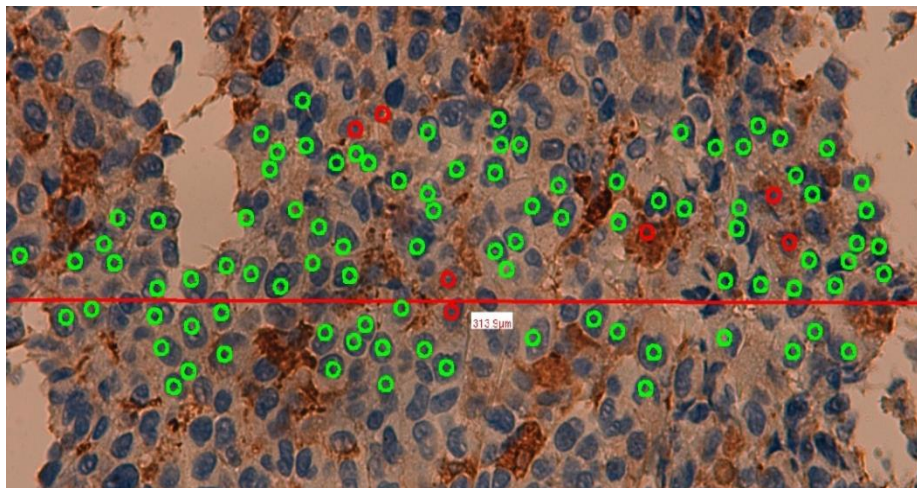


Figura 4. Contaje de 100 células tumorales, positivas (puntos rojos) y negativas (puntos verdes), en la muestra del paciente 18 para el marcador ADGRE1 a un aumento de 40X.

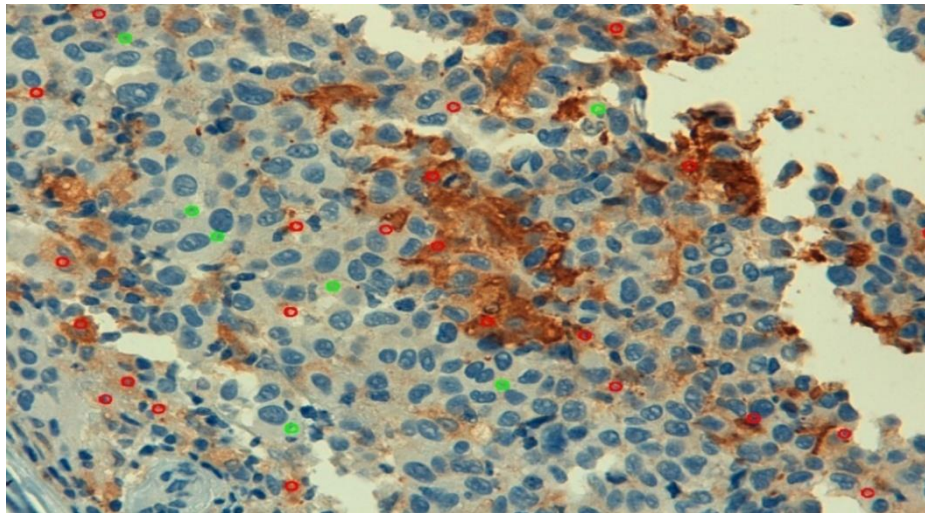


Figura 5. Contaje de 30 macrófagos, positivos (puntos rojos) y negativos (puntos verdes), en la muestra del paciente 18 para el marcador ADGRE1 a un aumento de 40X.

Las células contadas, tanto tumorales como macrófagos, se clasificaron por el grado de tinción de las células (A), graduado desde un nivel 0 en células sin tinción (puntos verdes) hasta un nivel 3 en células con gran intensidad de tinción (puntos rojos). Asimismo, también se tuvo en cuenta el porcentaje de células positivas (B) de cada uno de los niveles de tinción con respecto al total de células positivas identificadas (*Tabla 1*) (Gatto *et al.*, 2013).

Esta clasificación nos permitió calcular el sistema de puntuación de inmunorreactividad (IRS) (Fedchenko y Reifenrath, 2014) con el que se determinó si la muestra era positiva ($IRS \geq 7$) (Ghosh *et al.*, 2017) o negativa ($IRS < 7$) para cada uno de los marcadores estudiados. Este score se obtuvo multiplicando el valor A por el valor B en función de los niveles de tinción y porcentajes obtenidos en cada una de las muestras evaluadas y para cada tipo celular por separado. Generalmente el score empleado adopta valores entre 0-12. No obstante, cuando una misma muestra presenta tinciones heterogéneas, es decir, presenta varias intensidades en distintos porcentajes, cada componente se analiza por separado y los resultados de todos ellos se suman (Raida *et al.*, 1999).

Tabla 1. Criterio clasificación por intensidad de tinción (A) y por porcentajes celulares (B).

A (Intensidad de tinción)		B (Porcentaje de células positivas)	
		0	0%
0	Nada	1	< 10 %
1	Débil	2	10-50 %
2	Moderada	3	51-80 %
3	Fuerte	4	> 80 %

3.5 EXTRACCIÓN DE RNA

Para el aislamiento de RNA se emplearon cortes de parafina de 5 μm y el kit *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation* (Life technologies, USA). El protocolo que se siguió constaba de los siguientes pasos: desparafinado; digestión con proteasa; aislamiento de ácidos nucleicos; digestión con DNasa y purificación final.

El desparafinado se llevó a cabo añadiendo los cortes de parafina a 1 mL de xileno. Se dió un vortex y se centrifugaron brevemente para que los tejidos quedasen bien inmersos en el xileno y a continuación se calentaron 3 min a 50°C en el Termomix para fundir la parafina. Las muestras se centrifugaron 2 min a máxima velocidad (13.200 rpm) a Tª ambiente y se descartó el xileno sin disgregar el pellet. Seguidamente, para eliminar el xileno y acelerar el secado de los

tejidos se adicionó 1 mL de etanol 100%. Finalmente se descartó el máximo etanol posible y se secaron las muestras en la centrifuga de vacío a 40°C durante 20-40 min.

Para la digestión con proteasa se empleó un volumen variable de 100 o 200 µL de buffer de digestión, dependiendo del tamaño de la muestra, y 4 µL de proteasa. Se incubaron las muestras en el termomix 3-4 horas a 50°C y seguidamente se sometieron a una temperatura de 80°C durante un máximo de 15 minutos.

El aislamiento de los ácidos nucleicos se llevó a cabo con el *Isolation additive* y Etanol 100%, cuyos volúmenes dependieron del volumen de buffer de digestión que se había empleado para cada una de las muestras.

El último paso del protocolo se basó en preparar la DNasa mix, que incluye DNasa buffer, DNasa y agua libre de nucleasas. Una vez preparada, manteniendo las muestras en hielo en todo momento, se transfirió un volumen de 60 µL de esta DNasa mix en el centro de las columnas y se incubaron durante 30 minutos a Tª ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados con las soluciones Wash 1 y Wash 2/3 y finalmente se transfirió cada una de las columnas a tubos nuevos para la elución del RNA con 60 µL de agua libre de nucleasas (Qiagen, Alemania) calentada a 50°C.

La cuantificación del RNA se llevó a cabo usando un nano-espectrofotómetro (Nano Drop 2000C, Thermo Fisher Scientific, USA), y su calidad se evaluó considerando los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230.

3.6 ANÁLISIS DE LA INTEGRIDAD DEL RNA

El nivel de degradación del RNA extraído se evaluó mediante el kit comercial *Agilent RNA 6000 Pico Kit* (Agilent Technologies, Alemania), que permite una separación electroforética de cada uno de los fragmentos de RNA presentes. En este análisis se empleó un Pico Chip de RNA en el que se adicionaron en los pocillos correspondientes 9 µL de *Gel-Dye Mix*, 5 µL del marcador de RNA, 9 µL de la solución acondicionadora de RNA, 1 µL del patrón desnaturalizado, así como 1 µL de las muestras de RNA en estudio, cuya concentración se ajustó al rango establecido por el kit, esto es, entre 200 – 5000 pg/µL.

La lectura del chip se llevó a cabo con el programa *Agilent 2100 Bioanalyzer*, que nos permitió obtener un informe de los datos de cada una de las muestras, así como un electroferograma representativo del perfil del RNA de las mismas

3.7 RETROTRANSCRIPCIÓN

La transcripción reversa o retrotranscripción (RT) es una técnica molecular que permite la síntesis de DNA complementario (cDNA) a partir de moléculas de RNA empleando la enzima transcriptasa reversa. En nuestro caso, se empleó el kit comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*® (Applied Biosystems, USA). Cada reacción precisó de 25 µL de Master Mix con los siguientes componentes: 5 µL de tampón de transcripción reversa (*RT buffer 10X*), 2 µL de dNTPs (*dNTPs mix 25X* (100 mM)), 5 µL de *Random primer 10X*, 2,5 µL de transcriptasa reversa *MulTriScribeTM*, 2,5 µL de inhibidor de RNasa, 2 µL de BSA (23 mg/mL) y 6 µL de agua libre de nucleasas (Qiagen, Alemania). A este volumen de Master Mix se añadió un volumen variable de RNA dependiendo de la concentración original de la muestra con la que se partía, para disponer finalmente de 700 ng de RNA por reacción. Con todo ello, el volumen final en todas las muestras fue de 50 µL, que se consiguió con la adición de agua libre de nucleasas (Qiagen, Alemania).

La adición de BSA en este protocolo de retrotranscripción para muestras de melanoma resultó fundamental para evitar la inhibición de la actividad polimerasa por parte de la melanina (Eckhart *et al.*, 2000). En concreto, se empleó una concentración de BSA $\geq 0,6$ g/L para controlar esta inhibición, puesto que estudios previos han confirmado que menores concentraciones no resultan tan efectivas (Giambernardi *et al.*, 1998; Rådström *et al.*, 2004).

Finalmente, para que tuviera lugar la reacción, se empleó el termociclador *Mastercycler* (Eppendorf, Alemania) siguiendo el programa de temperaturas y tiempos especificado en la *Tabla 2*. El cDNA resultante de esta reacción se almacenó a -20°C para su posterior empleo en la PCR cuantitativa.

Tabla 2. Programa de temperaturas y tiempos para la retrotranscripción.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25 °C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10 min	120 min	5 min	∞

3.8 PCR CUANTITATIVA (qPCR)

La PCR cuantitativa o qPCR, consiste en un método sencillo y elegante para determinar la cantidad de una secuencia o gen objetivo que está presente en una muestra. En esta PCR se utilizaron sondas de oligonucleótidos (TaqMan®, Applied Biosystems, USA) específicas de secuencia diseñadas para unir en regiones inter-exónicas para prevenir la amplificación de DNA genómico. Estas sondas contienen en el extremo 5' un colorante fluorescente indicador (reporter) y en el extremo 3' un colorante supresor (quencher) así como una unión al surco menor (MGB) que aumenta la temperatura de fusión (Tm) sin aumentar la longitud de la sonda. Mientras la sonda está intacta, es decir, cuando no hay amplificación de la región de interés, la proximidad del colorante supresor reduce considerablemente la fluorescencia emitida por el colorante indicador mediante la transferencia de energía de resonancia de la fluorescencia (FRET). Sin embargo, si la secuencia objetivo está presente, la sonda se disocia mediante la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa durante la amplificación (*Figura 6*). Esta disociación de la sonda separa el colorante indicador del colorante supresor, lo que supone un aumento de la señal del colorante indicador, así como también permite que el proceso de amplificación de la región tenga lugar. Durante cada ciclo de la PCR tiene lugar este fenómeno, por lo que se produce un aumento de la intensidad de la fluorescencia proporcional a la cantidad de amplicones producidos. Tras N ciclos de amplificación, la señal fluorescente supera la fluorescencia basal, estableciendo el ciclo de cuantificación (Ct), que permite la determinación de la cantidad relativa de cada uno de los genes estudiados (Heid *et al.*, 1996).

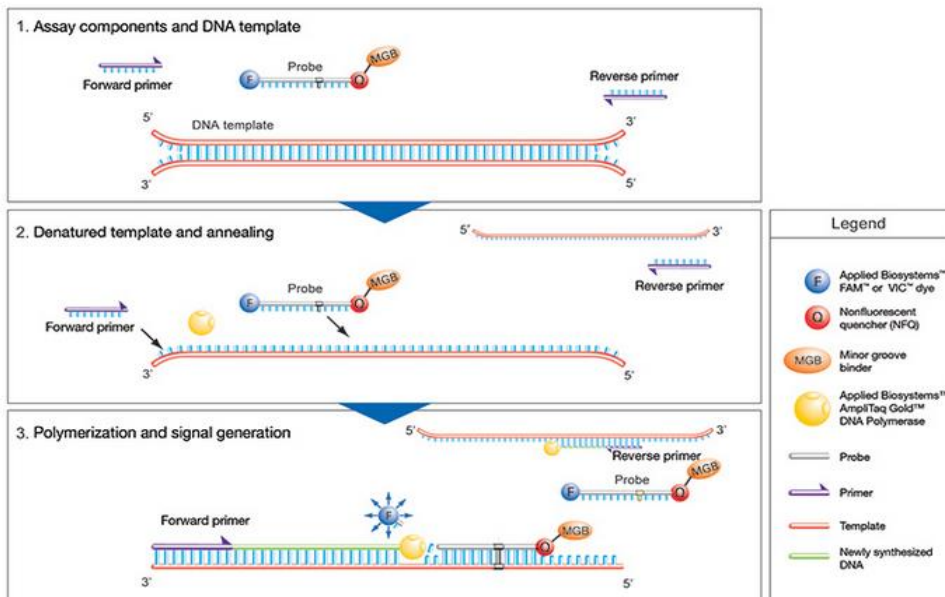


Figura 6. Descripción del ensayo qPCR basado en sonda TaqMan® MGB (Life Technologies).

Cada reacción se llevó a cabo por duplicado en placas de 384 pocillos con un volumen final de 5 μL : 2 μL de cDNA, 0,25 μL de *TaqMan*[®] *Gene Expression Assay mix* (Applied Biosystems, USA), 2,5 μL del reactivo *TaqMan*[®] *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, USA) y 0,25 μL de agua libre de nucleasas. El reactivo *TaqMan*[®] *Gene Expression Master Mix* contiene DNA polimerasa, dNTPs y el enzima uracil N-glicosilasas, que evita la reamplificación de posibles amplicones contaminantes.

Además, en la placa de 384 se incluyó un control negativo para cada uno de los genes, para confirmar la ausencia de contaminación, así como un control positivo de cDNA de referencia disponible comercialmente, preparado a partir de una mezcla de RNAs obtenido de varios tejidos humanos (*qPCR Human Reference cDNA*, Clontech, USA) y escogido por representar un amplio rango de genes.

El equipo empleado fue el termociclador (LightCycler 480, Roche, Suiza), siguiendo el programa de temperaturas optimizado que se indica en la *Tabla 3*. La pre-PCR que se indica es necesaria para asegurar la correcta actividad de la enzima UNG (*Uracil N-Glycosylase*) y la activación de la enzima AmpliTaq Gold.

Tabla 3. Programa de temperaturas de la qPCR.

	Paso	Tiempo	Temperatura
Pre-PCR	Incubación con UNG	2 min	50°C
	Activación Taq	10 min	95°C
PCR (x40 ciclos)	Desnaturalización	15 seg	95°C
	Unión/Extensión	1 min	60°C

3.8.1 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA

La eficiencia para cada sonda *TaqMan*[®] se evaluó llevando a cabo una serie de diluciones (50 ng/ μL , 5 ng/ μL , 0,05 ng/ μL , 0,005 ng/ μL y 0,0005 ng/ μL) usando el cDNA de referencia mencionado anteriormente. La eficiencia se calculó usando la siguiente ecuación: $E=10^{-1/\text{pendiente}}$.

En este estudio se analizan 4 genes (*Tabla 4*), seleccionados por su característica expresión en el fenotipo antiinflamatorio de macrófagos, descritos en diversos trabajos encontrados a través de una búsqueda en la base de datos Pubmed (Schinnerling *et al.*, 2015; Vandenberg y Kraal, 2005; Moeller *et al.*, 2012; Suurväli *et al.*, 2014).

Tabla 4. Genes analizados en este estudio y sus sondas *Taqman*[®] usadas para la qPCR.

GEN	NOMBRE COMPLETO	CÓDIGO	AMPLICIÓN
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Hs03929097_g1	58
<i>CCL19</i>	<i>C-C motif chemokine ligand 19</i>	Hs00171149_m1	61
<i>RGS16</i>	<i>Regulator of G-protein signaling 16</i>	Hs00892674_m1	91
<i>CD163L1</i>	<i>CD163 molecule like 1</i>	Hs00264549_m1	78
<i>ADGRE1</i>	<i>Adhesion G protein-coupled receptor E1</i>	Hs00892591_m1	63

Todas las muestras del estudio se analizaron por duplicado, y la media de Cts fue usada para posteriores análisis. Algunas muestras tuvieron unos niveles de expresión génica por debajo del límite de detección, por lo que su expresión relativa se calculó considerando el máximo valor de Ct obtenido (40 ciclos), que corresponde con la mínima expresión detectable.

Los niveles de expresión génica relativa se determinaron calculando el ratio entre la expresión del gen diana y la expresión del gen de referencia (*GAPDH*), que permite normalizar las posibles desviaciones en las concentraciones de cada una de las muestras. Para ello se tuvieron en cuenta las eficiencias de estos genes, así como la diferencia de Ct entre el control

(cDNA de referencia) y cada una de las muestras evaluadas, siguiendo la fórmula de Pfaffl (Ecuación 1) (Pfaffl, 2001).

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{diana}})^{\Delta Ct(\text{control-muestra})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Ct(\text{control-muestra})}}$$

Ecuación 1. Fórmula Pfaffl para el ratio de la expresión génica relativa. Diana: gen analizado; Ref: gen endógeno de referencia (*housekeeping*); E: eficiencia del gen; Ct: punto de cruce; ΔCt : diferencia de expresión entre el control (cDNA) y muestra tumoral.

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Antes de los análisis estadísticos, los datos de expresión se revisaron cuidadosamente y los valores considerados como valores atípicos se excluyeron. Las variables analíticas que se estudiaron no seguían una distribución normal, por lo que las pruebas estadísticas realizadas son de tipo no paramétrico.

La expresión relativa de los genes se evaluó considerando los valores de la mediana dado que esta se encuentra menos afectada por la variabilidad de los datos que la media, asegurando de esta forma la robustez estadística necesaria para los análisis. Si el valor del gen de interés varía entre 0.5 a 2.0, su expresión no varía entre el tejido tumoral y el cDNA de referencia. Por tanto, se considera que un gen está sobreexpresado en el tejido tumoral cuando la mediana de su expresión relativa es superior a 2, y que un gen está infraexpresado cuando la mediana se encuentra por debajo de 0.5 (Usó *et al.*, 2016).

Para conocer las frecuencias (media, mediana, máximo, mínimo, percentiles, desviación típica, etc.) para cada uno de los genes, se recurrió a los estadísticos descriptivos. Asimismo, para el estudio de las correlaciones génicas se empleó el estadístico Spearman y, en aquellos casos en los que fue posible realizar el cálculo Chi-cuadrado y además las variables eran dicotomizables, se pudo obtener una tabla de contingencia para conocer la correlación de los niveles de expresión de los genes evaluados.

Todos los análisis se llevaron a cabo empleando el software de análisis estadístico Statistical Package for the Social Science (SPSS) versión 15.0 (Chicago, IL), considerando estadísticamente significativos aquellos análisis donde $p < 0,05$ o bien $p < 0,01$, dependiendo de la correlación estudiada.

3.10 ANÁLISIS IN SILICO

La búsqueda de coexpresión de genes se realizó empleando el buscador computacional *SEEK*, usando como filtros el tipo tumoral “melanoma” o el tipo celular “macrophage”. Este buscador emplea datasets de TCGA RNASeq V2 collection; Illumina HumanWG-6 expression beadchip; Illumina HumanHT-12 expression beadchip; Agilent-012391 Whole Human Genome Oligo Microarray; Agilent-014850 Whole Human Genome Microarray y Affymetrix Human Genome Array.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DE LA COHORTE

En este estudio se trabajó con muestras de 30 pacientes con melanoma metastásico que fueron biopsiados en diversos hospitales de España. En la cohorte de pacientes hay un 53,33% de hombres (M) y un 46,67% de mujeres (F). De todos estos pacientes, un 44,83% de ellos son negativos para la mutación *B-RAF* y un 55,17% positivos para esta misma mutación. Asimismo, los tratamientos más empleados en los pacientes con *B-RAF* mutado se basan principalmente en inhibidores de quinasas como Vemurafenib y Masatinib. No obstante, también se recurre al tratamiento mediante el anticuerpo monoclonal Ipilimumab; el antineoplásico citostático Fotemustina, así como al interferón. Las características clinicopatológicas que pudieron recopilarse de las muestras empleadas se detallan en la *Tabla Suplementaria 2* (Anexo I).

4.2 ANÁLISIS DE LOS MARCADORES POR IHC

En este estudio se evaluaron 8 genes, a saber: *ARNT2*, *BMP6*, *CD163L1*, *ADGRE1* (*F4/80*), *CCL19*, *MMP12*, *RGS16* y *SOCS2*; en 9 muestras de pacientes con melanoma metastásico. Basándonos en el estudio de Delgado (2017), partimos de la hipótesis de que dichos genes son principales marcadores de un fenotipo antiinflamatorio de macrófagos, pues se ha demostrado que tras la estimulación con M-CSF, citoquina específica para la polarización de los monocitos hacia un fenotipo antiinflamatorio, y la activación de los monocitos con LPS, se consigue que los macrófagos expresen distintos genes, entre ellos, los anteriormente mencionados.

Como control positivo para esta técnica, se empleó el gen *CD68* (*Figura 7*), marcador pan para los macrófagos (Medrek *et al.*, 2012; Jeong *et al.*, 2019), que permitió confirmar la presencia de infiltrado monocitario en las muestras y así evitar la confusión con zonas con gránulos de melanina.

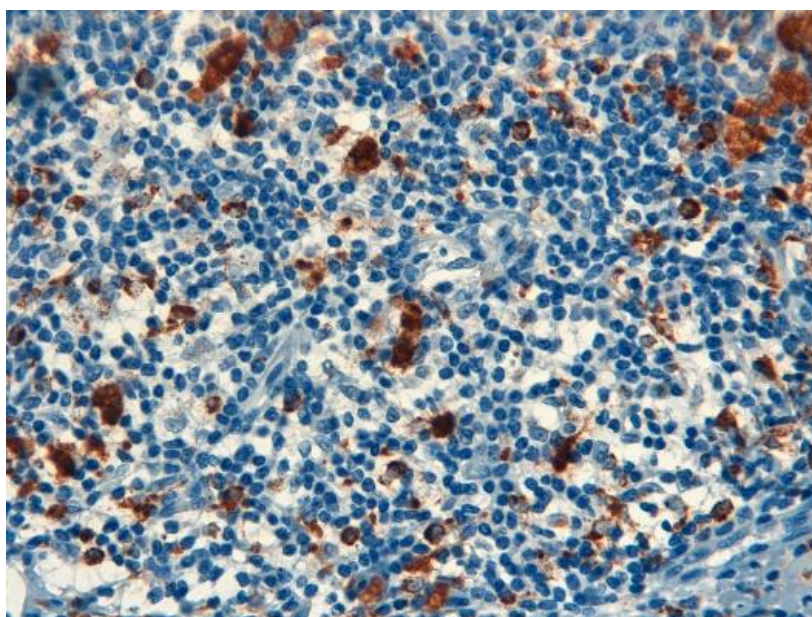


Figura 7. Marcador CD68 en la muestra del paciente 22.

Para determinar si existía expresión de cada uno de los marcadores de interés se recurrió al IRS. Este score se obtuvo tras realizar el correspondiente conteo y clasificación, según los pasos indicados en Materiales y Métodos, de células tumorales y de macrófagos. Con este score, siguiendo las recomendaciones de Ghosh *et al.* (2017), se clasificaron las muestras como positivas ($IRS \geq 7$) (*Figura 8A* y *9A*) o negativas ($IRS < 7$) (*Figura 8B* y *9B*) tanto para células tumorales como para macrófagos para todos los marcadores.

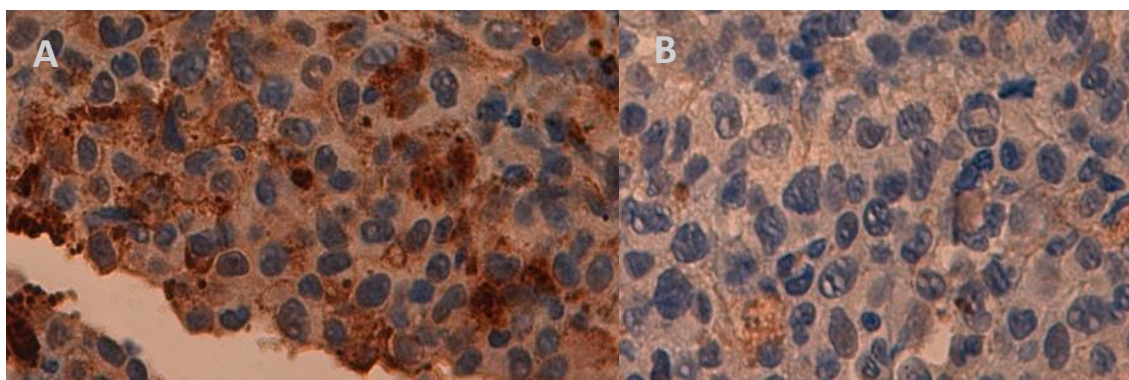


Figura 8. Marcador CD163L1 en células tumorales: (A) IRS 12 y (B) IRS 1.

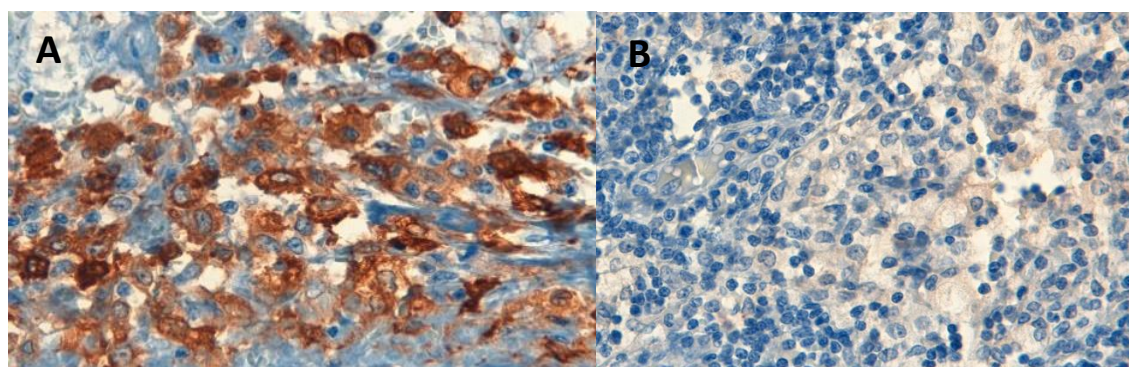


Figura 9. Marcador ADGRE1 en macrófagos: (A) IRS 16 y (B) IRS 3.

Finalmente, con la recopilación de estos datos, fue posible obtener una valoración final para cada marcador, evaluado en los dos tipos celulares, en forma de porcentaje de muestras positivas con respecto al total. Estos porcentajes se indican y discuten a continuación.

4.2.1 ARNT2

Se trata de un factor de transcripción que se encuentra altamente expresado en el riñón y en el sistema nervioso. Asimismo, se ha demostrado que ARNT2 está involucrado en procesos como la angiogénesis, la aparición y desarrollo de carcinomas (Yang *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2018), así como en la inducción de genes hipóxicos (Maltepe *et al.*, 2000).

La expresión de esta molécula en células tumorales ha resultado completamente negativa, pues no se obtuvo expresión de esta en ninguna de las muestras evaluadas. En cuanto a su expresión en los macrófagos infiltrantes, únicamente estuvo presente en el 11,11% del total de muestras estudiadas. Referente al bajo porcentaje de muestras positivas para la expresión de este marcador en macrófagos, podemos confirmar que, generalmente, este gen se encuentra sobreexpresado en macrófagos antiinflamatorios (Delgado, 2017; Riera *et al.*, 2017). Sin embargo, al no tratarse de un marcador general para los macrófagos, y debido al reducido número de macrófagos evaluados, no se observan altos porcentajes de positividad, tal y como se esperaba obtener si el análisis fuera exclusivo de macrófagos *in vitro*. Por su parte, la reducida expresión de ARNT2 en células tumorales ha sido reportada en otros estudios, como por ejemplo Jia *et al.* demostraron que la expresión de esta molécula en las células del cáncer gástrico era mucho menor que en los tejidos sin tumorigenicidad y que esta baja expresión estaba correlacionada con la profundidad de invasión del tejido, el grado de diferenciación, así como con el peor pronóstico de los pacientes (Jia *et al.*, 2018). Asimismo, Kimura *et al.* indican que ARNT2 se encuentra implicado en la carcinogénesis del carcinoma oral de células escamosas. Estos autores, demuestran *in vitro* que la sobreexpresión de ARNT2 conlleva la regulación negativa de HIF-1 α , que a su vez supone el hipofuncionamiento del transportador de glucosa 1, y con ello, la inhibición de la proliferación celular y la reducción del tamaño tumoral (Kimura *et*

al., 2016). Del mismo modo, Yang *et al.* reportan que los niveles de expresión de *ARNT2* resultan superiores en tejidos de pulmón normales en comparación con la expresión en tejidos con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), detallando además que la sobreexpresión de esta molécula conducía a la apoptosis y a la inhibición del crecimiento tumoral (Yang *et al.*, 2015). Con respecto a la expresión de este gen en melanomas, Ascierio *et al.* (2017) indican que *ARNT2* se encuentra sobreexpresado en metástasis en regresión con respecto a las metástasis en progresión. No obstante, el estudio acerca del hepatoma (Maltepe *et al.*, 2000) indica que la expresión de *ARNT2* se encuentra vinculada a una mayor expresión de *VEGF*, favoreciendo la vascularización y el eficiente crecimiento, y con ello la progresión tumoral, por lo que es posible que la expresión de *ARNT2* tenga especificidad de tejido, determinando, por tanto, unos efectos u otros dependiendo del tejido celular en el que se exprese.

4.2.2 BMP6

Esta molécula es un factor de crecimiento secretado que ha demostrado estar implicado en distintas funciones de la embriogénesis, así como de la organogénesis. Asimismo, ha demostrado una expresión aberrante en diversos carcinomas, por lo que también se ha estudiado su posible implicación en la diferenciación tumoral y la metástasis (Hu *et al.*, 2016).

La expresión de este marcador en las células tumorales ha resultado positiva en un 66,67% del total de muestras evaluadas, mientras que la positividad de este en macrófagos asciende a un 77,78%. Los altos porcentajes de expresión obtenidos para esta molécula, caracterizada como marcador de un fenotipo antiinflamatorio de macrófagos (Hong *et al.*, 2009) se debe, principalmente, a que se trata de una molécula secretada (Kugimiya *et al.*, 2005), dado que lo esperable sería obtener una expresión relativamente baja, al igual que sucede con *ARNT2*, por no ser considerado un marcador general de macrófagos. No obstante, tal y como demuestran nuestros datos experimentales y la literatura, la expresión de esta molécula en células tumorales es elevada. De esta forma, por tratarse de una molécula secretada y, por tanto, presente en la matriz extracelular, es probable que la cuantificación llevaba a cabo para evaluar este marcador en los macrófagos se haya visto sesgada por la producción de esta molécula por parte de las células tumorales. Referente a la alta expresión de *BMP6* en células tumorales, diversos estudios de la literatura lo detallan. El estudio propuesto por Lee *et al.* indica que *BMP6* en el cáncer de próstata, en pacientes con terapia de privación androgénica, es la proteína que mayor expresión presenta comparada con el resto de BMPs, y participa fomentando la proliferación celular (Lee *et al.*, 2014). Asimismo, Darby *et al.* muestran como la alta expresión de *BMP6* en tumores primarios de próstata con metástasis secundarias óseas está asociada con un peor pronóstico y menores tasas de supervivencia, indicando que *BMP6* promueve la migración celular y la capacidad invasiva de las células tumorales (Darby *et al.*, 2007). Hu *et al.* reportan que la sobreexpresión de *BMP6* en cáncer escamoso esofágico resulta en un aumento de la metástasis y la invasión celular (Hu *et al.*, 2016). Con respecto a la expresión de esta molécula en el melanoma, un estudio en líneas celulares de melanoma (Furuta *et al.*, 2014) ha demostrado la sobreexpresión de *BMP6* tras la estimulación con IFN- γ . Asimismo, Hsu *et al.* reportan la sobreexpresión de este gen durante la progresión del melanoma y Stieglitz *et al.* corroboran esta afirmación, indicando a su vez que la deficiencia de *BMP6* reduce la progresión tumoral en un modelo animal de melanoma (Hsu *et al.*, 2005; Stieglitz *et al.*, 2018). No obstante, en la literatura también encontramos resultados opuestos a los expuestos anteriormente. Entre estos se encuentra el estudio de Xiong *et al.* (2018), quienes presentan la molécula *BMP6* como un supresor tumoral. Así pues, esto se debe a que Xiong *et al.* indican que *BMP6* se encuentra infraexpresado en el tejido de NSCLC comparado con los tejidos adyacentes no tumorales, demostrando que esta menor expresión se correlaciona con peores tasas de supervivencia.

4.2.3 CD163L1

La molécula CD163L1 es un receptor endocítico perteneciente a la superfamilia SRCR que se encuentra ampliamente expresado en células de origen mieloide, especialmente en macrófagos tisulares (Gonzalez *et al.*, 2015). Se postula que esta molécula actúa de receptor para ligandos implicados en la resolución de la inflamación y que únicamente se encuentra presente en determinados subconjuntos del total de macrófagos tisulares (Gutierrez *et al.*, 2016).

Tras evaluar la expresión del marcador en células tumorales, este ha resultado positivo en tan sólo el 22,22% de las muestras evaluadas, mientras que la expresión de este en macrófagos ha sido de un 44,44%. Los porcentajes obtenidos muestran aquello que confirma la literatura, y es que CD163L1 es un marcador característico de los macrófagos, en concreto, de aquellos con fenotipo antiinflamatorio. Así pues, Delgado analiza en detalle estos marcadores del fenotipo antiinflamatorio de macrófagos humanos, y en su estudio demuestra que *MAFB* controla la adquisición del perfil homeostático/antiinflamatorio de los macrófagos favoreciendo la expresión de varios genes, entre ellos, *CD163L1*, e impide la expresión de genes asociados a la polarización proinflamatoria como *CLEC5A* (Delgado, 2017). Relacionado con la presencia de este marcador en el fenotipo antiinflamatorio se encuentra el estudio de González *et al.* en el que se indica que la expresión de *CD163L1* en los macrófagos es inducida por IL-10 así como por M-CSF, y que esta misma molécula se encuentra presente en el 100% de los macrófagos infiltrantes en melanoma (Gonzalez *et al.*, 2015). Vinculado a este estudio está el propuesto por Brochériou *et al.*, en el que se detalla la expresión de *CD163L1* en macrófagos antiinflamatorios que han sido estimulados con M-CSF, y cómo el equilibrio entre este tipo de macrófagos y aquellos con fenotipo proinflamatorio podría estar implicado en la progresión de la aterosclerosis (Brochériou *et al.*, 2011). Asimismo, Grønlund *et al.* en su estudio detallan el proceso de clonaje de esta molécula, indicando su expresión en los macrófagos humanos (Grønlund *et al.*, 2000). Referente a la expresión de esta molécula en el melanoma, Kunz y Vera (2019) detallan la sobreexpresión de este gen en un análisis transcriptómico de células de melanoma con mutaciones de resistencia a diversos tratamientos, mientras que Samaniego *et al.* (2018) han demostrado la sobreexpresión de esta misma molécula en macrófagos M2 infiltrantes en muestras de melanoma.

4.2.4 ADGRE1 (F4/80)

El marcador ADGRE1 es uno de los marcadores de superficie celular más específicos para los macrófagos (Waddell *et al.*, 2018) y la expresión de este es indicativo de la presencia de un macrófago maduro y diferenciado (Torroella *et al.*, 2009).

Esta molécula ha presentado muy baja expresión en las células tumorales en el total de muestras evaluadas, siendo el porcentaje de muestras positivas de un 11,11%. Sin embargo, este porcentaje aumenta considerablemente (88,89%) cuando se evalúa la expresión de la molécula en los macrófagos. Esto se debe a que, tal y como se ha indicado previamente, ADGRE1 es un marcador ampliamente utilizado para la detección de macrófagos asociados al tumor (TAMs), generalmente vinculados a un fenotipo antiinflamatorio (Aras y Zaidi, 2017). Así pues, en 1981, Austyn y Gordon detallaron en su estudio la elevada especificidad macrofágica que se obtenía al realizar ensayos con un nuevo anticuerpo monoclonal frente a esta molécula, con el que se podía discriminar los macrófagos de otros celulares adherentes como las células dendríticas (Austyn y Gordon, 1981). Asimismo, Afik *et al.* indican en su estudio que los TAMs se encuentran muy implicados en promover el desarrollo, la invasión y diseminación tumoral, y que un marcador que permite la identificación de estos en fases tardías es el ADGRE1 (Afik *et al.*, 2016). Por otro lado, también se conoce que esta molécula permite diferenciar los monocitos inmaduros de los macrófagos maduros y diferenciados. Esto lo indican los autores Torroella *et al.* demostrando cómo los monocitos recién reclutados de la sangre presentan baja expresión

tanto de *ADGRE1* como de otros marcadores mieloides (Torroella *et al.*, 2009). Asimismo, Qiang *et al.* (2017) reportan que la radiación ultravioleta induce la infiltración de células inmunes inflamatorias en la epidermis, de entre ellas los macrófagos con fenotipo ADGRE1+. Con respecto a su característica expresión en el fenotipo antiinflamatorio, el estudio de Qian *et al.* emplea el marcador ADGRE1 para identificar macrófagos en tejido pulmonar metastatizado de un cáncer de mama, con lo que se confirma que este fenotipo M2, con expresión de *ADGRE1*, soporta y promueve la metástasis tumoral (Qian *et al.*, 2009).

4.2.5 CCL19

Esta molécula es una quimiocina que está implicada en la quimioatracción tanto de células dendríticas maduras como de linfocitos naïve a los órganos linfoides secundarios durante la homeostasis inmune (Hillinger *et al.*, 2006). Asimismo, también se ha demostrado que esta quimiocina parece estar sobreexpresada en varios tumores, activando la proliferación tumoral y estimulando la angiogénesis (Zhang *et al.*, 2017).

Del total de muestras evaluadas, tanto para células tumorales como para macrófagos, esta molécula ha resultado positiva en un 55,56% de estas. Así pues, esta alta expresión, considerando las funciones que se le asocian, parece estar implicada en la progresión tumoral y la evasión del sistema inmune. La sobreexpresión de *CCL19* en macrófagos la detallan Gibejova *et al.* en un estudio en el que indican la expresión uniforme de esta molécula en macrófagos alveolares, así como su alta expresión en pacientes con sarcodiosis (Gibejova *et al.*, 2003). Asimismo, Schinnerling *et al.* indican la sobreexpresión de *CCL19* en macrófagos con fenotipo antiinflamatorio estimulados con IL-10 y LPS, detallando la implicación de esta molécula en la quimioatracción de linfocitos y células dendríticas (Schinnerling *et al.*, 2015). Con respecto a la regulación positiva de esta molécula en células tumorales, Zhang *et al.* lo demuestran en un estudio sobre el cáncer cervical, en el que indican que esta molécula se encuentra altamente expresada en células tumorales y que, la unión de este ligando a su receptor CCR7 induce la polimerización de actina, así como la formación de pseudópodos. Además, estos mismos autores confirman que el *knockdown* de esta molécula fomenta la apoptosis y la inhibición de metaloproteinasas como MMP9 y MMP2, conduciendo finalmente a la inhibición de la progresión de este tipo de cáncer (Zhang *et al.*, 2017). Referente a la implicación de esta molécula en el melanoma, son varios los estudios que confirman su efecto protumoral. Así pues, Cristiani *et al.* (2019) reportan que el melanoma en estadio IV está caracterizado por las altas concentraciones de *CCL19* en suero y en las líneas celulares de melanoma evaluadas. En el melanoma uveal también se ha demostrado la elevada expresión de esta quimiocina (Dobner *et al.*, 2012) y el estudio del receptor de esta molécula, CCR7, ha corroborado que la interacción de este con su ligando *CCL19* favorecen las metástasis ganglionares del melanoma (Monteagudo *et al.*, 2011). No obstante, otros estudios demuestran una implicación de *CCL19* en el cáncer totalmente opuesta. Así pues, Hillinger *et al.* plantean esta molécula como un estimulador inmune apto para el tratamiento del cáncer de pulmón avanzado, dado que demuestran *in vivo* que el tratamiento con *CCL19* promueve la liberación de citoquinas antiangiogénicas y a su vez, aumenta el infiltrado de células T CD4+ y CD8+, así como de DCs, fomentando la reducción tumoral (Hillinger *et al.*, 2006). Asimismo, Cheng *et al.* indican que la elevada expresión de *CCL19* junto con *CCL21* y su receptor, *CCR7*, está asociado a un mejor pronóstico en el cáncer de pulmón, pues, al igual que Hillinger *et al.* señalan que la expresión de *CCL19* se correlaciona con un aumento en el infiltrado inmune y con la acumulación intratumoral de linfocitos T CD8+, que conducen al bloqueo del crecimiento tumoral (Cheng *et al.*, 2018). Algo muy similar detallan Hwang *et al.*, quienes demuestran que esta quimiocina favorece la migración de DCs en el cáncer de mama (Hwang *et al.*, 2016).

4.2.6 MMP12

Se trata de una endopeptidasa secretada que ha demostrado estar implicada en la desdiferenciación epitelial, así como en la agresividad histológica mediante la degradación del tejido conectivo y las membranas basales, fomentando con ello el crecimiento tumoral y la capacidad metastásica (Kerkelä *et al.*, 2002). Asimismo, se postula que MMP12 predomina en los macrófagos, así como también en diversos tipos tumorales fomentando las funciones tumorigénicas (Decock *et al.*, 2011).

La expresión de esta molécula en las células tumorales ha resultado positiva en un 75% de las muestras evaluadas, mientras que la expresión positiva de la misma en macrófagos ha sido de un 62,50%. Los altos porcentajes de expresión obtenidos para esta molécula en los macrófagos posiblemente se deban a que se trata de una molécula secretada (Lee *et al.*, 2014), por lo que es probable que la cuantificación efectuada para evaluar la presencia de este marcador en macrófagos haya podido verse alterada de la misma forma que sucedía con BMP6, dado que, si bien es cierto que esta molécula es característica del fenotipo antiinflamatorio de macrófagos (Razavian *et al.*, 2016; Delgado, 2017), tan alto porcentaje de positividad no es esperable por no tratarse de un marcador general de macrófagos. Con respecto a la elevada expresión de esta molécula en células tumorales, disponemos de varios estudios de la literatura que corroboran este perfil de expresión en otros tipos de cáncer. Kerkelä *et al.* detallan que la expresión de *MMP12* es abundante en el cáncer de células escamosas fomentando la desdiferenciación histológica, la degradación de la matriz extracelular y con ello el crecimiento y la invasión tumoral. No obstante, estos mismos autores indican que la expresión exclusiva de esta molécula en macrófagos parece tener un efecto totalmente opuesto, indicando una correlación positiva entre la expresión de esta en macrófagos y un comportamiento menos agresivo del tumor (Kerkelä *et al.*, 2002). Qu *et al.* reportan en su estudio la asociación de esta molécula con la promoción de un ambiente altamente inflamado que favorece la transición de un enfisema al cáncer de pulmón mediante la activación de la vía proinflamatoria *IL-6/Stat3* y la infiltración de células inflamatorias (Qu *et al.*, 2009). Asimismo, Diggs y Ripley (2018) plasman en un review diversos estudios que indican el papel contradictorio de la expresión de *MMP12* en las células tumorales y los macrófagos, tal y como planteaban Kerkelä *et al.* Sin embargo, la principal idea que los autores del review transmiten es que la sobreexpresión de *MMP12* en NSCLC se correlaciona con un aumento del crecimiento tumoral, la invasión, metástasis y la supresión de las respuestas inmunes, así como con bajas tasas de supervivencia, indicando la tumorigenicidad de esta molécula. En el estudio del melanoma de Bastian *et al.* (2017) también se indican estos efectos contradictorios, planteando que la expresión de *MMP12* por macrófagos parece tener un efecto antitumoral mientras que su expresión por las células del melanoma favorece la actividad protumoral. Asimismo, en el melanoma cutáneo esta molécula ha demostrado estar asociada a la invasión tumoral y capacidad metastásica (Zhang *et al.*, 2015). Opuestos a estos estudios se encuentran los estudios llevados a cabo por Decock *et al.* y Roman. En estos, los autores detallan la capacidad de MMP12 para inhibir la angiogénesis y la proliferación celular mediante la angiostatina, así como para fomentar la capacidad apoptótica de las células, todo ello indicando la habilidad de la molécula para reducir la progresión tumoral y mejorar las tasas de supervivencia en cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico y cáncer de pulmón (Decock *et al.*, 2011; Roman, 2017).

4.2.7 RGS16

La proteína RGS16 fomenta la actividad GTPasa de la subunidad alfa de las proteínas G y ha sido implicada en la regulación negativa de varias vías oncogénicas (Carper *et al.*, 2014; Hoshi *et al.*, 2016). Asimismo, es considerada uno de los marcadores característicos del fenotipo antiinflamatorio de los macrófagos (Suurväli *et al.*, 2014).

Del total de las muestras evaluadas, tanto para células tumorales como para macrófagos, han resultado positivas para este marcador un 25% y un 50%, respectivamente. Dado que se trata de una molécula característica de un fenotipo antiinflamatorio para macrófagos, la elevada presencia de este marcador en macrófagos supone un peor pronóstico para los pacientes estudiados. No obstante, ocurre lo contrario con la expresión de esta molécula en las células tumorales, lo que justifica el reducido porcentaje de positividad obtenido para estas células en las muestras estudiadas. Esta variabilidad en la expresión de la molécula en función del tipo celular estudiado lo demuestran diversos autores. La sobreexpresión de *RGS16* en los macrófagos la indican Schinnerling *et al.* así como Delgado en sus correspondientes estudios, planteando esta molécula como marcador característico de los macrófagos antiinflamatorios, que suponen un soporte inmune para la progresión tumoral (Schinnerling *et al.*, 2015; Cuevas *et al.*, 2017). Por otra parte, en el estudio del cáncer de mama, varios autores confirman la correlación negativa entre la expresión de esta molécula y la progresión de la enfermedad. Así pues, Wiechec *et al.* confirman que la pérdida de este marcador se correlaciona con un aumento en la proliferación celular en este cáncer (Wiechec *et al.*, 2010). Hoshi *et al.* correlacionan la baja expresión de *RGS16* con un aumento de la represión transcripcional de la E-cadherina y, por tanto, con un aumento de la invasión de las células de subtipo laminar (Hoshi *et al.*, 2016). Además, el estudio de Liang *et al.* sobre este cáncer demuestra que la pérdida de *RGS16* promueve la proliferación celular, así como la resistencia a las terapias con TKI (Liang *et al.*, 2009). Por otra parte, Carper *et al.* detallan como *RGS16* presenta baja expresión en cáncer de páncreas metastásico en comparación con el no metastásico, así como también presentan esta molécula como uno de los posibles candidatos a participar, cuando se encuentra lo suficientemente expresada, en la supresión tumoral junto con p53 y pRb, inhibiendo la activación de diversas vías implicadas en la proliferación, migración e invasión de las células del cáncer de páncreas (Carper *et al.*, 2014). Asimismo, Teras *et al.* (2018) indican en su estudio del melanoma que los ratones *knockout* para *RGS16* desarrollaron tumores primarios más grandes que aquellos *wildtype*, planteando con ello que esta molécula parece estar implicada en evitar la tumorigénesis. Sin embargo, el estudio de Miyoshi *et al.* se opone a los resultados obtenidos en este trabajo. Estos autores han reportado que la expresión elevada de *RGS16* en cáncer colorrectal está vinculada un aumento en la proliferación celular y a peores tasas de supervivencia, proponiendo esta molécula como un marcador candidato para el pronóstico de este tipo de cáncer (Miyoshi *et al.*, 2009).

4.2.8 SOCS2

Esta molécula ha demostrado ser un regulador principal de las vías de señalización de la hormona de crecimiento, del factor de crecimiento de la insulina y de la prolactina, así como también parece estar implicada en la carcinogénesis, regulando el crecimiento celular y la apoptosis (Hoefler *et al.*, 2013).

Tras evaluar la presencia de *SOCS2*, se ha podido determinar que este marcador, en las células tumorales, es positivo para el 44,44% de las muestras estudiadas, mientras que su presencia es menor en los macrófagos, presentando un 33,33% de positividad en las muestras. Con respecto a la expresión de esta molécula en los macrófagos, el porcentaje obtenido se aproxima al esperado dado que, pese a que esta molécula es característica del fenotipo antiinflamatorio de los macrófagos (Hu *et al.*, 2012; Denisenko *et al.*, 2017), el reducido número de macrófagos que se han podido evaluar en este trabajo, así como la escasa presencia de macrófagos en comparación con células tumorales que se encuentran en las muestra estudiadas, hacen que el grado de positividad obtenido no sea tan elevado como el que se esperaría obtener en un estudio exclusivo de macrófagos *in vitro*. Por otro lado, podemos considerar que este marcador presenta una expresión baja para las células tumorales, dado que menos de la mitad de las muestras resultaron positivas para este marcador, por lo que posiblemente esta baja expresión esté involucrada en la progresión tumoral. Esto lo confirman

diversos estudios de la literatura pues, Ghafouri *et al.* detallan una regulación negativa de *SOCS2* en las células tumorales, en comparación con las células adyacentes no tumorales, que supone un aumento de la proliferación celular en el cáncer de mama (Ghafouri *et al.*, 2018). Asimismo, Haffner *et al.* (2007) demuestran un pronóstico favorable de aquellos pacientes de este mismo tipo de cáncer con alta expresión de *SOCS2*. Sasi *et al.* en el estudio del cáncer de mama también indican que aquellas pacientes que se mantenían libres de enfermedad eran aquellas que presentaban altos niveles de *SOCS2*, por lo que estos autores plantean a esta molécula como un posible supresor tumoral para el cáncer de mama (Sasi *et al.*, 2010). Por su parte, Iglesias *et al.* indican que los bajos niveles de expresión de *SOCS2* en el cáncer de próstata se correlacionan con la invasión y proliferación tumoral a través de la activación de las vías tirosina-quinasa asociadas (Iglesias *et al.*, 2013). En el melanoma, Marini *et al.* (2006) indican que la transcripción de *SOCS2* se encuentra reducida de forma significativa debido al silenciamiento epigenético, lo que favorece la aparición y progresión del melanoma. Sin embargo, también se han publicado resultados opuestos a los expuestos anteriormente. Estos son referentes al cáncer de próstata y colon, y en estos se demuestra *in vitro* e *in vivo* que la regulación negativa de esta molécula favorece el arresto del ciclo celular y la apoptosis, mientras que altos niveles de *SOCS2* aumentan la malignidad del tumor y la probabilidad de recaída (Hoefler *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2018).

4.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Para la determinación de la expresión relativa de los genes, 26 muestras fueron estudiadas. Para ello se aisló el RNA de bloques de parafina de biopsias de pacientes con melanoma metastásico y se obtuvo una concentración óptima de cada una de ellas.

4.3.1 EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DEL RNA

La integridad del RNA extraído de las 26 muestras se evaluó mediante el Pico Kit comentado en el apartado de Materiales y Métodos. Con este estudio se pudo confirmar el patrón de los fragmentos de RNA. Los resultados fueron los esperados al tratarse de muestras embebidas en parafina, pues este tipo de preservación de las muestras conduce a la reticulación de ácidos nucleicos a proteínas y otros constituyentes celulares, así como a posibles cambios en el pH con el paso del tiempo, que pueden conducir a la oxidación de la formalina al ácido fórmico y con ello a la rotura de las cadenas de RNA (von Ahlfen *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2017).

En las *Figuras 10A y 10B*, podemos ver, respectivamente, el patrón esperado de una muestra fresca con la integridad idónea de RNA total, así como del mRNA. De ambas figuras es característico destacar tanto los picos que se obtienen en el RNA total correspondientes al RNA de los ribosomas, así como el reducido tamaño de fragmentos que se obtiene en el patrón de mRNA, pues como se muestra en la figura, el mayor pico del electroferograma se obtiene a tiempos reducidos, que se corresponde con pequeños tamaños de fragmentos.

Las *Figuras 11A y 11B* detallan, como ejemplo representativo, el electroferograma obtenido del RNA extraído de dos de las muestras del presente estudio. Así pues, se puede afirmar que ambas muestras disponen de un RNA altamente degradado con el mayor porcentaje de fragmentos con un reducido tamaño, pues la banda del electroferograma es más alta y ancha para bajos tiempos.

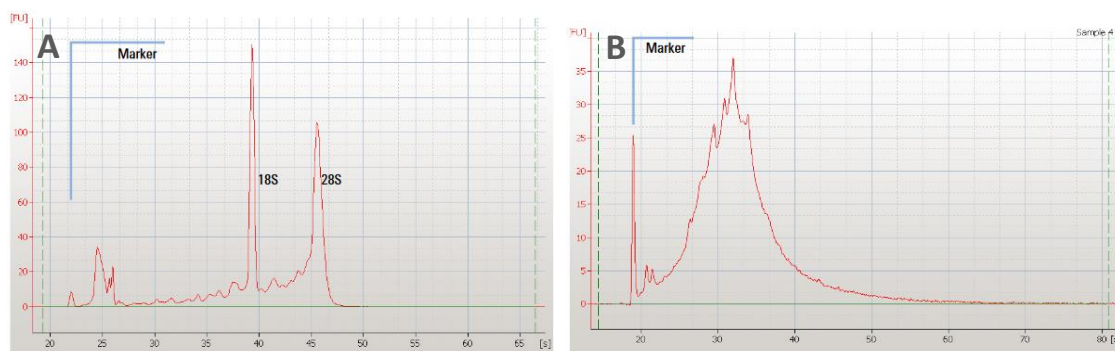


Figura 10. Electroferograma RNA total (A) y mRNA (B) (Agilent Technologies, USA).

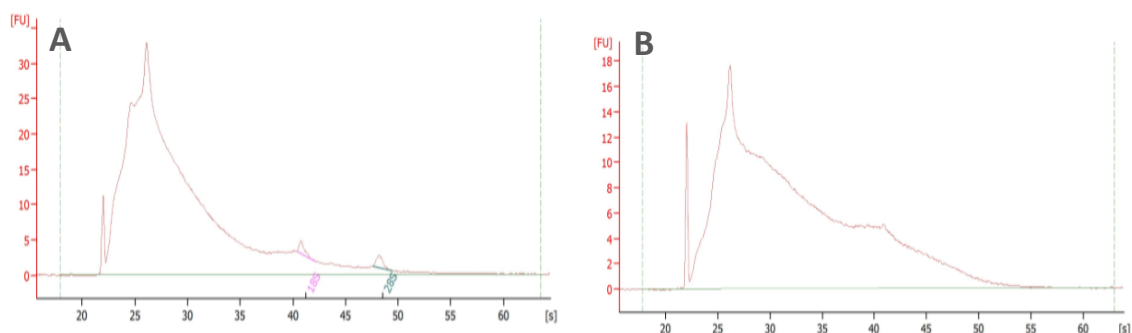


Figura 11. Electroferograma del RNA del paciente 1 (A) y del paciente 7 (B).

4.3.2 EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL RNA

La calidad del RNA extraído fue evaluada usando un nano-espectrofotómetro. El ratio A260/280 se encuentra próximo a 2 en la mayor parte de las muestras, indicando una buena pureza de las muestras de RNA. No obstante, algunas de ellas no alcanzan este valor, lo que puede indicar la presencia de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben a 280 nm.

Por otra parte, el ratio A260/230, que es esperable que se encuentre en el rango 2.0-2.2, en las muestras evaluadas es muy variable, generalmente menor del valor esperado, lo que nos informa de la presencia de impurezas contaminantes que absorben a 230 nm como los carbohidratos y fenoles (Patel *et al.*, 2017).

4.3.3 EFICIENCIAS Y LINEALIDAD

La eficiencia de cada sonda Taqman usada en este estudio se determinó usando el método de la pendiente de los Cts. Así pues, se obtuvieron los valores de los Cts para la dilución seriada de cada uno de los genes diana. Seguidamente, se construyó un gráfico con los valores de los logaritmos de las diluciones en el eje X y los valores de Ct en el eje Y, y se calculó la pendiente de la recta de regresión, que generalmente se encuentra próxima a -3,33, valor que representa un 100% de eficiencia de amplificación. Los resultados se muestran en la *Tabla 5*.

Tabla 5. Eficiencias para las sondas Taqman usadas en este estudio

GEN	PENDIENTE	EFICIENCIA	% EFICIENCIA
<i>GAPDH</i>	-2,82	2,26	100,00
<i>CCL19</i>	-3,64	1,88	94,15
<i>RGS16</i>	-3,70	1,86	93,20
<i>CD163L1</i>	-3,79	1,84	91,81
<i>ADGRE1</i>	-3,71	1,86	93,06

4.3.4 CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA

Para calcular la expresión génica relativa en las muestras de melanoma metastásico, se ha empleado la fórmula de Pfaffl (Pfaffl, 2001).

La elección del gen *GAPDH* como gen de normalización queda justificada dado que se trata de un gen endógeno, por lo que sirve de referencia para los análisis de RT-qPCR y ha sido usado, junto con *ACTB*, en más del 90% de estudios publicados en revistas de alto impacto (de Jonge *et al.*, 2007). Se trata de un gen que codifica para una proteína intermediaria en la vía glucolítica, por lo que se espera que se encuentre presente en todas las células y con una mínima variación en la expresión. No obstante, son varios los estudios que muestran que, debida a esta implicación en la ruta glucolítica, este gen ve modulada su expresión en función de las condiciones y tipos celulares que se están analizando, siendo esta expresión mayor en diversos tumores, incluido el melanoma (Silverthorn y Alani, 2010). Asimismo, actualmente se conoce que este gen también participa en otros procesos que pueden hacer que su expresión se vea alterada como son la endocitosis, la reparación y replicación del DNA, la apoptosis, etc. (Suzuki *et al.*, 2000).

Pese a las posibles variaciones en la expresión de este gen, es importante tener en cuenta que el tamaño de amplicón de *GAPDH* es de 58 pb mientras que el de los otros tres housekeepings testados: *ACTB*, *CDKN1B* y *GUSB* son de 171, 71 y 71 pb, respectivamente. Esta diferencia en el tamaño de amplicón con respecto al gen *GAPDH*, en nuestras muestras, es de vital importancia, dado que el elevado perfil de degradación que estas presentan hace que la amplificación sea muy variable e incluso resulte ineficiente en aquellos amplicones de gran tamaño. De esta forma, el gen *GAPDH* resulta el gen más adecuado de entre los cuatro inicialmente estudiados para la normalización de los datos de este estudio en el que se trabaja con muestras embebidas en parafina con un elevado nivel de degradación.

La expresión relativa de los genes (Figura 12) se evalúa considerando los valores de la mediana dado que esta se encuentra menos afectada por la variabilidad de los datos que la media, asegurando de esta forma la robustez estadística necesaria para los análisis.

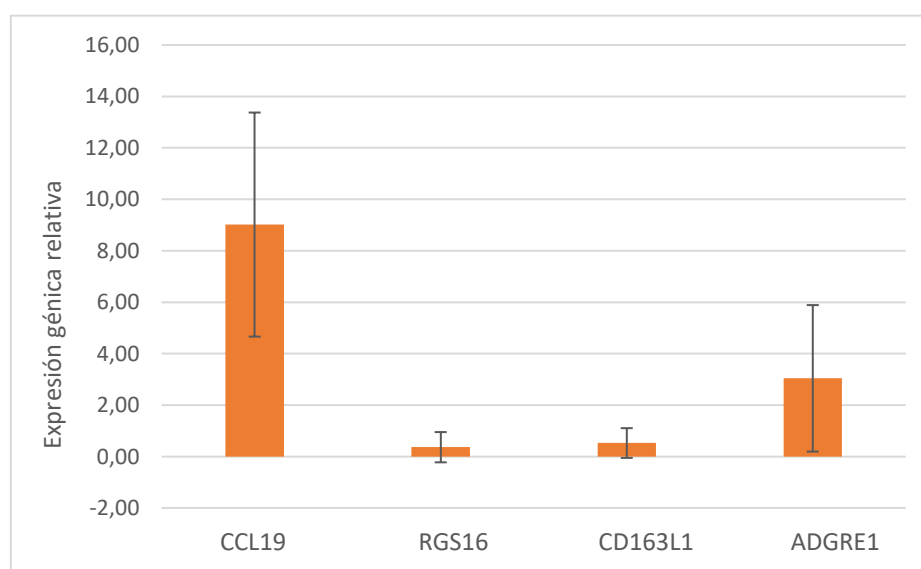


Figura 12. Expresión relativa de los 4 genes analizados por qPCR.

Se considera que un gen está sobreexpresado cuando la mediana de su expresión relativa es superior a 2, y que un gen está infraexpresado cuando la mediana se encuentra por debajo de 0.5. Usando este criterio, encontramos que los genes *CCL19* y *ADGRE1* se encuentran sobreexpresados en las muestras de melanoma metastásico estudiadas, mientras que el gen *RGS16* se encuentra infraexpresado. Por su parte, el gen *CD163L1* no presenta cambios significativos relacionados con su expresión.

En relación con la sobreexpresión de *CCL19* y *ADGRE1*, existen varios estudios en la literatura que lo corroboran. La sobreexpresión de *CCL19* en las muestras de melanoma metastásico evaluadas puede deberse a que se trata de una molécula generalmente sobreexpresada en las células tumorales de diversos tipos de cáncer (Zhang *et al.*, 2017) así como en macrófagos antiinflamatorios (Gibejova *et al.*, 2003), promoviendo la progresión tumoral. Por su parte, la sobreexpresión de *ADGRE1* queda justificada por el hecho de tratarse de un marcador altamente específico y general para los macrófagos maduros y diferenciados (Afik *et al.*, 2016; Aras y Zaidi, 2017). Con estos resultados de sobreexpresión génica podemos deducir que las muestras de melanoma metastásico evaluadas disponían de un alto infiltrado macrofágico. Por su parte, la infraexpresión de *RGS16* en las muestras de melanoma puede deberse a que esta molécula, al igual que sucede en otros tipos de tumores (Carper *et al.*, 2014; Hoshi *et al.*, 2016), se encuentra infraexpresada en las células tumorales del melanoma (Teras *et al.*, 2018), y es esta reducida expresión la que fomenta la proliferación e invasión tumoral. Por último, los niveles de expresión invariables de *CD163L1* obtenidos en las muestras evaluadas disponen de credibilidad basándonos en la literatura disponible sobre esta. Así pues, diversos estudios demuestran que esta es una molécula presente generalmente en macrófagos antiinflamatorios pero que, sin embargo, no es considerada un marcador general para este tipo celular dado que únicamente se encuentra expresada en diversos subgrupos (Gonzalez *et al.*, 2015; Gutierrez *et al.*, 2016). Así pues, teniendo en cuenta la localizada expresión de *CD163L1* junto con el hecho de que los macrófagos en los tumores son células infiltrantes y, por tanto, su presencia no es tan elevada como la de células tumorales, podemos afirmar que la expresión basal que se ha obtenido de esta molécula se adecúa a lo esperado.

4.4 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE EXPRESIÓN

4.4.1 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES POR qPCR

En la *Tabla 6* se muestran los resultados obtenidos tras analizar las correlaciones entre los 4 genes evaluados en 26 muestras mediante qPCR. Estos datos se obtienen mediante el estadístico Spearman, en el que se consideran significativamente estadísticos los valores de *p-value* (p) < 0,05.

Tabla 6. Valores *p-value* para los 4 marcadores analizados por qPCR con el estadístico Spearman.

	CCL19	RGS16	CD163L1	ADGRE1
CCL19	.	0,004	0,000	0,000
RGS16	0,004	.	0,002	0,000
CD163L1	0,000	0,002	.	0,000
ADGRE1	0,000	0,000	0,000	.

De la *Tabla 6* se deduce que existe correlación entre todos los genes estudiados, dado que: *CCL19-RGS16* ($p=0,004$); *CCL19-CD163L1* ($p=0,000$); *CCL19-ADGRE1* ($p=0,000$); *RGS16-CD163L1* ($p=0,002$); *RGS16-ADGRE1* ($p=0,000$) y *CD163L1-ADGRE1* ($p=0,000$).

Haciendo referencia a los datos que se muestran en la *Tabla 6*, podemos afirmar que existe una clara correlación entre la expresión de los cuatro genes evaluados, cuyos gráficos de coexpresión se detallan en el Anexo I.

La asociación entre *CCL19* y *RGS16*, ha sido previamente descrita en un estudio en el que se indica la regulación de la expresión de estas por la estimulación simultánea con IL-10 y LPS en células dendríticas (Schinnerling *et al.*, 2015), así como por la estimulación con IFN- γ en un estudio dermatológico (Johnson *et al.*, 2012). Asimismo, con respecto a la relación entre *CCL19* y *CD163L1*, Aguilera *et al.* (2013) reportan que estas se encuentran sobreexpresadas tras el tratamiento con un inhibidor tirosina-quinasa en células dendríticas derivadas de monocitos. Por su parte, *CCL19* y *ADGRE1* disponen de una correlación positiva, previamente indicada en el estudio de Osma *et al.* (2015) sobre la adhesión y migración en macrófagos. Por otra parte, se evidencia una correlación estadísticamente significativa entre *RGS16* y *CD163L1* y entre *RGS16* y *ADGRE1*, demostrada en la publicación de Cuevas *et al.* (2017), en la que se señala la inducción de la expresión de estas mediante LPS, así como la relación de estas moléculas con el fenotipo homeostático y antiinflamatorio de los macrófagos. Finalmente, destaca la relación entre *CD163L1* y *ADGRE1* indicada también en la publicación de González *et al.* en la que se muestra a ambas moléculas como marcadores característicos del fenotipo antiinflamatorio de los macrófagos (Gonzalez *et al.*, 2015).

4.4.2 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES POR IHC

Los resultados de las correlaciones de expresión de los 8 genes analizados en las células tumorales de 9 muestras de pacientes con melanoma metastásico se muestran en la *Tabla 7*, considerando significativamente estadísticos los valores de *p-value* (p) < 0,05.

Tabla 7. Valores *p-value* para los 8 marcadores analizados por IHC con el estadístico Spearman en células tumorales.

	ARNT2	BMP6	CD163L1	ADGRE1	CCL19	MMP12	RGS16	SOCS2
ARNT2	.	0,686	0,253	0,005	0,380	0,199	0,005	0,034
BMP6	0,686	.	0,085	0,564	0,108	0,622	0,426	0,335
CD163L1	0,253	0,085	.	0,091	0,098	0,285	0,018	0,080
ADGRE1	0,005	0,564	0,091	.	0,054	0,021	0,008	0,001
CCL19	0,380	0,108	0,098	0,054	.	0,130	0,346	0,042
MMP12	0,199	0,622	0,285	0,021	0,130	.	0,310	0,082
RGS16	0,005	0,426	0,018	0,008	0,346	0,310	.	0,011
SOCS2	0,034	0,335	0,080	0,001	0,042	0,082	0,011	.

De la *Tabla 7* se puede afirmar que existen numerosas correlaciones entre los genes analizados, de entre todas ellas, 7 nuevas correlaciones no demostradas con el análisis de qPCR. Estas nuevas correlaciones son: *ARNT2-ADGRE1* ($p=0,005$); *ARNT2-RGS16* ($p=0,005$); *ARNT2-SOCS2* ($p=0,034$); *ADGRE1-MMP12* ($p=0,021$); *ADGRE1-SOCS2* ($p=0,008$); *CCL19-SOCS2* ($p=0,042$) y *RGS16-SOCS2* ($p=0,011$).

Tras realizar una exhaustiva búsqueda bibliográfica de las correlaciones previamente indicadas, no se han obtenido estudios previos que reporten tales correlaciones en células tumorales. No obstante, sí que se han encontrado varias publicaciones que detallan las distintas asociaciones de expresión de estos genes en macrófagos. La coexpresión de *ARNT2* y *ADGRE1* y *ARNT2* y *SOCS2* se demuestra en el estudio de Delgado (2017) en el que se indica que ambas moléculas aumentan su regulación en macrófagos, determinando una polarización antiinflamatoria de macrófagos. La correlación entre *ARNT2* y *RGS16* la reportan Dvorkin *et al.* (2016) en su estudio de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. La correlación entre *ADGRE1* y *MMP12* se detalla en otros estudios indicando el uso de la expresión de *ADGRE1* para la identificación de macrófagos con expresión de *MMP12* (Lee *et al.*, 2014) así como la sobreexpresión de ambas moléculas en un análisis por qPCR (Razavian *et al.*, 2016). Por otro lado, la relación entre *ADGRE1* y *SOCS2* se demuestra en el estudio de Hu *et al.*, en el que emplean el marcador *ADGRE1* para identificar los macrófagos en los que realizar el estudio (Hu *et al.*, 2012). Con respecto a la correlación existente entre *CCL19* y *SOCS2*, destaca el estudio de

Delgado, en el que se indica la expresión de ambas moléculas en macrófagos tras la estimulación con LPS (Delgado, 2017). Finalmente, la asociación entre *RGS16* y *SOCS2* se ha demostrado en el estudio de Shankar *et al.* (2012), en el que se detalla una reducida expresión de *SOCS2* en el infiltrado de los pulmones de un ratón con linfocitos T naïve *RGS16*^{-/-}.

Para completar el estudio de correlaciones en células tumorales se ha realizado una búsqueda *in silico* en el buscador “SEEK” para cada una de ellas. Así pues, la única correlación significativa que aparece es la de *ADGRE1-MMP12* ($p=0,0026$). El resto de correlaciones analizadas, en el buscador empleado, no se consideran estadísticamente significativas, posiblemente debido a que, por el momento, no se han reportado suficientes datos como para obtener tales resultados. Esto podría indicarnos que, con nuestro estudio, se están planteando nuevas correlaciones en expresión de genes a nivel tumoral hasta el momento no publicadas.

Los resultados que se obtienen referentes a las correlaciones de expresión de los 8 genes analizados en los macrófagos de 9 muestras se indican en la *Tabla 8*, en la que se consideran significativamente estadísticos los valores de *p-value* (p) < 0,05.

Tabla 8. Valores *p-value* para los 8 marcadores analizados por IHC con el estadístico Spearman en macrófagos.

	ARNT2	BMP6	CD163L1	ADGRE1	CCL19	MMP12	RGS16	SOCS2
ARNT2	.	0,801	0,004	0,397	0,002	0,000	0,003	0,010
BMP6	0,801	.	0,711	0,102	0,771	0,505	0,066	0,267
CD163L1	0,004	0,711	.	0,394	0,011	0,004	0,003	0,005
ADGRE1	0,397	0,102	0,394	.	0,822	0,772	0,853	0,817
CCL19	0,002	0,771	0,011	0,822	.	0,003	0,024	0,024
MMP12	0,000	0,505	0,004	0,772	0,003	.	0,005	0,019
RGS16	0,003	0,066	0,003	0,853	0,024	0,005	.	0,000
SOCS2	0,010	0,267	0,005	0,817	0,024	0,019	0,000	.

De la *Tabla 8* se puede afirmar que existen numerosas correlaciones entre los genes analizados, de entre todas ellas, 8 nuevas correlaciones no demostradas con el análisis de qPCR ni con los análisis de expresión por IHC en células tumorales. Estas nuevas correlaciones son: *ARNT2-CD163L1* ($p=0,004$); *ARNT2-CCL19* ($p=0,002$); *ARNT2-MMP12* ($p=0,000$); *CD163L1-MMP12* ($p=0,004$); *CD163L1-SOCS2* ($p=0,005$); *CCL19-MMP12* ($p=0,003$); *MMP12-RGS16* ($p=0,005$) y *MMP12-SOCS2* ($p=0,019$).

La asociación entre *ARNT2-CD163L1* se demuestra en el estudio llevado a cabo por Ren *et al.* (2017). Con respecto a las coexpresiones de *MMP12-RGS16*, *CCL19-MMP12* y *CD163L1-SOCS2*, quedan confirmadas con los datos aportados por Delgado, quién expone la implicación de tales moléculas en la determinación del fenotipo antiinflamatorio de macrófagos (Delgado, 2017). Asimismo, este mismo autor corrobora la correlación que obtenemos entre *ARNT2* y *CCL19*, afirmando que ambas moléculas se encuentran reguladas positivamente en macrófagos que han sido estimulados con LPS. Por otra parte, Riera *et al.* (2019) confirman la asociación entre *ARNT2* y *MMP12* al encontrarse ambos sobreexpresados en macrófagos estimulados con LPS. Con respecto a la correlación obtenida entre *CD163L1* y *MMP12*, Ju y Tacke (2016) indican que *CD163L1* es considerado uno de los marcadores para los macrófagos residentes en el tejido, así como que *MMP12* es uno de los marcadores característicos de los macrófagos que promueven la resolución de la inflamación, destacando la coexpresión de ambas moléculas en este tipo celular. Finalmente, la relación entre *MMP12* y *SOCS2* se demuestra en varios estudios en los que se señala que ambos genes se encuentran regulados en el glioma (Szulzewsky *et al.*, 2015) y que pertenecen al fenotipo antiinflamatorio de los macrófagos (Denisenko *et al.*, 2017).

Para completar el estudio de correlaciones en macrófagos se ha realizado una búsqueda *in silico* en el buscador “SEEK” para cada una de ellas. Así pues, las únicas correlaciones no

significativas con los datos empleados por este buscador parecen ser *ARNT2-MMP12* ($p=0,3508$) y *CD163L1-SOCS2* ($p=0,2331$). El resto de las correlaciones que se han demostrado a nivel experimental en nuestro estudio se confirman con el análisis realizado en este buscador, pues todas ellas tienen significancia estadística.

4.4.3 ANÁLISIS DE CORRELACIÓN DE EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES POR qPCR E IHC

Los resultados referentes a las correlaciones de expresión de los 4 genes analizados en las células tumorales tanto por qPCR como por IHC se muestran en la *Tabla 9*, en la que se consideran significativamente estadísticos los valores de *p-value* (p) < 0,05.

Tabla 9. Valores *p-value* para los 4 marcadores analizados por qPCR y IHC con el estadístico Spearman en células tumorales

	CCL19	RGS16	CD163L1	ADGRE1
CCL19	0,499	0,125	0,280	0,231
RGS16	0,321	0,461	0,381	0,231
CD163L1	0,784	0,084	0,191	0,123
ADGRE1	0,461	0,354	0,381	0,686

Respecto a los datos que se muestran anteriormente, podemos afirmar que no existe correlación en los resultados de expresión obtenidos por IHC y por qPCR en ninguno de los 4 genes evaluados. Posiblemente estos resultados se deban al reducido número de muestras analizadas (6 muestras) con ambas técnicas, pues los tests estadísticos no resultan eficientes con tan bajo tamaño muestral.

No obstante, complementario al análisis anteriormente indicado, se ha realizado un estudio muestra a muestra del posible emparejamiento de los resultados de expresión con ambas técnicas. Los criterios de expresión que se siguen para considerar que ambas técnicas ofrecen un resultado positivo para el marcador evaluado son el tener un IRS ≥ 7 , y una expresión relativa superior a la mediana de expresión del gen estudiado.

Para el marcador CCL19, obtenemos que 5 de las muestras cumplen ambos criterios. Asimismo, en la evaluación del marcador RGS16 vemos como la mitad de las muestras evaluadas superan los valores umbrales establecidos para considerarse positivas en ambas técnicas. Con respecto al marcador CD163L1, resulta positivo en 2 de las muestras, mientras que en el estudio del marcador ADGRE1, 4 muestras cumplen los criterios de positividad. Estos resultados nos informan de que ambos procedimientos resultan igualmente satisfactorios para el estudio de expresión llevado a cabo en este trabajo, pues en 3 de los 4 marcadores, más de la mitad de las muestras evaluadas presentan correlación en los resultados obtenidos con estas técnicas. No obstante, se recomendaría aumentar el tamaño muestral para verificar los resultados obtenidos.

5. CONCLUSIONES

1. El estudio por IHC y el empleo del IRS como criterio de clasificación de la positividad de las muestras resulta un método satisfactorio para conocer la expresión de los marcadores de macrófagos estudiados.
2. En el análisis por qPCR se ha puesto de manifiesto que la elevada expresión de *CCL19* y *ADGRE1*, así como la baja expresión de *RGS16* caracterizan este estudio de muestras de melanoma metastásico.
3. El estudio por qPCR de las correlaciones génicas mostró un patrón de coexpresión entre los genes estudiados, ya que todos ellos son considerados marcadores específicos del fenotipo antiinflamatorio de macrófagos.
4. El estudio de las correlaciones en células tumorales mostró un patrón de coexpresión entre varios de los genes estudiados, siendo la gran mayoría demostrados por primera vez en este trabajo.
5. El estudio de las correlaciones en macrófagos mostró un patrón de coexpresión entre la gran mayoría de los genes evaluados por tratarse, todos ellos, de marcadores característicos del fenotipo antiinflamatorio de macrófagos.

6. REFERENCIAS

- AFIK, R.; ZIGMOND, E.; VUGMAN, M.; KLEPFISH, M.; SHIMSHONI, E.; PASMNIK, M.; SHENOY, A.; BASSAT, E.; HALPERN, Z.; GEIGER, T.; SAGI, I. Y VAROL, C. (2016). Tumor macrophages are pivotal constructors of tumor collagenous matrix. *The Journal Of Experimental Medicine*, 213(11), 2315-2331.
- AGUILERA, N.; CHAMORRO, S.; NIETO, C.; SANCHEZ-CABO, F.; DOPAZO, A.; FERNANDEZ, P.; RODRÍGUEZ, J.; PELLO, O.; ANDRÉS, V.; CUENDA, A.; ALONSO, B.; DOMÍNGUEZ, A.; SÁNCHEZ, S. Y CORBÍ, A.L. (2013). Aryl hydrocarbon receptor contributes to the MEK/ERK-dependent maintenance of the immature state of human dendritic cells. *Blood*, 121(15), 108-117.
- ALATRASH, G.; JAKHER, H.; STAFFORD, P. Y MITTENDORF, E. (2013). Cancer immunotherapies, their safety and toxicity. *Expert Opinion On Drug Safety*, 12(5), 631-645.
- ARAS, S. Y ZAIDI, M. (2017). TAMEless traitors: macrophages in cancer progression and metastasis. *British Journal Of Cancer*, 117(11), 1583-1591.
- ASCIERTO, M.; MAKOHON, A.; LIPSON, E.; TAUBE, J.; MCMILLER, T.; BERGER, A.; FAN, J.; KAUNITZ, G.; COTTRELL, T.; KOHUTEK, Z.; FAVOROV, A.; MAKAROV, V.; RIAZ, N.; CHAN, T.; COPE, L.; HRUBAN, R.; PARDOLL, D.; TAYLOR, B.; SOLIT, D.; IACOBUIZIO, C. Y TOPALIAN, S. (2017). Transcriptional Mechanisms of Resistance to Anti-PD-1 Therapy. *Clinical Cancer Research*, 23(12), 3168-3180.
- AUSTYN, J. Y GORDON, S. (1981). F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *European Journal Of Immunology*, 11(10), 805-815.
- BASTIAN, A.; NICHITA, L. Y ZURAC, S. (2019). Matrix Metalloproteinases in Melanoma with and without Regression, en: *The Role of Matrix Metalloproteinase in Human Body Pathologies*. Editorial IntechOpen. Inglaterra.
- BHATIA, S.; TYKODI, S.S. Y THOMPSON, J.A. (2009). Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology*, 23(6), 488-496.
- BROCHÉRIOU, I.; MAOUCHE, S.; DURAND, H.; BRAUNERSREUTHER, V.; LE NAOUR, G.; GRATCHEV, A.; KOSKAS, F.; MACH, F.; KZHYSKOWSKA, J. Y NINIO, E. (2011). Antagonistic regulation of macrophage phenotype by M-CSF and GM-CSF: Implication in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 214(2), 316-324.
- BRUNET, J.; DENIZOT, F.; LUCIANI, M.; ROUX, M.; SUZAN, M.; MATTEI, M. Y GOLSTEIN, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature*, 328(6127), 267-270.
- CARPER, M.; DENVIR, J.; BOSKOVIC, G.; PRIMERANO, D. Y CLAUDIO, P. (2014). RGS16, a novel p53 and pRb cross-talk candidate inhibits migration and invasion of pancreatic cancer cells. *Genes & Cancer*, 5(11-12), 420-435.
- CHENG, H.; ONDER, L.; CUPOVIC, J.; BOESCH, M.; NOVKOVIC, M.; PIKOR, N.; TARANTINO, I.; RODRIGUEZ, R.; SCHNEIDER, T.; JOCHUM, W.; BRUTSCHE, M. Y LUDEWIG, B. (2018). CCL19-producing fibroblastic stromal cells restrain lung carcinoma growth by promoting local antitumor T-cell responses. *Journal Of Allergy And Clinical Immunology*, 142(4), 1257-1271.
- COOPER, G. Y HAUSMAN, R. (2000). *The cell; a molecular approach*. Editorial Oxford. Inglaterra.
- CORICOVAC, D.; DEHELEAN, C.; MOACA, E.; PINZARU, I.; BRATU, T.; NAVOLAN, D. Y BORUGA, O. (2018). Cutaneous Melanoma—A Long Road from Experimental Models to Clinical Outcome: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1566.
- CRISTIANI, C.; TURDO, A.; VENTURA, V.; APUZZO, T.; CAPONE, M.; MADONNA, G.; MALLARDO, D.; GAROFALO, C.; GIOVANNONE, E.; GRIMALDI, A.; TALLERICO, R.; MARCENARO, E.; PESCE, S.; DEL ZOTTO, G.; AGOSTI, V.; COSTANZO, F.; GULLETTA, E.; RIZZO, A.; MORETTA, A.; KARRE, K.; ASCIERTO, P.; TODARO, M. Y CARBONE, E. (2019). Accumulation of Circulating CCR7+ Natural Killer Cells Marks Melanoma Evolution and Reveals a CCL19-Dependent Metastatic Pathway. *Cancer Immunology Research*, 7(5), 841-852.
- CUEVAS, V.; ANTA, L.; SAMANIEGO, R.; ORTA, E.; VLADIMIR DE LA ROSA, J.; BAUJAT, G.; DOMÍNGUEZ, Á.; SÁNCHEZ, P.; ESCRIBESE, M.; CASTRILLO, A.; CORMIER, V.; VEGA, M. Y CORBÍ, A.L. (2017). MAFB Determines Human Macrophage Anti-Inflammatory Polarization: Relevance for the Pathogenic Mechanisms Operating in Multicentric Carpotarsal Osteolysis. *The Journal Of Immunology*, 198(5), 2070-2081.

- DARBY, S.; CROSS, S.; BROWN, N.; HAMDY, F. Y ROBSON, C. (2007). BMP-6 over-expression in prostate cancer is associated with increased Id-1 protein and a more invasive phenotype. *The Journal Of Pathology*, 214(3), 394-404.
- DE JONGE, H.; FEHRMANN, R.; DE BONT, E.; HOFSTRA, R.; GERBENS, F.; KAMPS, W.; DE VRIES, E.; VAN DER ZEE, A.; TE MEERMAN, G. Y TER ELST, A. (2007). Evidence Based Selection of Housekeeping Genes. *PLOS ONE*, 2(9), 898.
- DECOCK, J.; THIRKETTLE, S.; WAGSTAFF, L. Y EDWARDS, D. (2011). Matrix metalloproteinases: protective roles in cancer. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, 15(6), 1254-1265.
- DELGADO, V. (2017). Perfil transcripcional de macrófagos antiinflamatorios humanos en condiciones de homeostasis, activación y patológicas. Tesis Doctoral en Ciencias Químicas. Univ. Complutense de Madrid. 146 pp.
- DENG, J.; LE MERCIER, I.; KUTA, A. Y NOELLE, R. (2016). A New VISTA on combination therapy for negative checkpoint regulator blockade. *Journal For Immunotherapy Of Cancer*, 4(1).
- DENISENKO, E.; GULER, R.; MHLANGA, M.; SUZUKI, H; BROMBACHER, F. Y SCHMEIER, S. (2017). Genome-wide profiling of transcribed enhancers during macrophage activation. *Epigenetics & Chromatin*, 10(1), 50
- DIGGS, L. Y RIPLEY, R. (2018). The good, the bad, and the uncertain: Can matrix metalloproteinase 12 simultaneously be protumorigenic and antitumorigenic? *The Journal Of Thoracic And Cardiovascular Surgery*, 155(5), 2162-2163.
- DOBNER, B.; RIECHARDT, A.; JOUSSEN, A.; ENGLERT, S. Y BECHRAKIS, N. (2012). Expression of haematogenous and lymphogenous chemokine receptors and their ligands on uveal melanoma in association with liver metastasis. *Acta Ophthalmologica*, 90(8), 638-644.
- DUMAZ, N.; HAYWARD, R.; MARTIN, J.; OGILVIE, L.; HEDLEY, D.; CURTIN, J.; BASTIAN, B.; SPRINGER, C. Y MARAIS, R. (2006). In melanoma, RAS mutations are accompanied by switching signaling from BRAF to CRAF and disrupted cyclic AMP signaling. *Cancer Research*, 66(19), 9483-9491.
- DVORKIN, A.; VANDERSTOCKEN, G.; YILDIRIM, A.; BRANDSMA, C.; OBEIDAT, M.; BOSSÉ, Y.; HASSELL, J. Y STAMPFLI, M. (2016). Total particulate matter concentration skews cigarette smoke's gene expression profile. *ERJ Open Research*, 2(4), 00029-2016.
- ECKHART, L.; BACH, J.; BAN, J. Y TSCHACHLER, E. (2000). Melanin Binds Reversibly to Thermostable DNA Polymerase and Inhibits Its Activity. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 271(3), 726-730.
- EVANS, M.; MADHUNAPANTULA, S.; ROBERTSON, G. Y DRABICK, J. (2012). Current and Future Trials of Targeted Therapies in Cutaneous Melanoma. *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 779, 223-255.
- FEDCHENKO, N. Y REIFENRATH, J. (2014). Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue – a review. *Diagnostic Pathology*, 9(1), 221.
- FUJIMURA, T.; KAMBAYASHI, Y.; FUJISAWA, Y.; HIDAKA, T. Y AIBA, S. (2018). Tumor-Associated Macrophages: Therapeutic Targets for Skin Cancer. *Frontiers In Oncology*, 8(3).
- FURUTA, J.; INOZUME, T.; HARADA, K. Y SHIMADA, S. (2014). CD271 on Melanoma Cell Is an IFN- γ -Inducible Immunosuppressive Factor that Mediates Downregulation of Melanoma Antigens. *Journal Of Investigative Dermatology*, 134(5), 1369-1377.
- GATTO, F.; FEELDERS, R.; VAN DER PAS, R.; KROS, J.; WAAIJERS, M.; SPIJ, D.; NEGGERS, S.; VAN DER LELIJ, A.; MINUTO, F.; LAMBERTS, S.; DE HERDER, W.; FERONE, D. Y HOFLAND, L. (2013). Immunoreactivity Score Using an Anti-sst2A Receptor Monoclonal Antibody Strongly Predicts the Biochemical Response to Adjuvant Treatment with Somatostatin Analogs in Acromegaly. *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(1), 66-71.
- GERSHENWALD, J.; SCOLYER, R.; HESS, K., SONDAK, V.; LONG, G.; ROSS, M.; LAZAR, A.; FARIES, M.; KIRKWOOD, J.; MCARTHUR, G.; HAYDU, L.; EGGERMONT, A.; FLAHERTY, K.; BALCH, C. Y THOMPSON, J. (2017). Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 67(6), 472-492.
- GHAFOURI, S.; OSKOOEI, V.; AZARI, I. Y TAHERI, M. (2018). Suppressor of cytokine signaling (SOCS) genes are downregulated in breast cancer. *World Journal Of Surgical Oncology*, 16(1), 226.

- GHOSH, N.; KOBAWALA, T.; TRIVEDI, T.; GAJJAR, K. Y PATEL, G. (2017). Significance of expression of suppressor of cytokine signaling proteins: Suppressor of cytokine signaling-1, suppressor of cytokine signaling-2, and suppressor of cytokine signaling-3 in papillary thyroid cancer. *Journal Of Cancer Research And Therapeutics*, 13(2), 337-345.
- GIAMBERNARDI, T.; RODECK, U. Y KLEBE, R. (1998). Bovine Serum Albumin Reverses Inhibition of RT-PCR by Melanin. *Biotechniques*, 25(4), 564-566.
- GIBEJOVA, A.; MRAZEK, F.; SUBRTOVA, D.; SEKEROVA, V.; SZOTKOWSKA, J.; KOLEK, V.; DU BOIS, R. Y PETREK, M. (2003). Expression of Macrophage Inflammatory Protein-3 β /CCL19 in Pulmonary Sarcoidosis. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, 167(12), 1695-1703.
- GLOBAL CANCER OBSERVATORY (GLOBOCAN). (2018). Europe. (Fecha de consulta: 20 de Mayo de 2019). Available at: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/908-europe-fact-sheets.pdf>
- GLOBAL CANCER OBSERVATORY (GLOBOCAN). (2018). Spain. (Fecha de consulta: 20 de Mayo de 2019). Available at: <http://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/724-spain-fact-sheets.pdf>
- GONZALEZ, E.; SAMANIEGO, R.; FLORES, J.; CAMPOS, S.; GOMEZ, G.; SALAS, A.; CAMPOS, V.; CORBÍ, A.; SÁNCHEZ, P. Y SÁNCHEZ, C. (2015). CD163L1 and CLEC5A discriminate subsets of human resident and inflammatory macrophages in vivo. *Journal Of Leukocyte Biology*, 98(4), 453-466.
- GORDON, S. Y TAYLOR, P. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*, 5(12), 953-964.
- GRØNLUND, J.; VITVED, L.; LAUSEN, M.; SKJØDT, K. Y HOLMSKOV, U. (2000). Cloning of a Novel Scavenger Receptor Cysteine-Rich Type I Transmembrane Molecule (M160) Expressed by Human Macrophages. *The Journal Of Immunology*, 165(11), 6406-6415.
- GUTIERREZ, A.; MARTINEZ, M.; SAMANIEGO, R.; ARELLANO, N.; SALINAS, L.; RELLOSO, M.; VALERI, A.; MARTÍNEZ, J.; CORBÍ, A.; HIDALGO, A.; GARCÍA, Á.; TEIXIDÓ, J. Y SÁNCHEZ, P. (2016). Evaluation of the potential therapeutic benefits of macrophage reprogramming in multiple myeloma. *Blood*, 128(18), 2241-2252.
- HAFFNER, M.; PETRIDOU, B.; PEYRAT, J.; REVILLION, F.; MULLER, E.; DAXENBICHLER, G.; MARTH, C. Y DOPPLER, W. (2007). Favorable prognostic value of SOCS2 and IGF-I in breast cancer. *BMC Cancer*, 7:136.
- HANAHAN, D. Y WEINBERG, R. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- HANAHAN, D. Y WEINBERG, R. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
- HANKINSON, O. (2008). Why Does ARNT2 Behave Differently from ARNT? *Toxicological Sciences*, 103(1), 1-3.
- HEID, C.; STEVENS, J.; LIVAK, K. Y WILLIAMS, P. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994.
- HERVIEU, A.; RÉBÉ, C.; VÉGRAN, F.; CHALMIN, F.; BRUCHARD, M.; VABRES, P.; APETOH, L.; GHIRINGHELLI, F. Y MIGNOT, G. (2013). Dacarbazine-Mediated Upregulation of NKG2D Ligands on Tumor Cells Activates NK and CD8 T Cells and Restrains Melanoma Growth. *Journal Of Investigative Dermatology*, 133(2), 499-508.
- HILLINGER, S.; YANG, S.; BATRA, R.; STRIETER, R.; WEDER, W.; DUBINETT, S. Y SHARMA, S. (2006). CCL19 reduces tumour burden in a model of advanced lung cancer. *British Journal Of Cancer*, 94(7), 1029-1034.
- HOEFER, J.; KERN, J.; OFER, P.; EDER, I.; SCHÄFER, G.; DIETRICH, D.; KRISTIANSEN, G.; GELEY, S.; RAINER, J.; GUNSILIUS, E.; KLOCKER, H.; CULIG, Z. Y PUHR, M. (2013). SOCS2 correlates with malignancy and exerts growth-promoting effects in prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 21(2), 175-187.
- HONG, J.; LEE, G.; LEE, J.; KWON, S.; PARK, S.; KIM, S. Y KIM, I. (2009). Effect of bone morphogenetic protein-6 on macrophages. *Immunology*, 128(1), 442-450.
- HOSHI, Y.; ENDO, K.; SHIRAKIHARA, T.; FUKAGAWA, A.; MIYAZAWA, K. Y SAITOH, M. (2016). The potential role of regulator of G-protein signaling 16 in cell motility mediated by δ EF1 family proteins. *FEBS Letters*, 590(2), 270-278.
- HSU, M.; ROVINSKY, S.; PENMATCHA, S.; HERLYN, M. Y MUIRHEAD, D. (2005). Bone morphogenetic proteins in melanoma: Angel or devil? *Cancer And Metastasis Reviews*, 24(2), 251-263.
- HU, J.; LOU, D.; CAROW, B.; WINERDAL, M.; ROTTENBERG, M.; WIKSTRÖM, A.; NORSTEDT, G. Y WINQVIST, O. (2012). LPS Regulates SOCS2 Transcription in a Type I Interferon Dependent Autocrine-Paracrine Loop. *PLOS ONE*, 7(1), 30166.
- HU, J.; WINQVIST, O.; FLORES-MORALES, A.; WIKSTRÖM, A. Y NORSTEDT, G. (2009). SOCS2 Influences LPS Induced Human Monocyte-Derived Dendritic Cell Maturation. *PLOS ONE*, 4(9), 7178.

- HU, M.; CUI, F.; LIU, F.; WANG, J.; WEI, X. Y LI, Y. (2016). BMP signaling pathways affect differently migration and invasion of esophageal squamous cancer cells. *International Journal Of Oncology*, 50(1), 193-202.
- HWANG, H.; SHIN, C.; PARK, J.; KANG, E.; CHOI, B.; HAN, J.; DO, Y.; RYU, S. Y CHO, Y. (2016). Human breast cancer-derived soluble factors facilitate CCL19-induced chemotaxis of human dendritic cells. *Scientific Reports*, 6, 30207.
- IGLESIAS, D.; CHUAN, Y.; WIKSTRÖM, P.; AUGSTEN, S.; JIANG, N.; NIU, Y.; SEIPEL, A.; DANNEMAN, D.; VERMEIJ, M.; FERNANDEZ, L.; JENSTER, G.; EGEVAD, L.; NORSTEDT, G. Y FLORES, A. (2013). SOCS2 mediates the cross talk between androgen and growth hormone signaling in prostate cancer. *Carcinogenesis*, 35(1), 24-33.
- ITALIANI, P. Y BORASCHI, D. (2014). From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation. *Frontiers In Immunology*, 5, 514.
- JEONG, H.; HWANG, I.; KANG, S.; SHIN, H. Y KWON, S. (2019). Tumor-Associated Macrophages as Potential Prognostic Biomarkers of Invasive Breast Cancer. *Journal Of Breast Cancer*, 22(1), 38-51.
- JIA, Y.; HAO, S.; JIN, G.; LI, H.; MA, X.; ZHENG, Y.; XIAO, D. Y WANG, Y. (2018). Overexpression of ARNT2 is associated with decreased cell proliferation and better prognosis in gastric cancer. *Molecular And Cellular Biochemistry*, 450(1-2), 97-103.
- JILAVEANU, L.; AZIZ, S. Y KLUGER, H. (2009). Chemotherapy and biologic therapies for melanoma: do they work? *Clinics In Dermatology*, 27(6), 614-625.
- JOHNSON, L.; SUÁREZ, M.; PIERSON, K.; FUENTES, J.; CUETO, I.; LENTINI, T.; SULLIVAN, M.; GILLEAUDEAU, P.; KRUEGER, J.; HAIDER, A. Y LOWES, M. (2012). A Single Intradermal Injection of IFN- γ Induces an Inflammatory State in Both Non-Lesional Psoriatic and Healthy Skin. *Journal Of Investigative Dermatology*, 132(4), 1177-1187.
- JU, C. Y TACKE, F. (2016). Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cellular & Molecular Immunology*, 13(3), 316-327.
- KERKELÄ, E.; ALA, R.; JESKANEN, L.; RECHARDT, O.; GRÉNMAN, R.; SHAPIRO, S.; KÄHÄRI, V. Y SAARIALHO, U. (2000). Expression of Human Macrophage Metalloelastase (MMP-12) by Tumor Cells in Skin Cancer. *Journal Of Investigative Dermatology*, 114(6), 1113-1119.
- KERKELÄ, E.; ALA, R.; KLEMI, P.; GRÉNMAN, S.; SHAPIRO, S.; KÄHÄRI, V.; Y SAARIALHO, U. (2002). Metalloelastase (MMP-12) expression by tumour cells in squamous cell carcinoma of the vulva correlates with invasiveness, while that by macrophages predicts better outcome. *The Journal Of Pathology*, 198(2), 258-269.
- KIM, J.; LEE, M.; YU, G.; KIM, S.; JANG, K.; YU, H.; CHO, B. Y KIM, D. (2018). Alterations in the p53-SOCS2 axis contribute to tumor growth in colon cancer. *Experimental & Molecular Medicine*, 50(4).
- KIMURA, Y.; KASAMATSU, A.; NAKASHIMA, D.; YAMATOJI, M.; MINAKAWA, Y.; KOIKE, K.; FUSHIMI, K.; HIGO, M.; ENDO, Y.; SHIIBA, M.; TANZAWA, H. Y UZAWA, K. (2016). ARNT2 Regulates Tumoral Growth in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal Of Cancer*, 7(6), 702-710.
- KUGIMIYA, F.; KAWAGUCHI, H.; KAMEKURA, S.; CHIKUDA, H.; OHBA, S.; YANO, F.; OGATA, N.; KATAGIRI, T.; HARADA, Y.; AZUMA, Y.; NAKAMURA, K. Y CHUNG, U. (2005). Involvement of Endogenous Bone Morphogenetic Protein (BMP) 2 and BMP6 in Bone Formation. *Journal Of Biological Chemistry*, 280(42), 35704-35712.
- KUMAR, G.; KIERNAN, J.; GILL, G.; BADVE, S.; FLOYD, A.; DAPSON, R.; LYON, H.; HOROBIN, R.; SMITH, S.; HAFER, L.; JONES, L.; SAXENA, R.; HENWOOD, A.; NOWACEK, J.; WOOD, D.; ATKINSON, R.; BROWN, J.; SMOLLER, B. Y LAURINO, L. (2010). Special stains and H&E. Editorial Fisher Scientific. USA. 150 pp.
- KUNZ, M. Y VERA, J. (2019). Modelling of Protein Kinase Signaling Pathways in Melanoma and Other Cancers. *Cancers*, 11(4), 465.
- LEACH, D.; KRUMMEL, M. Y ALLISON, J. (1996). Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA4 Blockade. *Science*, 271(5256), 1734-1736.
- LEE, G.; KANG, D.; HA, Y.; JUNG, Y.; CHUNG, J.; MIN, K.; KIM, T.; MOON, K.; CHUNG, J.; LEE, D.; JIM, W. Y KIM, I. (2014). Prostate cancer bone metastases acquire resistance to androgen deprivation via WNT5A-mediated BMP-6 induction. *British Journal Of Cancer*, 110(6), 1634-1644.
- LIANG, G.; BANSAL, G.; XIE, Z.; Y DRUEY, K. (2009). RGS16 Inhibits Breast Cancer Cell Growth by Mitigating Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. *Journal Of Biological Chemistry*, 284(32), 21719-21727.

- LIN, H.; FAUNCE, D.; STACEY, M.; TERAJEWICZ, A.; NAKAMURA, T.; ZHANG, J.; KERLEY, M.; MUCENSKI, M.; GORDON, S. Y STEIN, J. (2005). The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *The Journal Of Experimental Medicine*, 201(10), 1615-1625.
- MALTEPE, E.; KEITH, B.; ARSHAM, A.; BRORSON, J.; Y SIMON, M. (2000). The Role of ARNT2 in Tumor Angiogenesis and the Neural Response to Hypoxia. *Biochemical And Biophysical Research Communications*, 273(1), 231-238.
- MARINI, A.; MIRMHAMMADSADEGH, A.; NAMBIAR, S.; GUSTRAU, A.; RUZICKA, T. Y HENGGE, U. (2006). Epigenetic Inactivation of Tumor Suppressor Genes in Serum of Patients with Cutaneous Melanoma. *Journal Of Investigative Dermatology*, 126(2), 422-431.
- MARQUETTE, A.; BAGOT, M.; BENSUSSAN, A. Y DUMAZ, N. (2007). Recent discoveries in the genetics of melanoma and their therapeutic implications. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, 55(6), 363-372.
- MEDREK, C.; PONTÉN, F.; JIRSTRÖM, K. Y LEANDERSSON, K. (2012). The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer*, 12(1).
- MIGNOGNA, C.; SCALI, E.; CAMASTRA, C.; PRESTA, I.; ZEPPA, P.; BARNI, T.; DONATO, G.; BOTTONI, U. Y DI VITO, A. (2017). Innate immunity in cutaneous melanoma. *Clinical And Experimental Dermatology*, 42(3), 243-250.
- MIYOSHI, N.; ISHII, H.; SEKIMOTO, M.; DOKI, Y. Y MORI, M. (2009). RGS16 Is a Marker for Prognosis in Colorectal Cancer. *Annals Of Surgical Oncology*, 16(12), 3507-3514.
- MOELLER, J.; NIELSEN, M.; REICHHARDT, M.; SCHLOSSER, A.; SORENSEN, G.; NIELSEN, O.; TORNOE, I.; GRONLUND, J.; NIELSEN, M.; JORGENSEN, J.; JENSEN, O.; MOLLENHAUER, J.; MOESTRUP, S. Y HOLMSKOV, U. (2012). CD163-L1 Is an Endocytic Macrophage Protein Strongly Regulated by Mediators in the Inflammatory Response. *The Journal Of Immunology*, 188(5), 2399-2409.
- MONTEAGUDO, C.; PELLÍN, A.; MARTÍN, J. Y RAMOS, D. (2011). Papel de las quimiocinas en la progresión del melanoma. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 102(7), 498-504.
- NORMANNO, N.; TEJPAR, S.; MORGILLO, F.; DE LUCA, A.; VAN CUTSEM, E. Y CIARDIELLO, F. (2009). Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6(9), 519-527.
- OSMA, I.; PUNZÓN, C.; FRESNO, M. Y DÍAZ, M. (2015). Dose-dependent effects of prostaglandin E2 in macrophage adhesion and migration. *European Journal Of Immunology*, 46(3), 677-688.
- PADMA, V. (2015). An overview of targeted cancer therapy. *Biomedicine*, 5(4), 19.
- PARKER, K. H.; BEURY, D. W. Y OSTRAND, S. (2015). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Advances in cancer research*, 128, 95–139.
- PATEL, P.; SELVARAJAH, S.; GUÉRARD, K.; BARTLETT, J.; LAPOINTE, J.; BERMAN, D.; OKELLO, J. Y PARK, P. (2017). Reliability and performance of commercial RNA and DNA extraction kits for FFPE tissue cores. *PLOS ONE*, 12(6), 0179732.
- PFAFFL, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *NucleicAcids Res*, 29(9), 45.
- PIENIAZEK, M.; MATKOWSKI, R. Y DONIZY, P. (2018). Macrophages in skin melanoma-the key element in melanomagenesis (Review). *Oncology Letters*, 15(4), 5399-5404.
- QIAN, B.; DENG, Y.; IM, J.; MUSCHEL, R.; ZOU, Y.; LI, J.; LANG, R. Y POLLARD, J. (2009). A Distinct Macrophage Population Mediates Metastatic Breast Cancer Cell Extravasation, Establishment and Growth. *PLOS ONE*, 4(8), 6562.
- QIANG, L.; SAMPLE, A.; SHEA, C.; SOLTANI, K.; MACLEOD, K. Y HE, Y. (2017). Autophagy gene ATG7 regulates ultraviolet radiation-induced inflammation and skin tumorigenesis. *Autophagy*, 13(12), 2086-2103.
- QU, P.; DU, H.; WANG, X. Y YAN, C. (2009). Matrix Metalloproteinase 12 Overexpression in Lung Epithelial Cells Plays a Key Role in Emphysema to Lung Bronchioalveolar Adenocarcinoma Transition. *Cancer Research*, 69(18), 7252-7261.
- RÅDSTRÖM, P.; KNUTSSON, R.; WOLFFS, P.; LÖVENKLEV, M. Y LÖFSTRÖM, C. (2004). Pre-PCR Processing: Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Molecular Biotechnology*, 26(2), 133-146.

- RAIDA, M.; SARBIA, M.; CLEMENT, J.; ADAM, S.; GABBERT, H. Y HOFFKEN, K. (1999). Expression, regulation and clinical significance of bone morphogenetic protein 6 in esophageal squamous-cell carcinoma. *International Journal Of Cancer*, 83(1), 38-44.
- RAJU, S.; JOSEPH, R. Y SEHGAL, S. (2018). Review of checkpoint immunotherapy for the management of non-small cell lung cancer. *Immunotargets And Therapy*, 7, 63-75.
- RASTRELLI, M.; TROPEA, SAVERIA.; RICCARDO, C. Y ALAIBAC, M. (2014). Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *In vivo*, 28, 1005-1012.
- RAZAVIAN, M.; BORDENAVE, T.; GEORGIADIS, D.; BEAU, F.; ZHANG, J.; GOLESTANI, R.; TOCZEK, J.; JUNG, J.; YE, Y.; KIM, H.; HAN, J.; DIVE, V.; DEVEL, L. Y SADEGHI, M. (2016). Optical imaging of MMP-12 active form in inflammation and aneurysm. *Scientific Reports*, 6(1).
- REN, R., TYRYSHKIN, K., GRAHAM, C., KOTI, M., Y SIEMENS, D. (2017). Comprehensive immune transcriptomic analysis in bladder cancer reveals subtype specific immune gene expression patterns of prognostic relevance. *Oncotarget*, 8(41), 70982-71001
- RENAN, M.J. (1993). How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol. Carcinogenesis*, 7(3), 139-146.
- RIERA, M.; CUEVAS, V.; ALONSO, B.; VEGA, M.; JOVEN, J.; IZQUIERDO, E. Y CORBÍ, Á. (2019). Correction: Palmitate Conditions Macrophages for Enhanced Responses toward Inflammatory Stimuli via JNK Activation. *The Journal Of Immunology*, 199, 3858-3869.
- ROMAN, J. (2017). On the “TRAIL” of a Killer: MMP12 in Lung Cancer. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine*, 196(3), 262-264.
- SAMANIEGO, R.; GUTIÉRREZ, A.; GUTIÉRREZ, A.; SÁNCHEZ, S.; GARCÍA, J.; MERCADER, E.; MÁRQUEZ, I.; AVILÉS, J.; RELLOSO, M. Y SÁNCHEZ, P. (2018). CCL20 Expression by Tumor-Associated Macrophages Predicts Progression of Human Primary Cutaneous Melanoma. *Cancer Immunology Research*, 6(3), 267-275
- SASI, W.; JIANG, W.; SHARMA, A. Y MOKBEL, K. (2010). Higher expression levels of SOCS 1,3,4,7 are associated with earlier tumour stage and better clinical outcome in human breast cancer. *BMC Cancer*, 10(1), 178.
- SCHINNERLING, K.; GARCÍA, P. Y AGUILLÓN, J. (2015). Gene Expression Profiling of Human Monocyte-derived Dendritic Cells – Searching for Molecular Regulators of Tolerogenicity. *Frontiers In Immunology*, 6, 528.
- SHANKAR, S.; WILSON, M.; DIVIETRO, J.; MENTINK-KANE, M.; XIE, Z.; WYNN, T. Y DRUEY, K. (2012). RGS16 Attenuates Pulmonary Th2/Th17 Inflammatory Responses. *The Journal Of Immunology*, 188(12), 6347-6356.
- SILVERTHORN, C. Y ALANI, R. (2010). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression is altered by hypoxia in melanoma cells and primary human melanocytes. *Melanoma Research*, 20(1), 61-63.
- SOLIT, D.; GARRAWAY, L.; PRATILAS, C.; SAWAI, A.; GETZ, G.; BASSO, A.; YE, W.; LOBO, J.; SHE, Y.; OSMAN, I.; GOLUB, T.; SEBOLT, J.; SELLERS, W. Y ROSEN, N. (2005). BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature*, 439(7074), 358-362.
- STIEGLITZ, D.; LAMM, S.; BRAIG, S.; FEUERER, L.; KUPHAL, S.; DIETRICH, P.; ARNDT, S.; ECHTENACHER, B.; HELLERBRAND, C.; KARRER, S. Y BOSSERHOFF, A. (2018). BMP6-induced modulation of the tumor micro-milieu. *Oncogene*, 38(5), 609-621.
- SUURVÄLI, J.; PAHTMA, M.; SAAR, R.; PAALME, V.; NUTT, A.; TIIVEL, T.; SAAREMÄE, M.; FITTING, C.; CAVAILLON, J. Y RÜÜTEL, S. (2014). RGS16 Restricts the Pro-Inflammatory Response of Monocytes. *Scandinavian Journal Of Immunology*, 81(1), 23-30.
- SUZUKI, T.; HIGGINS, P. Y CRAWFORD, D. (2000). Control Selection for RNA Quantitation. *Biotechniques*, 29(2), 332-337.
- SZULZEWSKY, F.; PELZ, A.; FENG, X.; SYNOWITZ, M.; MARKOVIC, D.; LANGMANN, T.; HOLTMAN, I.; WANG, X.; EGGEN, B.; BODDEKE, H.; HAMBARDZUMYAN, D.; WOLF, S. Y KETTENMANN, H. (2015). Glioma-Associated Microglia/Macrophages Display an Expression Profile Different from M1 and M2 Polarization and Highly Express Gpnmb and Spp1. *PLOS ONE*, 10(2), 0116644.
- TERAS, M.; VIISILEHT, E.; PAHTMA-HALL, M.; RUMP, A.; PAALME, V.; PATA, P.; LANGEVIN, C. Y RÜÜTEL, S. (2018). Porcine circovirus type 2 ORF3 protein induces apoptosis in melanoma cells. *BMC Cancer*, 18(1), 1237.

- TORROELLA, M.; SILVERA, R.; RODRIGUEZ, D.; CASO, R.; SHATRY, A.; OPIELA, S.; ILKOVITCH, D.; SCHWENDENER, R.; IRAGAVARAPU, V.; CARDENTY, Y.; STRBO, N. Y LOPEZ, D. (2009). Identification of a Subpopulation of Macrophages in Mammary Tumor-Bearing Mice That Are Neither M1 nor M2 and Are Less Differentiated. *Cancer Research*, 69(11), 4800-4809.
- TOSS, A.; VENTURELLI, M.; PETERLE, C.; PIACENTINI, F.; CASCINU, S. Y CORTESI, L. (2017). Molecular Biomarkers for Prediction of Targeted Therapy Response in Metastatic Breast Cancer: Trick or Treat? *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 85.
- UGUREL, S.; PASCHEN, A. Y BECKER, J. (2013). Dacarbazine in Melanoma: From a Chemotherapeutic Drug to an Immunomodulating Agent. *Journal Of Investigative Dermatology*, 133(2), 289-292.
- VANDENBERG, T. Y KRAAL, G. (2005). A function for the macrophage F4/80 molecule in tolerance induction. *Trends In Immunology*, 26(10), 506-509.
- VEGLIA, F.; PEREGO, M. Y GABRILOVICH, D. (2018). Myeloid-derived suppressor cells coming of age. *Nature Immunology*, 19(2), 108-119.
- VON AHLFEN, S.; MISSEL, A.; BENDRAT, K. Y SCHLUMBERGER, M. (2007). Determinants of RNA Quality from FFPE Samples. *PLOS ONE*, 2(12), 1261.
- WADDELL, L.; LEFEVRE, L.; BUSH, S.; RAPER, A.; YOUNG, R.; LISOWSKI, Z.; MCCULLOCH, M.; MURIUKI, C.; SAUTER, K.; CLARK, E.; IRVINE, K.; PRIDANS, C.; HOPE, J. Y HUME, D. (2018). ADGRE1 (EMR1, F4/80) Is a Rapidly-Evolving Gene Expressed in Mammalian Monocyte-Macrophages. *Frontiers In Immunology*, 9, 2246.
- WANG, H.; YANG, L.; WANG, D.; ZHANG, Q. Y ZHANG, L. (2017). Pro-tumor activities of macrophages in the progression of melanoma. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(7), 1556-1562.
- WANG, M.; ZHAO, J.; ZHANG, L.; WEI, F.; LIAN, Y.; WU, Y.; GONG, Z.; ZHANG, S.; ZHOU, J.; CAO, K.; LI, X.; XIONG, W.; LI, G.; ZENG, Z. Y GUO, C. (2017). Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *Journal Of Cancer*, 8(5), 761-773.
- WANG, R. Y WANG, H. (2016). Immune targets and neoantigens for cancer immunotherapy and precision medicine. *Cell Research*, 27(1), 11-37.
- WIECHEC, E.; WIUF, C.; OVERGAARD, J. Y HANSEN, L. (2010). High-Resolution Melting Analysis for Mutation Screening of RGS11, RGS16, and RGS8 in Breast Cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 20(2), 397-407.
- WONG, D. Y RIBAS, A. (2015). Targeted Therapy for Melanoma. *Melanoma*, 167, 251-262.
- XIE, Z.; CHAN, E. Y DRUEY, K. (2015). R4 Regulator of G Protein Signaling (RGS) Proteins in Inflammation and Immunity. *The AAPS Journal*, 18(2), 294-304.
- XIONG, W.; WANG, L. Y YU, F. (2018). Expression of bone morphogenetic protein 6 in non-small cell lung cancer and its significance. *Oncology Letters*, 17(2), 1946-1952.
- XU-MONETTE, Z.; ZHANG, M.; LI, J. Y YOUNG, K. (2017). PD-1/PD-L1 Blockade: Have We Found the Key to Unleash the Antitumor Immune Response? *Frontiers In Immunology*, 8, 1597.
- YANG, B.; YANG, E.; LIAO, H.; WANG, Z.; DEN, Z. Y REN, H. (2015). ARNT2 is downregulated and serves as a potential tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer. *Tumor Biology*, 36(3), 2111-2119.
- YANG, R. Y RODEN, R. (2007). The Terminology Issue for Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Research*, 67(1), 426-426.
- ZHANG, X.; WANG, Y.; CAO, Y.; ZHANG, X. Y ZHAO, H. (2017). Increased CCL19 expression is associated with progression in cervical cancer. *Oncotarget*, 8(43), 73817-73825.
- ZHANG, Z.; ZHU, S.; YANG, Y.; MA, X. Y GUO, S. (2015). Matrix metalloproteinase-12 expression is increased in cutaneous melanoma and associated with tumor aggressiveness. *Tumor Biology*, 36(11), 8593-8600.
- ZHU, Z.; LIU, W. Y GOTLIEB, V. (2016). The rapidly evolving therapies for advanced melanoma— Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. *Critical Reviews In Oncology/Hematology*, 99, 91-99.

7. ANEXOS

ANEXO I. FIGURAS Y TABLAS SUPLEMENTARIAS

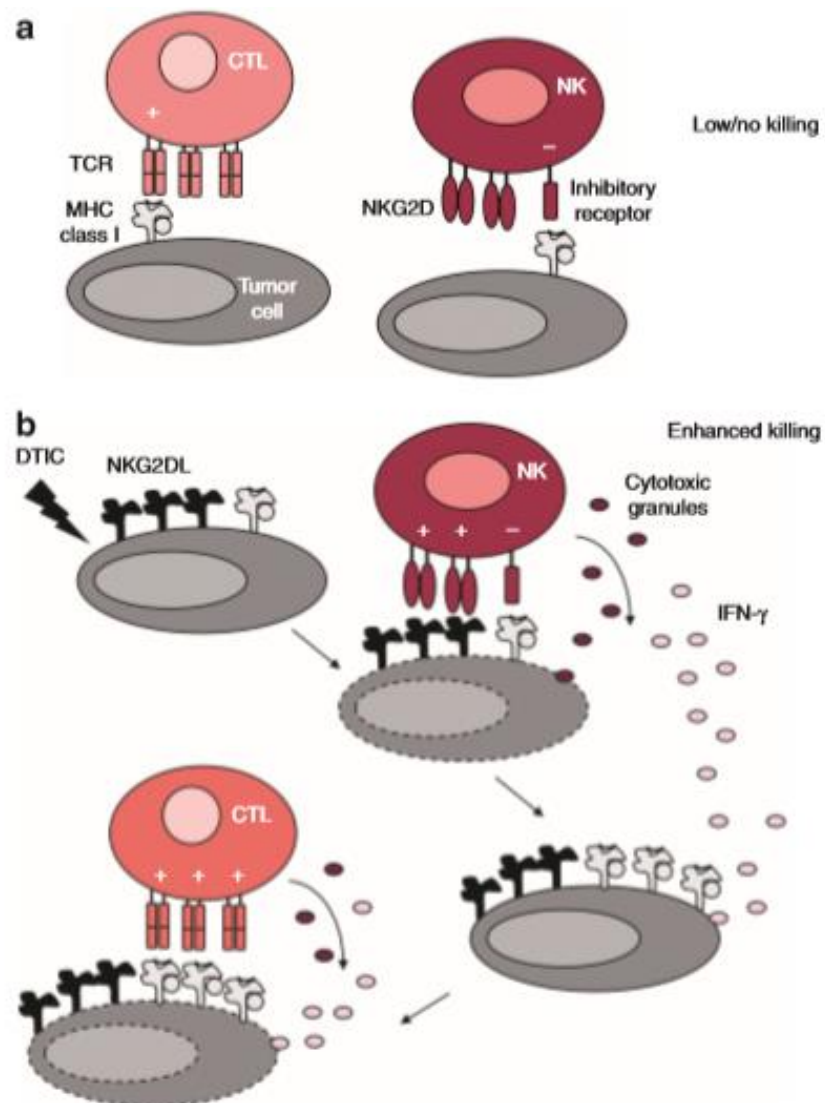


Figura suplementaria 2. Secuencia de respuestas inmunes antimelanoma inducidas por dacarbazina (DTIC).
(Ugurel *et al.*, 2013).

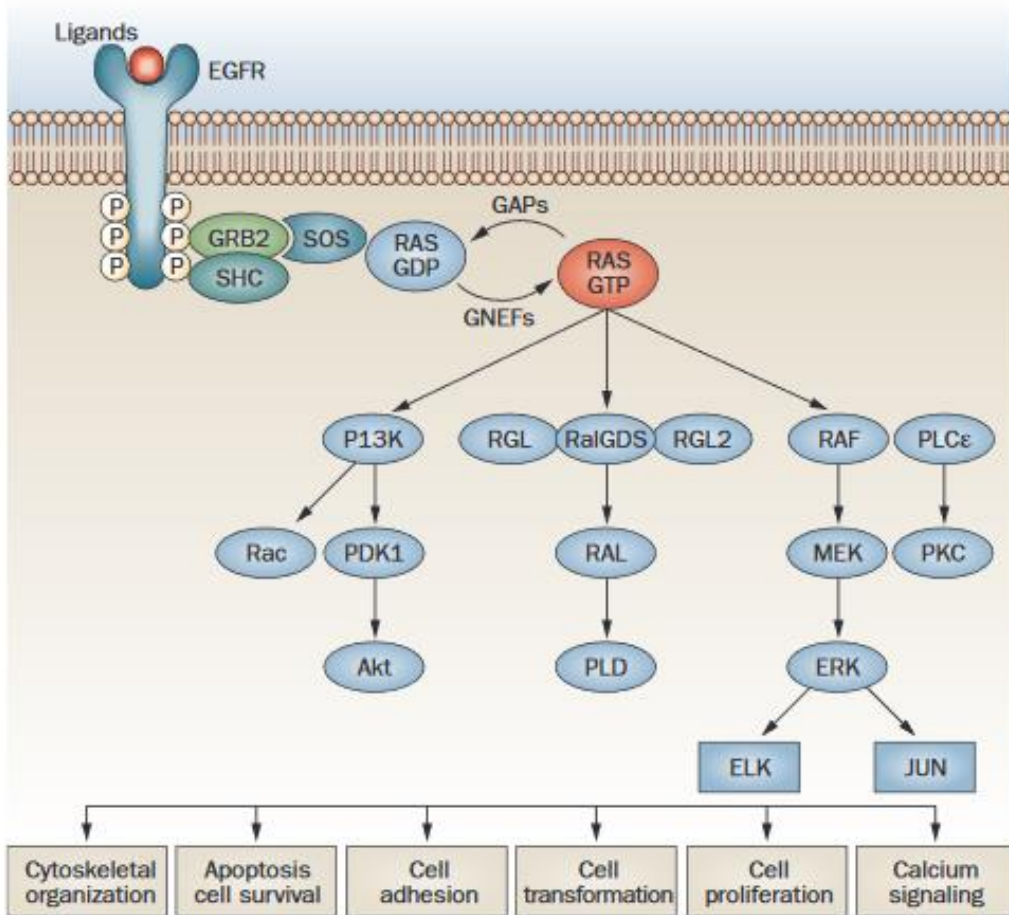


Figura suplementaria 2. Cascada de señalización de MAPK (Normanno *et al.*, 2009).

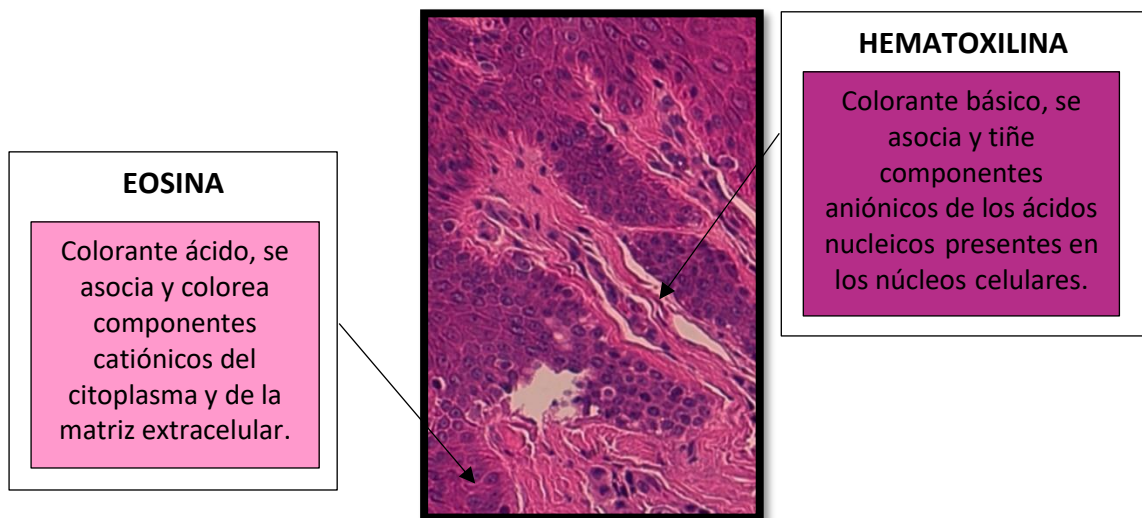


Figura suplementaria 3. Tinción H&E de una sección de muestra de piel del paciente 16.

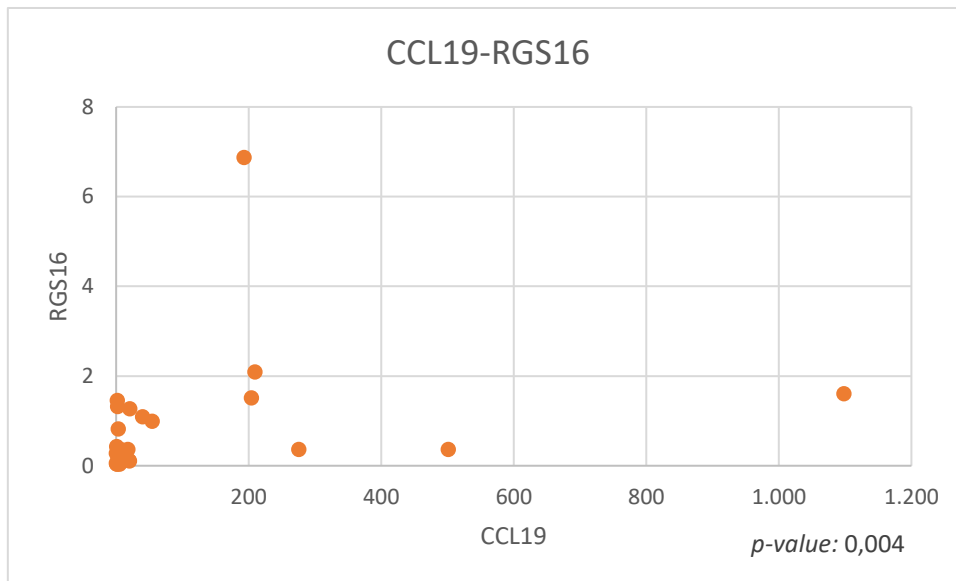


Figura suplementaria 4. Correlación génica *CCL19-RGS16* experimental.

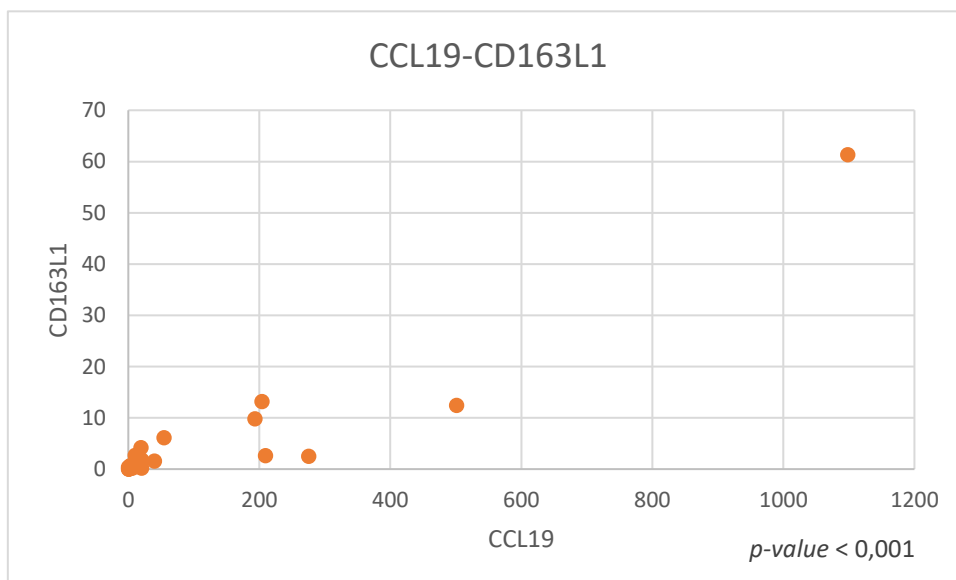


Figura suplementaria 5. Correlación génica *CCL19-CD163L1* experimental.

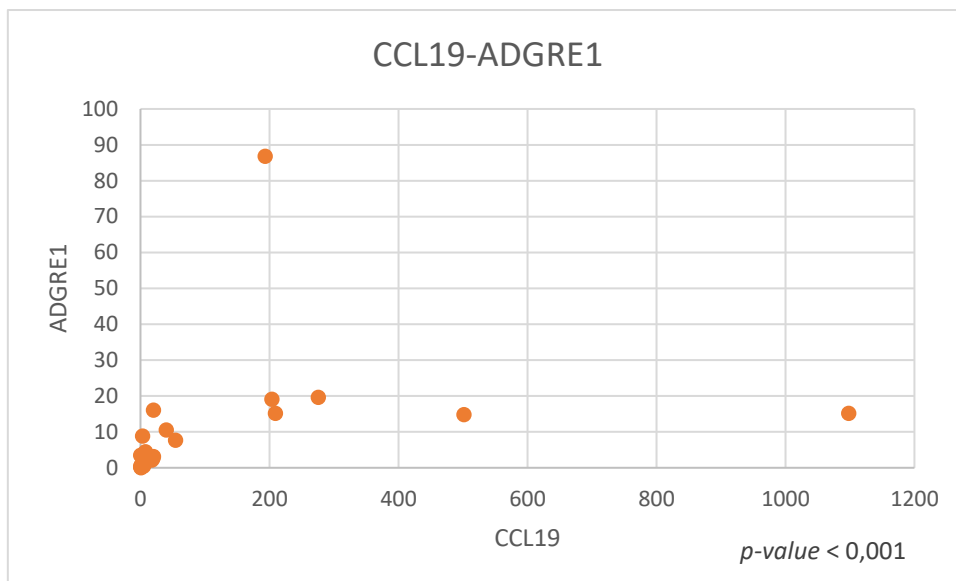


Figura suplementaria 6. Correlación génica *CCL19-ADGRE1* experimental.

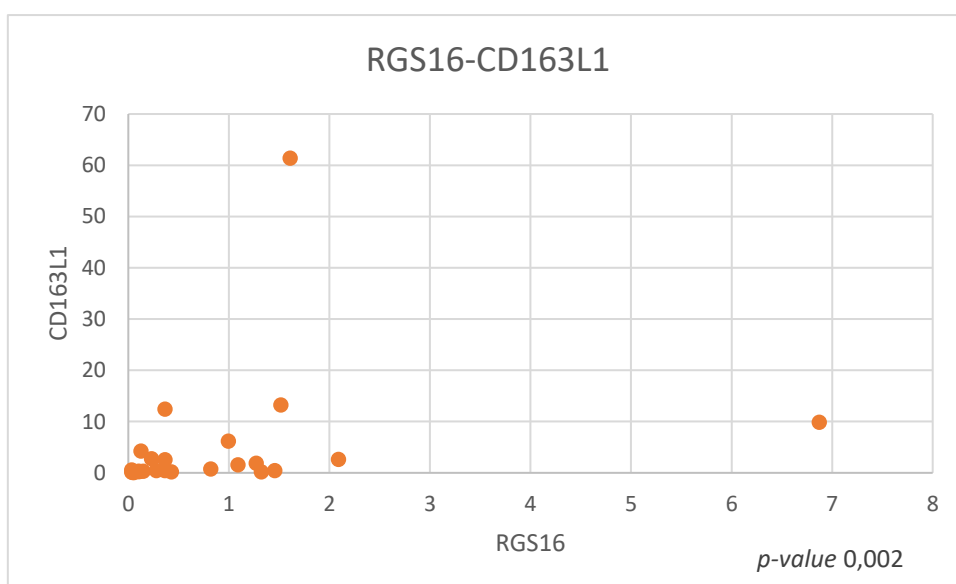


Figura suplementaria 7. Correlación génica *RGS16-CD163L1* experimental

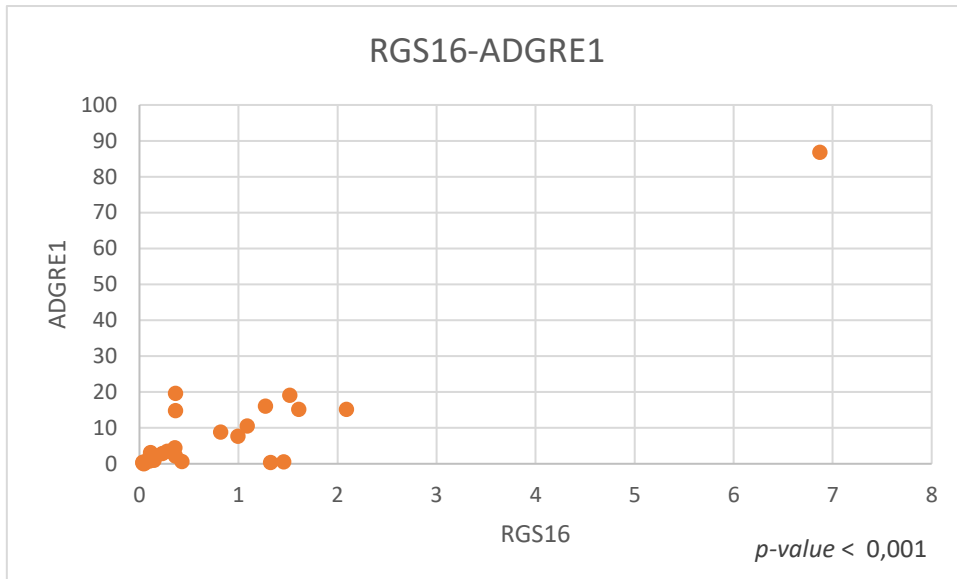


Figura suplementaria 8. Correlación génica *RGS16-ADGRE1* experimental.

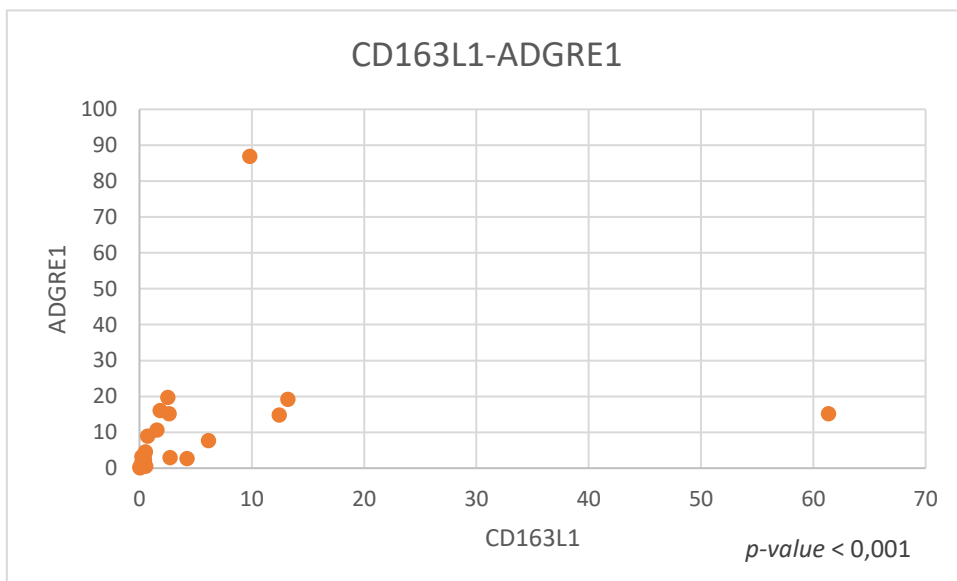


Figura suplementaria 9. Correlación génica *CD163L1-ADGRE1* experimental.

Tabla suplementaria 1. Características de los anticuerpos empleados en inmunohistoquímica.

ANTICUERPO	ISOTIPO	FUENTE	SOLUCIÓN
anti-ARNT2	IgG	Rabbit	1:250
anti-BMP6	IgG	Rabbit	1:200
anti-CCL19	IgG	Rabbit	1:250
anti-CD163L1	IgG	Rabbit	1:250
anti-ADGRE1	IgG	Rabbit	1:250
anti-RGS16	IgG	Rabbit	1:100
anti-MMP12	IgG	Rabbit	1:400
anti-SOCS2	IgG	Rabbit	2 µg/mL
anti-CD68	IgG	Rabbit	1:250

Tabla suplementaria 2. Características clinicopatológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

PACIENTE	SEXO	TRATAMIENTO	B-RAF	HOSPITAL
1	F	-	NEGATIVO	HOSPITAL GENERAL ALICANTE
2	M	Vemurafenib	POSITIVO	HOSPITAL DE SAN JUAN
3	M	IFN/Ipilimumab	NEGATIVO	HOSPITAL DOCTOR PESET
4	M	Vemurafenib	POSITIVO	HOSP PROVINCIAL DE CASTELLÓN
5	F	-	NEGATIVO	HOSPITAL DOCTOR PESET
6	M	Vemurafenib	POSITIVO	HOSPITAL GENERAL DE VALENCIA
7	F	Vemurafenib	POSITIVO	HOSPITAL DE ELDA
8	F	Masatinib	NEGATIVO	HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE
9	F	Fotemustina	POSITIVO	HOSPITAL CLÍNICO DE VALENCIA
10	M	-	NEGATIVO	HOSPITAL DE CUENCA
11	F	Vemurafenib	POSITIVO	HOSPITAL DE ELDA
12	M	Vemurafenib	POSITIVO	HOSPITAL CLINICO DE VALENCIA
13	F	-	NEGATIVO	HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE
14	M	-	NEGATIVO	HOSPITAL GENERAL DE ALICANTE
15	F	Ipilimumab	NEGATIVO	HOSPITAL DE LA VILA JOIOSA
16	M	-	NEGATIVO	HOSPITAL UNIVERSITARIO DE MURCIA
17	M	Vemurafenib	POSITIVO	HOSPITAL DE TORREVIEJA
18	M	-	NEGATIVO	HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA PLANA
19	F	Ipilimumab	NEGATIVO	HOSPITAL DOCTOR PESET
20	M	Interferón	NEGATIVO	HOSPITAL DE ELDA
21	F	Vemurafenib	POSITIVO	HOSPITAL DE REQUENA
22	M	Vemurafenib	POSITIVO	HOSPITAL DE SAN JUAN
23	M	Vemurafenib	POSITIVO	HOSPITAL ARNAU DE VILANOVA
24	F	Vemurafenib	POSITIVO	HOSPITAL DE SAN JUAN
25	F	Fotemustina/Ipilimumab	NEGATIVO	HOSPITAL DE GANDIA
26	F	-	POSITIVO	HOSPITAL GENERAL DE VALENCIA
27	M	-	POSITIVO	HOSPITAL GENERAL DE VALENCIA
28	M	-	POSITIVO	HOSPITAL DE TORREVIEJA
29	F	Ipilimumab	POSITIVO	HOSPITAL GENERAL DE VALENCIA
30	M	-	-	HOSPITAL GENERAL DE VALENCIA

ANEXO II. REVELADO IHC CON POLÍMERO MARCADO CON PEROXIDASA

USO PREVISTO: Diagnóstico *in vitro* en la especie humana. En otras especies el reactivo no ha sido testado.

ESPECIFICIDAD, INTERFERENCIAS Y LIMITACIONES: Este sistema de detección ha demostrado mayor sensibilidad con un incremento en la señal de la unión antígeno-anticuerpo. La novedosa tecnología de micropolímeros proporciona mayores ventajas que las técnicas convencionales de inmunohistoquímica y facilita la detección de antígenos en los diferentes compartimentos celulares (núcleo, citoplasma y membrana citoplasmática) debido al menor tamaño de la molécula. El procedimiento técnico utilizado elimina la tinción de fondo originada por la unión inespecífica a moléculas de biotina endógena ya que se trata de un procedimiento no basado en la reacción avidina/biotina. Este sistema de detección es altamente sensible, proporciona una baja tinción de fondo y los resultados obtenidos son superiores a los obtenidos con los procedimientos convencionales de Estreptavidina/Biotina o largos polímeros.

Este sistema puede utilizarse con:

- Anticuerpos primarios monoclonales obtenidos en ratón.
- Anticuerpos primarios monoclonales y policlonales obtenidos en conejo.

APLICACIÓN DEL PRODUCTO: Este producto está especialmente diseñado para su manejo en los inmunoteñidores automáticos o en las técnicas de inmunotinción manuales, utilizando anticuerpos primarios monoclonales o policlonales. Después de bloquear la posible peroxidasa endógena y tratar las secciones con el anticuerpo primario sin marcar, se aplica el amplificador universal de anticuerpos primarios, seguido de un complejo constituido por micropolímero con anticuerpo secundario universal y moléculas de peroxidasa. Tras los tiempos predeterminados de incubación y después de lavar, se revela utilizando DAB.