



# ACTAS Derma-Sifiliográficas

Full English text available at  
[www.actasdermo.org](http://www.actasdermo.org)



## ORIGINAL

### Estudio de la expresión de telomerasa en una serie de neoplasias melanocíticas



B. de Unamuno Bustos<sup>a</sup>, A. Sahuquillo Torralba<sup>a</sup>, P. Moles Poveda<sup>a</sup>, G. Pérez Simó<sup>b</sup>, J. Simarro Farinos<sup>b</sup>, M. Llavador Ros<sup>c</sup>, S. Palanca Suela<sup>b,\*</sup> y R. Botella Estrada<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Dermatología, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

<sup>b</sup> Servicio de Análisis Clínicos, Laboratorio de Biología Molecular, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

<sup>c</sup> Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario y Politécnico La Fe, Valencia, España

Recibido el 13 de abril de 2018; aceptado el 13 de octubre de 2018

Disponible en Internet el 25 de diciembre de 2018

#### PALABRAS CLAVE

Telomerasa;  
Telomerase reverse transcriptase (TERT);  
Melanoma;  
Nevus;  
Inmunohistoquimia

#### Resumen

**Introducción y objetivos:** La telomerasa es una enzima implicada en el mantenimiento de los telómeros y la senescencia celular. Numerosos estudios han demostrado que en más del 90% de las neoplasias malignas se detecta actividad telomerasica. El objetivo del presente estudio es analizar la expresión de telomerasa por inmunohistoquímica en una serie de neoplasias melanocíticas.

**Material y métodos:** Estudio observacional retrospectivo realizado en una serie de 85 melanomas primarios, 12 metastásicos y 22 nevus melanocíticos. La expresión de telomerasa se analizó empleando el anticuerpo monoclonal hTERT (Rockland). El análisis de los datos se realizó con el programa SPSS.

**Resultados:** En todas las neoplasias melanocíticas analizadas se demostró expresión de telomerasa. En el caso de los melanomas predominó el patrón de expresión heterogéneo, y la expresión moderada o intensa. En los nevus resultó más frecuente una expresión homogénea con intensidad leve. El patrón de expresión heterogéneo se asoció a los melanomas de rápido crecimiento ( $p=0,028$ ), con Breslow  $> 4$  mm ( $p=0,004$ ), con mitosis ( $p=0,032$ ), y con mutaciones en el gen TERT ( $p=0,002$ ). En el caso de los nevus, la intensidad fue menor en los nevus intradérmicos, seguidos de los compuestos y de los displásicos ( $p=0,054$ ).

**Conclusiones:** La expresión de telomerasa está presente en la totalidad de las neoplasias melanocíticas, con mayor expresión en los melanomas que en los nevus. En el caso de los melanomas, la expresión de forma heterogénea se asocia a un fenotipo de mayor agresividad.

© 2018 AEDV. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: [palanca\\_sar@gva.es](mailto:palanca_sar@gva.es), [palanca\\_sar@gva.es](mailto:palanca_sar@gva.es) (S. Palanca Suela).

**KEYWORDS**

Telomerase;  
 Telomerase reverse  
 transcriptase (TERT);  
 Melanoma;  
 Nevus;  
 Immunohistochemistry

**Telomerase Expression in a Series of Melanocytic Neoplasms****Abstract**

**Background and objectives:** Telomerase is an enzyme involved in maintaining the length of telomeres and cell senescence. Numerous studies have shown that in more than 90% of malignant tumors telomerase activity is detected.

**Material and methods:** Retrospective observational study in a series of 85 cases of primary melanomas, 12 metastatic melanomas, and 22 melanocytic nevi. We used the monoclonal antibody hTERT (human telomerase reverse transcriptase, Rockland) to assess telomerase activity. The SPSS software package was used to analyze data.

**Results:** Telomerase expression was present in all the melanocytic neoplasms analyzed. Expression was heterogeneous and moderate or high in the melanomas. In contrast, expression was homogeneous and lower in the nevi. Heterogeneous expression was associated with rapid melanoma growth ( $P = .028$ ), a Breslow thickness of more than 4 mm ( $P = .004$ ), mitosis ( $P = .032$ ), and mutations in the *TERT* gene ( $P = .002$ ). Activity was less intense in intradermal nevi, and more intense in compound and dysplastic nevi ( $P = .054$ ).

**Conclusions:** Telomerase expression is found in all melanocytic neoplasms but is higher in melanomas than in nevi. A heterogeneous pattern of expression in melanomas is associated with more aggressive tumors.

© 2018 AEDV. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

**Introducción**

La telomerasa es una enzima formada por una subunidad catalítica (telomerasa transcriptasa inversa o TERT) y un ácido ribonucleico (TERC)<sup>1</sup>. Es bien conocido que juega un papel importante en el mantenimiento de los telómeros y la senescencia celular. En condiciones normales, su expresión está presente únicamente en las células de la línea germinal, tejidos fetales y células madre. Por el contrario, las células somáticas del resto de los tejidos carecen de actividad telomerasica, lo que conlleva a un acortamiento progresivo de sus telómeros tras repetidas divisiones celulares. Numerosos estudios han demostrado que la actividad telomerasica se detecta en más del 90% de las neoplasias malignas<sup>2</sup>, incluyendo diversos tipos de cáncer cutáneo<sup>3</sup>. Concretamente en las neoplasias melanocíticas, varios estudios han identificado un incremento de la actividad telomerasica en las células neoplásicas desde nevus a melanoma, con la máxima actividad telomerasica detectada en melanomas metastásicos<sup>4</sup>. De forma adicional, recientemente se ha demostrado la implicación de las mutaciones en el promotor del gen *TERT* en la patogenia del melanoma<sup>5,6</sup>. Diversos estudios han identificado mutaciones recurrentes en la región promotora del gen *TERT* (c.1-146C>T, c.1-124C>T, c.1-124/-125CC>TT, c.1-138/-139CC>TT) en un 22-71% de melanomas esporádicos asociadas a individuos de mayor edad, con melanomas en áreas fotoexpuestas, del subtipo histológico nodular, mayor índice de Breslow, presencia de ulceración y alto índice mitótico<sup>7-9</sup>. Estudios en tejido y líneas celulares han corroborado que estas mutaciones conllevan una mayor expresión de telomerasa al crearse nuevos sitios de unión para factores de transcripción de la familia ETS<sup>9-12</sup>. Se ha demostrado que la presencia de dichas mutaciones es un factor pronóstico independiente que se asocia a menor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global<sup>8,13</sup>. Adicionalmente,

se ha descrito que dicha asociación con la supervivencia varía en función del tipo de mutación identificada, y es modificada por la presencia del polimorfismo rs2853669<sup>14,15</sup>. Asimismo, estudios recientes han demostrado el valor pronóstico de la longitud de los telómeros, al haber identificado menores tasas de supervivencia en pacientes con menor longitud<sup>16,17</sup>.

Por tanto, parece que la expresión de telomerasa juega un papel importante en la carcinogénesis de los melanomas, sin embargo son escasos los estudios que analizan su expresión a nivel de proteína, y los que están disponibles incluyen series cortas con un escaso número de melanomas. De forma adicional, el estudio de la expresión de telomerasa podría ser de utilidad para la estratificación de los pacientes en función de su pronóstico. El objetivo del presente estudio es analizar la expresión de telomerasa por inmunohistoquímica en una serie de melanomas (primarios y metastásicos) y nevus melanocíticos, y correlacionar los niveles de expresión con las características clínico-patológicas y evolutivas de los pacientes, así como con las mutaciones en el promotor del gen *TERT*.

**Material y métodos****Pacientes y muestras seleccionadas**

Estudio observacional retrospectivo realizado en el Servicio de Dermatología y Anatomía Patológica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe en una muestra de 85 pacientes diagnosticados de melanoma y 22 pacientes con nevus melanocíticos (cinco nevus intradérmicos, siete compuestos y diez displásicos) atendidos durante el periodo comprendido entre 1 enero del 2014 y 1 diciembre de 2016. Se seleccionaron aquellas muestras en las que se disponía de muestra suficiente en el bloque de parafina para

**Tabla 1** Características clínico-patológicas de los pacientes con melanoma y distribución de las características en función del patrón de expresión de telomerasa

Variable	Total (n = 85) N (%)	Patrón expresión		p valor
		Hom N (%)	Het N (%)	
<i>Edad</i>				
< 40	5 (5,9)	2 (40,0)	3 (60,0)	0,678
40-65	45 (52,9)	27 (60,0)	18 (40,0)	
> 65	35 (41,2)	21 (60,0)	14 (40,0)	
<i>Sexo</i>				
Varón	46 (54,1)	29 (63,0)	17 (37,0)	0,526
Mujer	39 (45,9)	21 (53,8)	18 (46,2)	
<i>Localización</i>				
Cabeza y cuello	9 (10,6)	2 (22,2)	7 (77,8)	0,025
Tronco	45 (52,9)	32 (71,1)	13 (28,9)	
Miembros superiores	14 (16,5)	5 (35,7)	9 (64,3)	
Miembros inferiores	14 (16,5)	9 (64,3)	5 (35,7)	
Acral	3 (3,5)	2 (66,7)	1 (33,3)	
<i>Subtipo histológico</i>				
Lentigo maligno melanoma	3 (3,5)	0 (0)	3 (100)	0,017
Melanoma extensión superficial	64 (75,3)	43 (67,2)	21 (32,8)	
Melanoma nodular	15 (17,6)	5 (33,3)	10 (66,7)	
Melanoma lentiginoso acral	3 (3,5)	2 (66,7)	1 (33,3)	
<i>Índice de Breslow</i>				
< 1mm	40 (47,1)	29 (72,5)	11 (27,5)	0,004
1-2mm	29 (34,1)	15 (55,2)	13 (44,8)	
2-4mm	6 (7,1)	4 (66,7)	2 (33,3)	
> 4mm	10 (11,8)	1 (10,0)	9 (90,0)	
<i>Ulceración</i>				
No	69 (81,2)	43 (62,3)	26 (37,7)	0,141
Sí	16 (18,8)	7 (43,8)	9 (56,3)	
<i>Mitosis/mm<sup>2</sup></i>				
< 1	43 (50,6)	30 (69,8)	13 (30,2)	0,032
≥ 1	42 (49,4)	19 (47,6)	22 (52,4)	
<i>Regresión</i>				
No	43 (50,6)	23 (53,5)	20 (46,5)	0,215
Sí	42 (49,4)	27 (64,3)	15 (35,7)	
<i>Estadio tumoral</i>				
Localizado	73 (85,9)	43 (59,7)	29 (40,3)	0,580
Enfermedad locorregional/distancia	12 (14,1)	7 (58,3)	5 (41,7)	
<i>Tasa de crecimiento</i>				
Lento crecimiento	70 (82,3)	25 (64,3)	45 (35,7)	0,028
Rápido crecimiento	15 (17,7)	5 (33,3)	10 (66,7)	
<i>Evolución clínica (%)</i>				
Enfermedad estable	69 (81,0)	41 (57,7)	30 (42,3)	0,242
Recaída locorregional/distancia	11 (13,0)	3 (42,9)	4 (57,1)	
Éxito	5 (6,0)	3 (100,0)	0 (0)	
<i>Mutaciones en el promotor de TERT</i>				
Wt	61 (71,8)	37 (66,1)	19 (33,9)	0,002
Mutado	24 (28,2)	6 (27,3)	12 (72,7)	

Het: heterógeno; Hom: homogéneo.

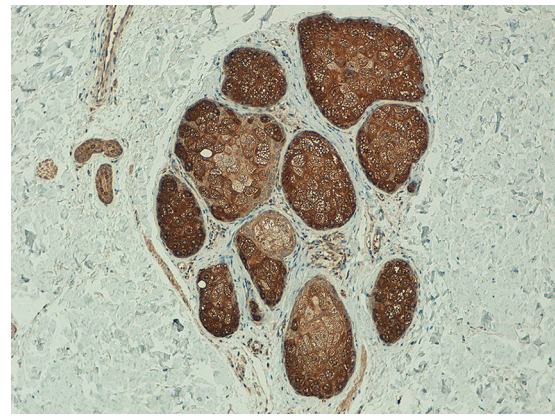
realizar la tinción inmunohistoquímica. En el caso de los melanomas primarios, se incluyeron únicamente aquellos con componente invasivo, clasificados en los cuatro subtipos histológicos principales (lentigo melanoma maligno, melanoma de extensión superficial, melanoma nodular y melanoma lentiginoso acral), y en los que se disponía del estudio del promotor del gen *TERT*. En los 85 pacientes con melanoma se estudió el tumor primario y adicionalmente, en 12 de ellos se estudió también una metástasis de melanoma. De cada uno de los pacientes con melanoma se recogieron las características clínico-patológicas (tabla 1). El índice de Breslow se categorizó de acuerdo con la última clasificación de la AJCC ( $\leq 1,00$ , 1,01-2, 2,01-4 y  $> 4$  mm)<sup>18</sup>; el índice mitótico se expresó como el número de mitosis por milímetro cuadrado y se categorizó según la presencia o ausencia de mitosis; la regresión histológica se definió según lo descrito previamente<sup>19</sup>, y se categorizó en ausente o presente; y la velocidad de crecimiento se definió acorde a lo descrito previamente<sup>20</sup>. Todos los pacientes manifestaron por escrito su consentimiento para participar en el estudio.

### Expresión de telomerasa mediante inmunohistoquímica

La tinción inmunohistoquímica se realizó en cortes de 5  $\mu$ m utilizando el anticuerpo monoclonal hTERT (Rockland) de acuerdo a lo descrito previamente<sup>21</sup>. Como control negativo se realizó la misma técnica con omisión del anticuerpo. En el caso de los melanomas en los que se disponía de varios bloques, se seleccionaron aquellos con mayor porcentaje de celularidad tumoral. La valoración de la expresión de telomerasa de todas las muestras incluidas se realizó por dos observadores independientes (BU y RB). En los casos con discrepancias en las observaciones de ambos investigadores, se tomaron para el análisis las observaciones del investigador con mayor experiencia (RB). Se cuantificó la extensión de la expresión mediante el establecimiento de una puntuación basada en el porcentaje de células con positividad, 0: 0%, 1:  $< 10\%$ , 2: 10-50% y 3:  $> 50\%$ . La intensidad de la expresión se clasificó del 0-3 (0: ausente; 1: leve; 2: moderada; 3: intensa). El patrón de expresión se clasificó en homogéneo o heterogéneo en función de la uniformidad de la expresión en las células tumorales.

### Análisis estadístico

El análisis descriptivo de las variables se analizó mediante frecuencias absolutas y relativas. El análisis inferencial de las variables cualitativas se realizó mediante pruebas basadas en la ley de  $\chi^2$ . El análisis de SLE y SG se calcularon mediante el método de Kaplan-Meier. El grado de acuerdo entre los observadores independientes se evaluó mediante el coeficiente Kappa ( $\kappa$ ). Para el análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS tomando como límite de significación  $P < 0,05$ .



**Figura 1** Expresión intensa de telomerasa en las glándulas sebáceas (x100).

## Resultados

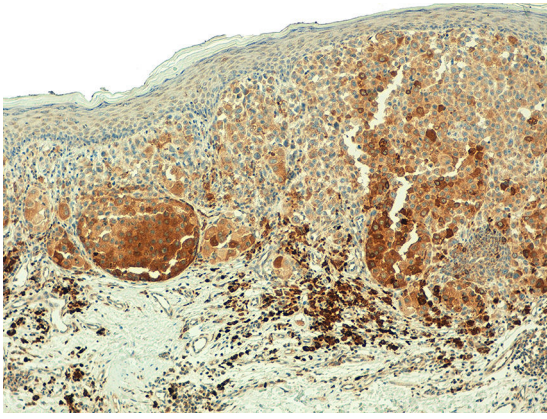
### Expresión de telomerasa en piel sana

En la piel sana perilesional a las lesiones melanocíticas se observó expresión de telomerasa a nivel de la epidermis, el folículo piloso, las glándulas sudoríparas y sebáceas así como en el endotelio de los vasos de la dermis. La expresión a nivel de la epidermis y folículos era leve, mientras que era moderada e intensa a nivel de las glándulas sudoríparas y sebáceas, respectivamente (fig. 1) (figs. S1- S3 del material adicional disponible en la versión electrónica). La expresión en estos anejos cutáneos se empleó como control positivo en todos los casos analizados.

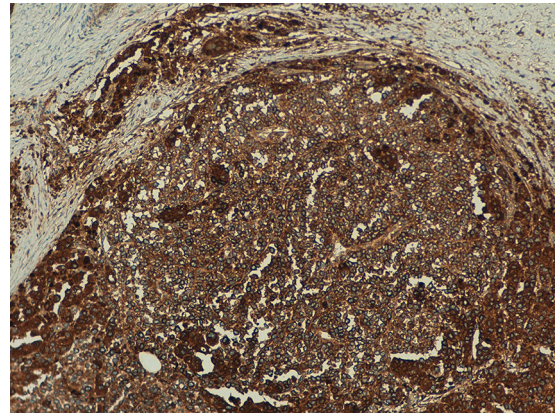
### Expresión de telomerasa en las neoplasias melanocíticas

El grado de concordancia observado en los tres parámetros analizados por ambos investigadores fue bueno, con un índice  $\kappa$  de 0,65 en la intensidad, 0,83 en la extensión, y 0,73 en el patrón de expresión de telomerasa.

En todas las neoplasias melanocíticas analizadas se demostró expresión de telomerasa. En el caso de los melanomas primarios, en el 59% (50/85) de los casos el patrón de la expresión era homogéneo en toda la celularidad tumoral (fig. S4 del material adicional), mientras que en el 41% (35/85) era heterogéneo, con diferente intensidad en la expresión entre las células tumorales (fig. 2) (fig. S5 del material adicional). En la mayoría de los casos analizados (95%; 81/85) se observó expresión en  $> 50\%$  de la celularidad tumoral (fig. S6 del material adicional) y solo en un caso se observó expresión en  $< 10\%$  del infiltrado tumoral (fig. S7 del material adicional). Con respecto a la intensidad, en el 41% (35/85) de las muestras la expresión era intensa (fig. S8 del material adicional), en el 51% (43/85) era moderada (fig. S9 del material adicional), y solo en el 8% (7/85) era leve (fig. S10 del material adicional). En aquellos melanomas en los que existía una lesión névica precursora (5%; 4/85), se observaba expresión intensa de telomerasa en las células tumorales del melanoma, pero con expresión leve en las células névicas acompañantes (fig. 3a-d).



**Figura 2** Expresión de telomerasa con patrón heterogéneo en un melanoma primario (x100).

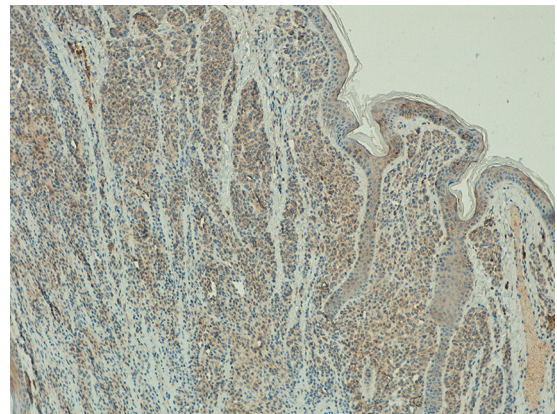


**Figura 4** Expresión de telomerasa intensa en un melanoma metastásico (x100).

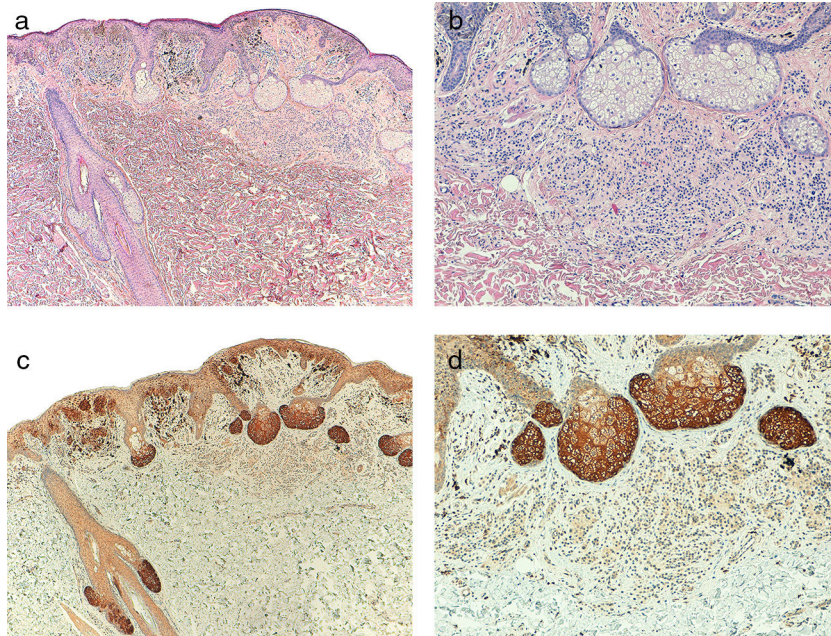
En los melanomas metastásicos, el patrón de la expresión era homogéneo en el 67% (8/12) y heterogéneo en el 33% (4/12). Se observó expresión de hTERT en > 50% de la celularidad tumoral en el 100% de las muestras, siendo intensa en el 42% (5/12), moderada en el 50% (6/12), y leve en el 8,3% (1/12) (fig. 4).

La expresión de telomerasa en los nevos melanocíticos presentaba un patrón homogéneo en el 100% de los nevos melanocíticos, con una extensión en > 50% de la celularidad tumoral en el 91% (20/22). La intensidad de la expresión era leve en el 64% (14/22), moderada en el 32% (7/22) e intensa en el 4% (1/22) (fig. 5).

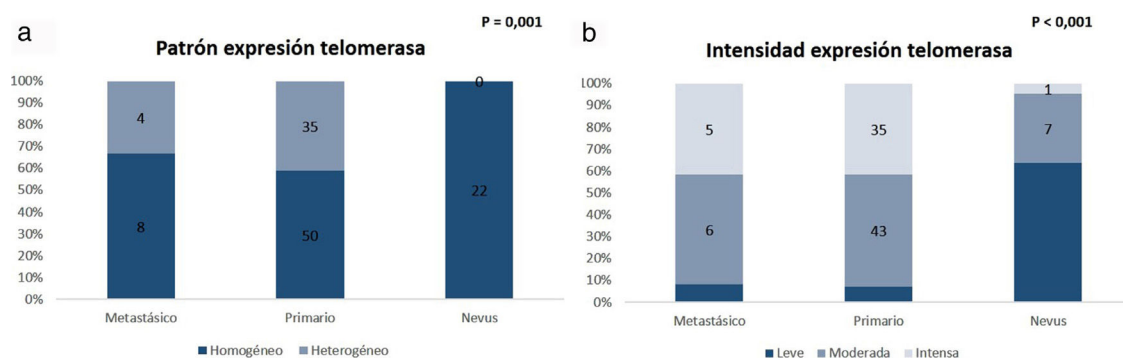
En cuanto a las diferencias de expresión en función de las características clínico-patológicas de los melanomas primarios, el patrón de expresión heterogéneo se asoció a los melanomas de rápido crecimiento ( $p=0,028$ ), con índice



**Figura 5** Expresión de telomerasa leve en un nevo melanocítico intradérmico (x100).



**Figura 3** a) Melanoma asociado a nevo intradérmico (H&E; x40). b) Detalle del nevo intradérmico asociado al melanoma (H&E; x100). c) Expresión de telomerasa intensa en las células tumorales del melanoma y leve en las células névicas (x40). d) Detalle de la expresión leve de telomerasa en las células del nevo (x100).



**Figura 6** a) Patrón de expresión de telomerasa en melanomas y nevus con predominio de expresión homogénea en los nevus melanocíticos. b) Descenso progresivo en la intensidad de la expresión de telomerasa desde melanomas metastásicos a nevus.

de Breslow > 4 mm ( $p=0,004$ ), con presencia de mitosis ( $p=0,032$ ), y con mutaciones en el promotor del gen *TERT* ( $p=0,002$ ) (tabla 1). El patrón de expresión no mostró diferencias significativas entre los diferentes tipos de mutación en el promotor del gen *TERT* (c.1-146C>T, c.1-124C>T, y c.1-124/-125CC>TT). No se observaron diferencias estadísticamente significativas con la intensidad ni con la extensión de la expresión (tabla S1 del material adicional). La intensidad de la expresión resultó mayor en los melanomas del subtipo lentigo melanoma maligno, y menor en los lentiginosos acrales, aunque este dato no alcanzó significación estadística ( $p=0,523$ ). En el análisis de supervivencia no se observaron diferencias estadísticamente significativas en función de la expresión de telomerasa.

El análisis comparativo de los nevus con melanomas primarios y metastásicos demostró que la expresión de telomerasa en los nevus era menos intensa que en los melanomas primarios y metastásicos ( $p=0,001$ ) y que a diferencia de los melanomas, era característico un patrón de expresión homogéneo en toda la celularidad tumoral ( $p < 0,001$ ) (fig. 6). Con respecto a los melanomas, no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los melanomas primarios y metastásicos. Adicionalmente, en el caso de los nevus cabe destacar que la intensidad era menor en los nevus intradérmicos, seguidos de los compuestos y de los displásicos, aunque este dato no alcanzó significación estadística ( $p=0,054$ ).

## Discusión

Los resultados del presente estudio demuestran que la expresión de telomerasa está presente en todas las neoplasias melanocíticas analizadas, y que existe una tendencia a incrementarse de forma progresiva desde nevus a melanomas, por lo que podría estar implicada en la progresión tumoral de este tipo de neoplasias.

En los melanomas primarios de nuestra serie hemos demostrado que el patrón de expresión heterogéneo se asocia a melanomas de mayor agresividad (melanomas de rápido crecimiento, con espesor tumoral > 4 mm, con mitosis y mutaciones en el promotor de *TERT*), hecho que no estaba reportado anteriormente. Estos resultados contrastan con los reportados recientemente por Hugué et al., que describen una expresión de telomerasa homogénea en

la mayor parte de sus casos<sup>22</sup>. Sin embargo, nuestros hallazgos podrían estar en relación con los reportados por Kohli et al., que describen una expresión de telomerasa no nucleolar de forma heterogénea en los melanomas pero no en lesiones benignas<sup>23</sup>. Este patrón de expresión heterogéneo podría ser consecuencia de la denominada heterogeneidad intratumoral en el melanoma, que se ha asociado a la presencia de distintas subpoblaciones tumorales, y que se relaciona con la resistencia a los tratamientos sistémicos<sup>24,25</sup>. Por otro lado, no podemos descartar que la heterogeneidad observada en nuestro estudio se deba a un defecto en la tinción, si bien es poco probable ya que en ninguna de las lesiones melanocíticas benignas observamos este patrón.

A diferencia de otros estudios, en nuestra serie la intensidad y la extensión de la expresión de telomerasa han sido independientes de las características clínico-patológicas. Hugué et al., reportaron asociación estadísticamente significativa entre la expresión de telomerasa (44% de los melanomas primarios de su serie) y el espesor tumoral<sup>22</sup>; y Zygouris et al. describieron asociación con el índice de Breslow y la ulceración<sup>26</sup>. A su vez nuestros resultados contrastan con varios estudios en los que analizan la actividad telomérica, como es el de Ramírez et al.<sup>27</sup>, en el que se demostraba mayor actividad telomérica en melanomas con mayor espesor tumoral, mayor nivel de Clark y mitosis; los resultados de Miracco et al.<sup>28</sup> en los que la actividad telomérica también se asociaba al índice de Breslow y al nivel de Clark; y a lo publicado por Carvahlo et al.<sup>29</sup> donde se demostraba mayor actividad telomérica en los melanomas ulcerados, con mayor Breslow, mitosis, invasión vascular y satelitosis. En nuestra serie los melanomas del subtipo lentigo melanoma maligno han demostrado mayor intensidad de expresión, aunque este dato no ha alcanzado significación estadística. Este último hallazgo no concuerda con lo descrito en la serie de Pópulo et al.<sup>8</sup>, en la que la expresión de telomerasa únicamente se asociaba al subtipo histológico de extensión superficial.

Con respecto a las mutaciones en el promotor del gen *TERT*, acorde a lo descrito por otros autores<sup>8,9</sup>, en una publicación previa hemos descrito una prevalencia del 33%, y una asociación a melanomas de mayor espesor tumoral, ulcerados, con mitosis, y del subtipo histológico nodular<sup>30</sup>. Al igual que en otros estudios, en la presente serie no hemos

encontrado diferencias en la expresión de telomerasa por inmunohistoquímica entre los melanomas mutados y los no mutados<sup>3,22,23</sup>. Este hallazgo contrasta con varias publicaciones previas en las que se demostraba mayor expresión de telomerasa en los melanomas portadores de mutaciones en el promotor<sup>9-12</sup>. Dicha discrepancia podría deberse a que en estos estudios se analiza la expresión de telomerasa a nivel del ARN mensajero y no de la proteína, y por tanto pueden existir otros mecanismos moleculares que regulen su expresión. De hecho, varios estudios se han centrado en la regulación epigenética de la expresión de telomerasa. En este sentido, se ha descrito que la regulación postranscripcional del gen *TERT* mediante expresión de microRNA, puede reprimir la expresión de telomerasa<sup>31,32</sup>; y adicionalmente, que la hipermetilación en el ADN del gen *TERT* puede incrementar la expresión de telomerasa<sup>33</sup>. A este respecto, podría resultar de utilidad medir la longitud de los telómeros y/o la actividad telomérica y correlacionarlo con la presencia de la mutación, con el fin de dilucidar si solo los mutados tienen aumento de actividad, o bien los *wild-type* también tienen mayor actividad telomérica mediante esos otros mecanismos moleculares.

De forma adicional, hemos identificado niveles variables de expresión de telomerasa en una serie de 22 nevus melanocíticos, con una expresión leve en la gran mayoría de las muestras, y con una tendencia a incrementarse la expresión desde nevus intradérmicos, a nevus displásicos. Asimismo, cabe destacar que en todos los melanomas con lesión névica precursora, la expresión de telomerasa en el nevus acompañante era mucho menos intensa que en las células tumorales de los melanomas. Estos resultados sugieren un posible papel de la telomerasa en la progresión tumoral de las neoplasias melanocíticas. De hecho, varios autores han analizado la actividad telomérica en diferentes tipos de neoplasias melanocíticas, y han demostrado que la expresión de telomerasa se incrementa de forma progresiva desde nevus comunes a nevus displásicos y melanomas<sup>4,34</sup>. A pesar de estas diferencias en la expresión de telomerasa entre nevus y melanoma, dado que la expresión puede ser variable en ambos tipos de neoplasias, se ha demostrado que no es de utilidad en el diagnóstico diferencial<sup>30</sup>.

En el presente estudio la expresión de telomerasa se ha analizado mediante inmunohistoquímica, a diferencia de la mayoría de los estudios publicados previamente en los que se analizaba la actividad telomérica utilizando el Protocolo de amplificación de las secuencias repetitivas teloméricas (TRAP)<sup>4,23-25</sup>. El estudio mediante inmunohistoquímica tiene la ventaja de que es un método sencillo, barato, que se realiza en muestras parafinadas, y que permite visualizar la intensidad y la extensión de la expresión no solo en las células de interés, sino también en la piel sana adyacente. De hecho, acorde a lo descrito previamente<sup>30</sup>, hemos identificado niveles variables de expresión de telomerasa no solo en las células tumorales, sino también en la epidermis, los folículos pilosos, las glándulas, los vasos de la dermis e incluso en el infiltrado inflamatorio acompañante.

En conclusión, los resultados de este estudio ponen de manifiesto que la expresión de telomerasa está presente en la totalidad de las neoplasias melanocíticas analizadas, con mayor expresión en los melanomas que en los nevus. En

el caso de los melanomas primarios, la expresión de forma heterogénea se asocia a un fenotipo de mayor agresividad, sin embargo la intensidad de la expresión es independiente de las características clínico-patológicas de los tumores. Asimismo, se demuestra que no existen diferencias en la expresión de telomerasa en función del estado mutacional del gen *TERT*, por lo que deben existir otros mecanismos moleculares adicionales que regulen la expresión del gen *TERT* en los melanomas.

## Financiación

Este trabajo se ha realizado gracias a las ayudas concedidas por la Fundación Piel Sana (Ayuda de la Fundación de la AEDV «EUROMELANOMA 2016»), el ISCIII (PI16/01559), el IISLaFe (2014/0370), y la Consellería de Educación, Investigación, Cultura y Deporte (GV/2016/064).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.ad.2018.10.003](https://doi.org/10.1016/j.ad.2018.10.003).

## Bibliografía

1. Heidenreich B, Kumar R. TERT promoter mutations in telomere biology. *Mutat Res*. 2017;771:15-31.
2. Heidenreich B, Rachakonda PS, Hemminki K, Kumar R. TERT promoter mutations in cancer development. *Curr Opin Genet Dev*. 2014;24:30-7.
3. Parris CN, Jezard S, Silver A, MacKie R, McGregor JM, Newbold RF. Telomerase activity in melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Cancer*. 1999;79:47-53.
4. Rudolph P, Schubert C, Tamm S, Heidorn K, Hauschild A, Michalska I, et al. Telomerase activity in melanocytic lesions: A potential marker of tumor biology. *Am J Pathol*. 2000;156:1425-32.
5. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*. 2013;339:959-61.
6. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. *N Engl J Med*. 2015;373:1926-36.
7. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*. 2013 Feb 22;339:957-9.
8. Pópulo H, Boaventura P, Vinagre J, Batista R, Mendes A, Caldas R, et al. TERT promoter mutations in skin cancer: the effects of sun exposure and X-irradiation. *J Invest Dermatol*. 2014;134:2251-7.
9. Heidenreich B, Nagore E, Rachakonda PS, Garcia-Casado Z, Requena C, Traves V, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in primary cutaneous melanoma. *Nat Commun*. 2014;5:3401.
10. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*. 2013;339:959-61.

11. Lee S, Opresko P, Pappo A, Kirkwood JM, Bahrami A. Association of TERT promoter mutations with telomerase expression in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016;29:391–3.
12. Vallarelli AF, Rachakonda PS, André J, Heidenreich B, Riffaud L, Bensussan A, et al. TERT promoter mutations in melanoma render TERT expression dependent on MAPK pathway activation. *Oncotarget.* 2016;7:53127–36.
13. Griewank KG, Murali R, Puig-Butille JA, Schilling B, Livingstone E, Potrony M, et al. TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106.
14. Andrés-Lencina JJ, Rachakonda S, García-Casado Z, Srinivas N, Skorokhod A, Requena C, et al. TERT promoter mutation subtypes and survival in stage I and II melanoma patients. *Int J Cancer.* 2018;2, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.31780>.
15. Nagore E, Heidenreich B, Rachakonda S, Garcia-Casado Z, Requena C, Soriano V, et al. TERT promoter mutations in melanoma survival. *Int J Cancer.* 2016;139:75–84.
16. Rachakonda S, Srinivas N, Mahmoudpour SH, Garcia-Casado Z, Requena C, Traves V, et al. Telomere length and survival in primary cutaneous melanoma patients. *Sci Rep.* 2018;8:10947.
17. Rachakonda S, Kong H, Srinivas N, Garcia-Casado Z, Requena C, Fallah M, et al. Telomere length, telomerase reverse transcriptase promoter mutations, and melanoma risk. *Genes Chromosomes Cancer.* 2018;11, <http://dx.doi.org/10.1002/gcc.22669>.
18. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67:472–92.
19. Requena C, Botella-Estrada R, Traves V, Nagore E, Almenar S, Guillén C. Regresión en el melanoma: problemas en su definición e implicación pronóstica. *Actas Dermosifiliog.* 2009;100:75.
20. Nagore E, Hacker E, Martorell-Calatayud A, Traves V, Guillen C, Hayward NK, et al. Prevalence of BRAF and NRAS mutations in fast-growing melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26:429–31.
21. Vinagre J, Almeida A, Pópulo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, et al. Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nat Commun.* 2013;4:2185.
22. Hugdahl E, Kalvenes MB, Mannelqvist M, Ladstein RG, Akslen LA. Prognostic impact and concordance of TERT promoter mutation and protein expression in matched primary and metastatic cutaneous melanoma. *Br J Cancer.* 2018;118:98–105.
23. Kohli JS, Mir H, Wasif A, Chong H, Akhras V, Kumar R, et al. ETS1, nucleolar and non-nucleolar TERT expression in nevus of melanoma progression. *Oncotarget.* 2017;8:104408–17.
24. Somasundaram R, Villanueva J, Herlyn M. Intratumoral heterogeneity as a therapy resistance mechanism: role of melanoma subpopulations. *Adv Pharmacol.* 2012;65:335–59.
25. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH, Treacy D, Trombetta JJ, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science.* 2016;352:189–96.
26. Zygouris P, Tsiambas E, Tiniakos D, Karameris A, Athanassiou AE, Kittas Ch, et al. Evaluation of combined h-TERT, bcl-2, and caspases 3 and 8 expression in cutaneous malignant melanoma based on tissue microarrays and computerized image analysis. *J BUON.* 2007;12:513–9.
27. Ramirez RD, D'Atri S, Pagani E, Faraggiana T, Lacal PM, Taylor RS, et al. Progressive increase in telomerase activity from benign melanocytic conditions to malignant melanoma. *Neoplasia.* 1999;1:42–9.
28. Miracco C, Pacenti L, Santopietro R, Laurini L, Biagioli M, Luzi P. Evaluation of telomerase activity in cutaneous melanocytic proliferations. *Hum Pathol.* 2000;31:1018–21.
29. Carvalho L, Lipay M, Belfort F, Santos I, Andrade J, Haddad A, et al. Telomerase activity in prognostic histopathologic features of melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2006;59:961–8.
30. De Unamuno Bustos B, Murria Estal R, Pérez Simó G, de Juan Jimenez I, Escutia Muñoz B, Rodríguez Serna M, et al. Towards personalized medicine in melanoma: implementation of a clinical next-generation sequencing panel. *Sci Rep.* 2017;7:495.
31. Chakrabarti M, Banik NL, Ray SK. miR-138 overexpression is more powerful than hTERT knockdown to potentiate apigenin for apoptosis in neuroblastoma in vitro and in vivo. *Exp Cell Res.* 2013;319:1575–85.
32. Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, Iwaya T, Shibasaki M, Yashima-Abo A, et al. Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Sci.* 2008;99:280–6.
33. Seynnaeve B, Lee S, Borah S, Park Y, Pappo A, Kirkwood JM, et al. Genetic and epigenetic alterations of TERT are associated with inferior outcome in adolescent and young adult patients with melanoma. *Sci Rep.* 2017;7:45704.
34. Fullen DR, Zhu W, Thomas D, Su LD. hTERT expression in melanocytic lesions: an immunohistochemical study on paraffin-embedded tissue. *J Cutan Pathol.* 2005;32:680–4.