



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

**ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN MELANOMAS  
MUCOSOS ORALES PRIMARIOS.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**C I R U J A N A   D E N T I S T A**

**P R E S E N T A:**

**MARIANA ELISA RAMÍREZ MITRE**

**TUTORA: Dra. MARÍA DOLORES JIMÉNEZ FARFÁN**

**ASESORES: Dr. JUAN CARLOS CUAUHTÉMOC HERNÁNDEZ  
GUERRERO  
Dr. MARCO ANTONIO DURÁN PADILLA**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Agradecimientos**

Agradezco enormemente a Dios por permitirme llegar a este momento, porque a pesar de todas las adversidades que he atravesado a lo largo de mi vida, me ha permitido seguir en este mundo y además nunca me ha dejado sola. Creo vehemente que Dios tiene un plan perfecto para cada uno de nosotros, y de su mano siempre caminaré. Desde lo más hondo de mi corazón, gracias por dejarme llegar hasta aquí.

A mi padre, por todas sus enseñanzas, porque de niña no lo entendía, pero todas las llamadas de atención que me dió me permitieron llegar aquí; su crianza fue crucial para terminar este trabajo.

A mi madre, por todas las veces que me acompañó a la Facultad, por ser mi primer paciente, por aguantar mi mal carácter cuando llegaba estresada de la escuela, por siempre alentarme a seguir adelante y por todo su amor incondicional.

A mi tía Elisa, por ser ejemplo para mí, por siempre consentirme, darme consejos, echarme porras en mi tesis y por nunca dejarme sola.

A mi hermano Vladimir, por apoyarme siempre en todo lo que ha podido.

A mi amiga que se convirtió en mi Hermana Daniela, por apoyarme a lo largo de toda la carrera, porque sin ella el camino hubiera sido más difícil. Agradezco también a todas las amigas que me brindaron palabras de apoyo y que siempre han estado para mí.

Al Dr. Felipe de Jesús García León que me presentó las vías de señalización y que me contagió esa hambre de conocimiento para saber más sobre ellas.

A la Dra. María Dolores Jiménez Farfán, por abrirme las puertas en el laboratorio, por confiar en mí, enseñarme otra cara de la Odontología, introducirme en este camino e impulsarme a ser cada vez una mejor profesionalista.

A todos los integrantes del Laboratorio de Inmunología, por brindarme su apoyo y, a mis compañeros por todas las risas y momentos agradables en él.

A todos mis perros que me acompañaron a lo largo del camino, porque hacen mi vida más feliz.

Y, finalmente gracias a mí, por mi resiliencia y dedicación para realizar este trabajo.

***“Rascar donde no pica es dejarte seducir por nuevos intereses además de los que ya tienes, mantener un constante espíritu de búsqueda entre lo desconocido y permitir que la curiosidad sea la que guíe tu aprendizaje.”***

*Del libro «Rascar donde no pica», Pere Estupinyá, 2012.*

## INDICE

<b>1. Introducción</b>	1
<b>2. Antecedentes</b>	2
• 2.1 Melanogénesis	2
• 2.2 Melanoma mucoso oral	5
2.2.1 Características clínicas	6
2.2.2 Diagnóstico y tratamiento	7
2.2.3 Patogénesis	10
• 2.3 Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) y mecanismos antioxidantes	11
• 2.4 Melanoma y mecanismos antioxidantes	14
2.4.1 NRF2/KEAP1 y melanoma	16
2.4.2 Enzimas antioxidantes y melanoma	19
<b>3. Planteamiento del problema</b>	22
<b>4. Justificación</b>	23
<b>5. Objetivos</b>	24
• 5.1 General	
• 5.2 Específicos	
<b>6. Hipótesis</b>	24
<b>7. Materiales y métodos</b>	24
• 7.1 Materiales	
• 7.2 Método	
7.2.2 Variables	
7.2.3 Financiamiento	
<b>8. Resultados y Discusión</b>	27
<b>9. Conclusiones</b>	33
<b>10. Anexos</b>	34
<b>11. Referencias</b>	42

## 1.INTRODUCCIÓN

El melanoma es una neoplasia maligna derivada de los melanocitos, representa la forma más agresiva del cáncer en piel y, puede desarrollarse en mucosas. Su incidencia y mortalidad varían ampliamente en el mundo.<sup>51</sup> GLOBOCAN en 2020 registró un total de 325,000 nuevos casos y alrededor de 57,000 defunciones.<sup>1</sup> En Estados Unidos, el programa The Surveillance Epidemiology and End Results reportó incremento en la tasa de incidencia del 1.5% anual en los últimos 10 años.<sup>2</sup>

El Melanoma Mucoso (MM) representa menos del 1% de todos los melanomas. La mayor incidencia se encuentra en la región de cabeza y cuello (55.4%), seguida del ano y el recto (23.8%), el tracto reproductor femenino (18%) y la mucosa del tracto urinario (2.8%).<sup>3</sup> Aunque los factores de riesgo del melanoma de piel están bien identificados (exposición solar, bronceado en interiores, inmunosupresión, presencia de nevos, historial familiar), en el caso particular de los MM no existe una asociación directa para su aparición y desarrollo. Aunque algunos estudios sugieren el papel de los virus como el VPH y VHS o, la exposición a agentes químicos como el aldehído, no existen causas contundentes para establecer una asociación.<sup>4</sup>

Un aspecto relevante del estudio del cáncer es conocer los mecanismos que llevan a su aparición, crecimiento y desarrollo, así como su capacidad para invadir el organismo. En las últimas décadas, se ha demostrado que la alteración del equilibrio REDOX es una de las razones más importantes que subyacen al desarrollo del cáncer, su progresión y metástasis.<sup>5</sup>

## 2. ANTECEDENTES

En el nivel basal de la epidermis se encuentran los melanocitos, células encargadas de la producción del pigmento absorbente de rayos UV conocido como melanina.<sup>6</sup> Los melanocitos son células dendríticas derivadas del neuroectodermo cuyos precursores los melanoblastos son células no pigmentadas que se originan de la cresta neural. Tras el cierre del tubo neural, los melanoblastos migran a varias regiones del cuerpo por medio de la vía dorsolateral en la que están implicadas diversas tipos de interacciones entre factores de transcripción y moléculas de señalización<sup>51</sup>, para finalmente diferenciarse en melanocitos.<sup>7</sup> Los melanocitos son capaces de absorber la radiación ultravioleta (UVR) y sobrevivir al estrés genotóxico considerable gracias a la producción de melanina. En este sentido, los melanocitos brindan fotoprotección y termorregulación a la piel mediante la melanina.<sup>8</sup>

Las funciones de los melanocitos en la mucosa oral permanecen sin ser del todo claras. No obstante, se sabe que al igual que en la piel, los melanocitos producen melanina que además de contribuir al color de la mucosa oral, proporcionan protección contra factores estresantes como los radicales libres derivados de la inflamación constante inducida entre otros, por la microbiota oral<sup>82</sup>. Asimismo, los melanocitos tienen la capacidad de secuestrar iones metálicos<sup>82</sup>, producir citocinas antiinflamatorias, actuar como células presentadoras de antígenos, activar a los linfocitos T, e inhibir la proliferación de microorganismos bacterianos y fúngicos.<sup>52, 82</sup>

### 2.1 Melanogénesis.

Existen dos tipos principales de melanina: feomelanina (roja/amarilla) y eumelanina (marrón/negra).<sup>8</sup> La producción de melanina ocurre en los melanosomas, organelos donde es sintetizada, empaquetada en forma de gránulos y, transferida a los queratinocitos. El transporte de los melanosomas hacia los queratinocitos se realiza mediante proteínas motoras asociadas a los microtúbulos de las dendritas del melanocito

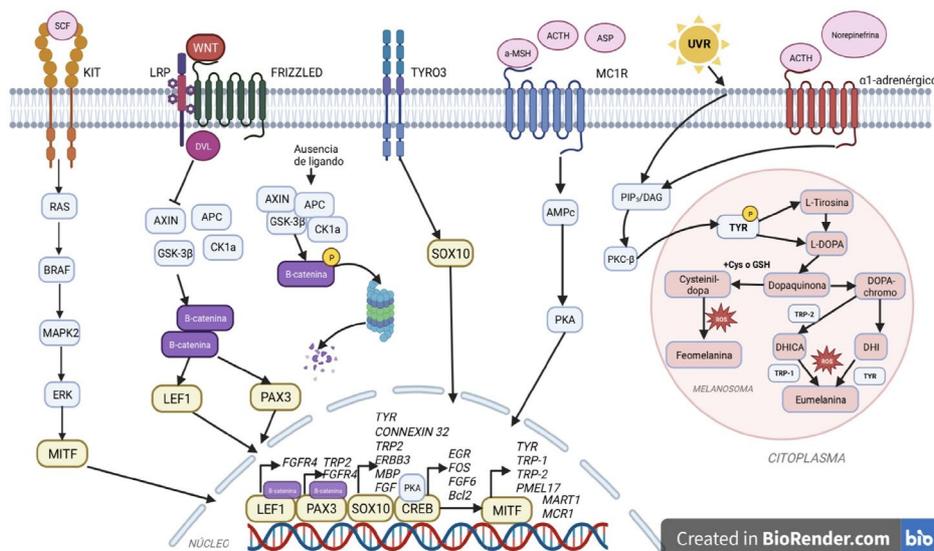
(kinesinas y dineínas citoplasmáticas).<sup>56</sup> Una vez en los queratinocitos, los melanosomas se distribuyen sobre los núcleos para así protegerlos de posibles daños, en una distribución que algunos autores han descrito en “forma de sombrilla”.<sup>8</sup> La eumelanina y feomelanina se producen gracias a una serie de reacciones químicas mediadas por enzimas melanogénicas específicas como la tirosinasa (TYR), la proteína-1 relacionada con la tirosinasa (TRP-1) y la proteína-2 relacionada con la tirosinasa (TRP-2). La producción de estas enzimas es dirigida por el factor transcripcional MITF, cuya actividad está mediada por una serie de vías de señalización que incluyen PKC, cAMP, MEK y WNT. Estas vías se activan por receptores como KIT (ligando SCF) y MC1R (ligandos  $\alpha$ -MSH, ACTH y ASP).<sup>7</sup> El factor de transcripción MITF a su vez es regulado por SOX10, PAX3, CREB y LEF1<sup>8</sup>.

SOX10 pertenece a la familia de factores de transcripción SOX, involucrados en múltiples procesos del desarrollo embrionario donde controlan la troncalidad, el destino celular y la diferenciación.<sup>9</sup> *PAX3* codifica un miembro de la familia PAX de factores de transcripción expresado durante el desarrollo del músculo esquelético, el sistema nervioso central y los derivados de la cresta neural, y regula la expresión de genes diana que impactan en la proliferación, supervivencia, diferenciación y motilidad en estos linajes.<sup>10</sup> *CREB* (proteína de unión al elemento de respuesta de AMP cíclico 1), codifica un factor de transcripción que regula la expresión de varios genes, incluidos los oncogenes *c-Jun* y *ciclina D*.<sup>90</sup> Finalmente LEF1 (Factor de unión al potenciador linfocitario 1) es un factor de transcripción de la vía de señalización Wnt, que controla la proliferación, supervivencia y diferenciación de las células hematopoyéticas.<sup>91</sup>

La síntesis de melanina es iniciada a partir de la activación de la enzima tirosinasa, que cataliza la hidroxilación de L-tirosina a L-dopa y posteriormente a dopaquinona.<sup>92</sup> A partir de la dopaquinona, las vías de la eumelanina y la feomelanina divergen, ya que la dopaquinona puede ser precursora de la formación de feomelanina a través de la conversión a

cisteinil dopa, que es un producto de la condensación de la dopaquinona y el aminoácido L-cisteína.<sup>8</sup> La feomelanina además puede producir entre sus subproductos, peróxido de hidrógeno, superóxido y radicales hidroxilo, consideradas especies reactivas del oxígeno capaces de provocar daños en el ADN.<sup>8</sup>

La dopaquinona también puede dar origen a dopacromo que pasa por una descarboxilación espontánea a 5,6- dihidroxindol (DHI) o por medio de TRP2 a ácido carboxílico 5,6-dihidroindol-2 (DHICA). Finalmente, DHI y DHICA son oxidados por TYR o por TRP1 para formar eumelanina.<sup>92</sup> Los melanocitos sintetizan ambos tipos de melanina, pero el predominio de cierto tipo de melanina dependerá de factores como la cantidad de producción de las enzimas melanogénicas (**Figura 1**).<sup>8</sup>



**Figura 1. Melanogénesis.** La síntesis de eumelanina y feomelanina dentro de los melanosomas implica una serie de reacciones enzimáticas mediadas por TYR, TRP1 y TRP2 cuya transcripción depende de la expresión de MITF.<sup>7</sup> La expresión de MITF se encuentra mediada por la vía de señalización RAS/MAPK/ERK, que induce su traslocación.<sup>8</sup> Cofactores como PAX3, LEF1(vía WNT/β-catenina), CREB (vía AMPc) y SOX10 (vía TYRO3)<sup>135</sup> sinergizan e inducen la actividad de MITF, además de que también participan en la melanocitogénesis mediante la expresión de diferentes genes como TRP2.<sup>136</sup> MITF también induce la transcripción de genes importantes para el melanocito como *PMEL17*, *MART1* y *MCR1*.<sup>137</sup> Por otra parte la UVR, así como la unión de ACTH y norepinefrina al receptor α-adrenérgico inducen la formación de los segundos mensajeros DAG y PIP3 que activan PKC-β y, subsecuentemente éste es capaz de fosforilar TYR incrementando la producción de melanina.<sup>56</sup> Diseño de la imagen: Mariana Elisa Ramírez Mitre mediante el software *Biorender.com*

## 2.2 Melanoma mucoso oral

Los melanomas se han clasificado en función del tejido del que surge el tumor primario: melanoma cutáneo (MC) que surge en la piel no glabra, el melanoma acral (MA) que se origina en la piel glabra de las palmas, las plantas y los lechos ungueales y, el melanoma mucoso (MM) que puede originarse de cualquier tipo de mucosa.<sup>11</sup>

En el caso particular de los melanomas de la mucosa oral (MMO), diversos autores coinciden<sup>12,13</sup> en clasificarlos de acuerdo a su patrón histopatológico: melanoma *in situ*, invasor y combinado. Otros autores consideran que la mayoría de los MMO presentan características clínicas e histopatológicas de melanoma acral lentiginoso y, sugieren considerarlos como dicha entidad.<sup>14</sup>

Los factores de riesgo asociados al melanoma cutáneo están bien identificados. A continuación se mencionan algunos:

- La exposición solar es el principal factor de riesgo, ya que la exposición a luz UV induce fotoproductos de ADN, más comúnmente dímeros de timidina que si no se reparan, causan errores en la replicación del ADN, mutaciones en los genes que codifican moléculas clave de la señalización celular y, finalmente puede producirse la transformación maligna de la células afectadas. Las moléculas mutadas incluyen miembros de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAP-K) como NRAS y BRAF, responsables del crecimiento y la diferenciación celular. BRAF está más comúnmente mutado en pacientes muy jóvenes con numerosos nevos y exposición al sol y, en aquellos con melanoma de extensión superficial (hasta el 50%).<sup>57</sup> Las mutaciones inducidas por rayos UV en el supresor tumoral p53 se observan con mayor frecuencia en aquellos casos con enfermedad en estadio IV y se asocian con un peor pronóstico.<sup>15</sup>
- El bronceado en interiores genera la exposición a niveles más altos de exposición a UVA y UVB que el del sol diario. En 2009, la OMS declaró como carcinógenos a los dispositivos de bronceado en interiores para los seres humanos y la Agencia Internacional para la Investigación del

Cáncer (IACR) identificó la capacidad cancerígena de las camas de bronceado.<sup>16</sup>

- Un estado inmunosuprimido como ocurre en los pacientes VIH+ o, en personas cuyas enfermedades han requerido el uso crónico de fármacos inmunosupresores presentan mayor riesgo de desarrollar melanoma.<sup>87</sup>
- Los nevos pueden sufrir transformación y se estima que la tasa oscila entre el 0.005% en menores de 40 años y, el 0.003% en mayores de 60 años.<sup>1</sup> A mayor número de nevos (>100) se incrementa hasta 7 veces el riesgo de desarrollar melanoma.<sup>17</sup>
- Un historial familiar de melanoma ha sido reportado en 10% de los pacientes enfermos.<sup>18</sup> Algunos síndromes congénitos se han asociado al desarrollo de melanomas, tales como los síndromes neoplásicos familiares como el cáncer de mama, laringe, gastrointestinal, y sobre todo páncreas. Otros síndromes familiares más raros asociados a melanoma son la neurofibromatosis tipo I, el síndrome de Li-Fraumeni, el retinoblastoma o el melanoma ocular.<sup>19</sup> Particularmente se ha identificado que las mutaciones en el gen *CDKN2A* (inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2A) están implicadas hasta en el 30% de los melanomas hereditarios.<sup>20</sup>

En el caso de los melanomas mucosos se conoce muy poco sobre los factores de riesgo y no existe información concluyente. Algunos autores han considerado las infecciones virales como el VPH y el VHH, así como la exposición al aldehído como posibles factores de riesgo.<sup>21</sup>

### **2.2.1 Características clínicas**

La forma clínica en que se presenta un melanoma depende fundamentalmente de su patrón de crecimiento.<sup>22</sup> La gran mayoría inician con una fase de crecimiento radial y posteriormente, una fase de crecimiento vertical. La primera consiste en una proliferación celular intraepitelial que se extiende lateralmente y, que se observa clínicamente como una lesión plana,<sup>22</sup> parche o placa pigmentada.<sup>23</sup> La fase vertical se refiere a un crecimiento hacia el tejido conjuntivo, y en consecuencia, hacia

la vecindad de estructuras vasculares y linfáticas aumentando la probabilidad de metástasis. La relación entre la duración de las fases clínicas radial y vertical determina la forma clínica.<sup>22</sup>

Los melanomas cutáneos, uveales, acrales y mucosos tienen cursos clínicos diferentes y están asociados con mutaciones distintas. Los fenotipos de melanoma también se pueden clasificar en función de la morfología histopatológica, como la extensión superficial, la nodular, la desmoplásica, entre otras.<sup>24</sup>

De acuerdo con su aspecto clínico, los MMO varían desde lesiones de aspecto macular o en placa (que frecuentemente corresponden a melanomas *in situ* en el examen histopatológico) hasta lesiones nodulares con ulceración, las cuales usualmente son de tipo invasor o combinado. Desafortunadamente, la mayoría de los casos se diagnostican en etapas avanzadas de la enfermedad cuando existe invasión a los tejidos subyacentes, lo que podría explicar la tasa baja de supervivencia de los pacientes afectados.<sup>14</sup>

Clínicamente, las lesiones del MMO suelen ser indoloras, de forma irregular, en forma de pápulas de color marrón a negro, que pueden agrandarse progresivamente, crecer en nódulos o masas exofíticas y pigmentarse gradualmente más profundamente. Las lesiones avanzadas pueden ser dolorosas, ulcerosas y frágiles y sangrar fácilmente. La pigmentación suele ser no uniforme con tonos moteados de gris, azul oscuro, marrón oscuro o negro y puede haber presencia de lesiones satélite.<sup>52</sup> También se ha descrito el melanoma amelanótico de la mucosa oral, caracterizado por la ausencia de pigmentación de melanina y a menudo acompañado de eritema y ulceración.<sup>54</sup> El paladar y la encía del maxilar son los sitios más frecuentemente afectados para ambas entidades.<sup>53</sup>

### **2.2.2 Diagnóstico y tratamiento**

El diagnóstico de melanoma se define histológicamente, y se apoya con resultados inmunohistoquímicos y análisis genómico.<sup>23</sup>

A nivel histológico los MMO se pueden clasificar en 3 patrones microscópicos: *in situ*, invasivo y combinado.<sup>52</sup> *In situ*, donde la neoplasia se limita intraepitelialmente; en la interfase epitelio/conectivo o invasivo, cuando la neoplasia ya ha invadido tejido conectivo y, combinado cuando la neoplasia se encuentra en la profundidad del tejido conjuntivo y con actividad proliferativa maligna intraepitelial.<sup>89</sup> El estroma tumoral puede estar constituido de diversos melanocitos con formas atípicas (epitelioides, fusiformes y plasmocitoides), con núcleo vesicular grande y nucléolos prominentes. Además, las células tumorales pueden estar agregadas en láminas o agrupadas en “nidos” y, con menos frecuencia se observan configuraciones neurotrópicas o desmoplásicas.<sup>28</sup> La melanina puede estar presente en las células tumorales, en macrófagos y en el espacio extracelular. En el caso del melanoma amelanótico no hay presencia de melanina.<sup>52</sup>

La revisión de melanoma que se desarrolló para la Clasificación de Tumores Cutáneos de la OMS (2018) establece sus bases considerando las características histológicas, clínicas, epidemiológicas y genéticas.<sup>23</sup> Esta clasificación distingue a los melanomas en 9 vías: vía I melanoma de extensión superficial, vía II melanoma lentiginoso maligno, vía III melanoma desmoplásico, vía IV melanoma de Spitz, vía V melanoma acral, vía VI melanomas mucosos, vía VII melanomas que surgen en los nevos congénitos, vía VIII melanomas que surgen de nevos azules y, vía IX melanoma uveal.<sup>23</sup>

Por otra parte el American Joint Committee of Cancer estableció en el 2018 el estadiaje para el melanoma mucoso tomando en cuenta la severidad de la patología. Comenzando con un estadio T3N0 y hasta T4b, siendo este último correspondiente a una etapa avanzada de la enfermedad.<sup>3</sup>

La Sociedad Europea de Patología, la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer y EURACAN, sugieren que los laboratorios de patología realicen pruebas básicas de inmunohistoquímica que incluyan marcadores como HMB-45, SOX10, MITF, MART-1, p16, Ki-

67, BAP1,  $\beta$ -catenina, y al menos un método molecular para detectar mutaciones en el codón 600 de *BRAF* y *NRAS*.<sup>25</sup>

El diagnóstico de MMO en comparación con el MC, representa un reto debido a la falta de sintomatología en estadios tempranos, lo que genera diagnósticos avanzados de las lesiones.<sup>58</sup> Existen métodos diagnósticos que resultan útiles cuando se sospecha de que una lesión pueda coincidir con MMO. Clínicamente se ha descrito que la regla ABCDE (utilizada principalmente para diagnosticar melanoma cutáneo) es útil también en el MMO.<sup>59</sup> La regla ABCD descrita por Robert Friedman en 1985, establece que la asimetría (A), la irregularidad del borde (B), la variedad de color (C) y, el diámetro generalmente mayores de 6 mm (D) son características que ayudarían al diagnóstico temprano de melanoma maligno. En 2004 se añadió la característica "evolución" (E).<sup>60</sup>

Otro método eficaz que ha sido descrito por Delgado y Mosqueda (2003), es el de "frotamiento con gasa", que consiste en frotar una gasa en la superficie de la lesión con el objetivo de verificar si la gasa se tiñe de color negro o marrón oscuro, lo que puede ser indicativo diagnóstico de melanoma.<sup>61</sup> Sin embargo, el estándar de oro para cualquier lesión de este tipo es el estudio histopatológico.<sup>23</sup>

Las células de MMO expresan los marcadores melanocíticos MART-1, HMB-45, MITF, TYR y S-100 en diversos grados. Estos marcadores se pueden detectar mediante inmunohistoquímica, aunque no son totalmente específicos y los resultados deben ser relacionados con la histopatología y la clínica.<sup>52</sup>

Para la mayoría de los pacientes con melanoma en estadio temprano, la excisión quirúrgica representa el tratamiento de elección y es curativa en la mayoría de los casos.<sup>26</sup> Según Zitelli *et al.*, los márgenes deben ser de al menos 1.5 cm para la lesión en el melanoma de la cabeza y el cuello o, de 2.5 cm para los melanomas de más de 3 cm de diámetro.<sup>66</sup>

Aproximadamente el 10% de los casos se diagnostican en una etapa avanzada y son irresecables. Entre los tumores en estadio IV, aproximadamente un tercio tiene compromiso visceral y cerebral, con un

pronóstico grave y una menor probabilidad de tener una respuesta sostenida al tratamiento.<sup>26</sup> Para los pacientes que se enfrentan a una enfermedad en estadio avanzado, el tratamiento incluye inhibidores de RAF y la cinasa MEK, así como inhibidores inmunitarios anti-CTLA4 y anti-PD1 (como nivolumab, pembrolizumab e ipilimumab).<sup>27</sup>

### **2.2.3 Patogénesis**

En la actualidad se desconocen muchos aspectos de la patogénesis del melanoma mucoso (MM). Se han reconocido algunos cambios en ciertos genes y rutas metabólicas.<sup>28</sup> En cuanto a las mutaciones en *BRAF* y *NRAS* presentes en los melanomas cutáneos (MC), éstas son menos frecuentes en el MM.<sup>29</sup> En cambio, las mutaciones en *SF3B1* y *KIT*, la pérdida de *CDKN2A*, *PTEN* o *SPRED1*, así como la amplificación de *CDK4*, *TERT*, *KIT*, *MDM2* o *CCND1* son más comunes en el MM.<sup>29</sup>

Bajo estas diferencias, el MM parece tener marcas moleculares distintas a las del MC, lo cual explicaría su comportamiento clínico. Por ejemplo, el MM tiene una carga mutacional somática significativamente menor a la del MC, así como una menor frecuencia de mutaciones en *BRAF-V600E* y, una respuesta menos efectiva a la inmunoterapia.<sup>30</sup> Los datos recientes sugieren un aumento en la expresión de c-KIT (CD117) en el MM, el cual se sobreexpresa en más del 80% de los casos.<sup>4</sup>

c-KIT es un receptor tirosina cinasa transmembrana (RTK) que se expresa comúnmente en diversos tipos de células normales y su activación desempeña un papel importante en el desarrollo normal de los melanocitos.<sup>31</sup> Una vez que se activa a través de la dimerización, regula la activación de varias vías oncogénicas de señalización como MAPK y AKT.<sup>31</sup>

El gen *SPRED1* también se ha reportado con mutaciones en el MM (7% al 26% de los casos),<sup>30</sup> dado que actúa como un gen supresor tumoral al reclutar NF1 en la membrana plasmática, donde inhibe la señalización RAS-GTP. Esta inhibición puede generar un aumento en la señalización MAPK.<sup>21</sup>

El gen *SF3B1* mutado se ha identificado en el melanoma uveal (20%) y el MM (42%), especialmente en genitales y anorrecto femeninos.<sup>30</sup>

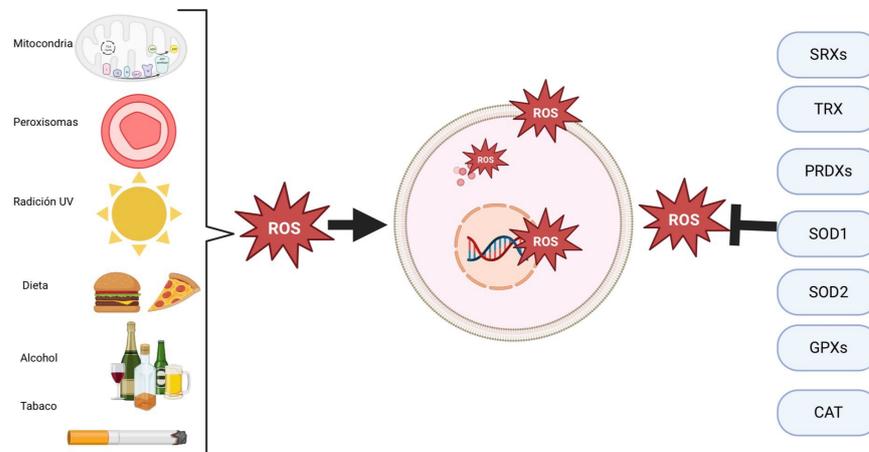
*NF1* (Neurofibromina 1) es un regulador negativo de Ras y se pierde o presenta mutaciones en diversas neoplasias malignas. En un estudio realizado por Nassar y cols, observaron que *NF1* está mutado en un 14% de los MM, similar a lo observado en MC (14%).<sup>29</sup>

A pesar de que se han identificado genes y rutas metabólicas alteradas en pacientes con MMO, el origen de la neoplasia permanece desconocido.<sup>28</sup> Una de las hipótesis está relacionada con los nichos reservorios de células madre/progenitoras de los melanocitos, que a través del tiempo adquieren alteraciones citogenéticas y epigenéticas. Estos nichos permanecen sin ser identificados.<sup>52</sup>

### **2.3 Especies reactivas del oxígeno (ROS) y mecanismos antioxidantes.**

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) como el anión superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) son moléculas que contienen y participan en la transferencia de electrones desde el oxígeno reactivo.<sup>32</sup> Son producidas como resultado de diferentes procesos oxidativos físicos y bioquímicos normales en el cuerpo.<sup>61</sup> Las ROS desempeñan un papel importante en procesos fisiológicos dentro de la célula, actuando como moléculas mensajeras que regulan una amplia variedad de procesos celulares incluyendo la proliferación, la diferenciación y la apoptosis. Además tienen participación en la respuesta inmunológica contra agentes biológicos externos por medio del proceso inflamatorio.<sup>62</sup> A bajas concentraciones las ROS exhiben un efecto beneficioso en el cuerpo humano, sin embargo cuando estas moléculas superan las concentraciones normales pueden causar daño en el ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos (**Figura 2**).<sup>61</sup> En una célula normal, los niveles de

ROS se equilibran a través de numerosos procesos de desintoxicación regulados a través de mecanismos antioxidantes.<sup>5</sup>



Created in BioRender.com bio

**Figura 2. Equilibrio REDOX.** Las ROS se generan a partir de fuentes intrínsecas (mitochondria y peroxisomas), así como extrínsecas (UVR, dieta alta en grasas, alcohol y tabaco). Las ROS generadas a partir de estas fuentes, pueden ocasionar daño en lípidos, proteínas y ADN.<sup>61</sup> Sin embargo, las enzimas antioxidantes como SRXs, TRX, PRDXs, SODs, GPXs y CAT son capaces de transformar las ROS a H<sub>2</sub>O evitando el daño a la célula.<sup>32</sup> **Diseño de la imagen:** Mariana Elisa Ramírez Mitre mediante el software Biorender.com

Antioxidante es un término genérico utilizado para describir una enzima o cofactor que participa en la eliminación de ROS.<sup>32</sup> La homeostasis de las ROS es mantenida a través del equilibrio entre la producción y la expulsión por estos mecanismos antioxidantes, lo que implica evitar la producción y acumulación excesiva de ROS, el daño celular, las mutaciones del ADN, y, la transformación maligna.<sup>33</sup> De hecho, un aumento permanente de los niveles de ROS que superen las defensas celulares antioxidantes, o un sistema antioxidante deficiente, puede resultar en un estado de "estrés oxidativo" que provoque graves modificaciones en las funciones de los componentes celulares.<sup>34</sup>

Para mantener el equilibrio REDOX los organismos cuentan con sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Enzimáticos como las superóxido dismutasas (SODs), catalasa (CAT) tioredoxina (Trx), peroxiredoxinas (PRDXs), sulfiredoxinas (SRXs), glutathion

peroxidasas(GPX)<sup>43</sup> y glutaredoxinas (GRXs).<sup>34</sup> Estas enzimas son inducidas a partir del factor de transcripción NRF2, a excepción de catalasa que es inducida por Sp1.<sup>88</sup>

- **SODs.** Entre las moléculas enzimáticas antioxidantes se encuentran las superóxido dismutasas (SOD) que catalizan la conversión de radicales superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en oxígeno ( $O_2$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Todos los mamíferos poseen tres isoformas de SOD: Cu/ZnSOD (SOD1), el MnSOD mitocondrial (SOD2) y el extracelular Cu/ZnSOD (SOD3).<sup>36</sup> De los tres miembros de la familia, SOD1 y SOD2 se encuentran dentro de la mitocondria, mientras que SOD3 se localiza principalmente a nivel extracelular.<sup>36</sup> SOD1 se localiza en el espacio intermembranal de la mitocondria y el citosol <sup>37</sup>, y tiene la capacidad de convertir radicales  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ .<sup>38</sup> SOD1 se sobreexpresa en numerosas neoplasias malignas tales como el adenocarcinoma pulmonar<sup>39</sup>, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, en neoplasias malignas primarias de mama<sup>40</sup>, así como en la fase de crecimiento vertical del MC.<sup>41</sup> SOD2 se localiza en la matriz mitocondrial para catalizar la dismutación de  $O_2^{\bullet-}$  a  $H_2O_2$ . Ésta después es metabolizada por la enzima catalasa (CAT) en los peroxisomas o por la glutatión peroxidasa (GPX).<sup>37</sup>
- **CAT.** La catalasa es otra enzima que desempeña un papel fundamental en la protección de las células contra los efectos tóxicos del  $H_2O_2$ .<sup>42</sup> Esta enzima puede descomponer moléculas de  $H_2O_2$  en  $O_2$  y  $H_2O$  sin la producción de radicales libres.<sup>42</sup> Su transcripción, al contrario de SOD1, SOD2 y GPX1/2 aunque no ha sido del todo dilucidada se ha relacionado con el factor SP-1 y NF- $\kappa$ B.<sup>88</sup>
- **TRX.** El sistema de tiorredoxina, comprende NADPH, tiorredoxina (TRX) y tiorredoxina reductasa (TR, también conocida como TRXR). Se encuentra en todas las células y juega un papel vital en la preservación de un entorno intracelular reducido.<sup>63</sup> La actividad antioxidante del sistema TRX actúa principalmente mediante la transferencia de

electrones a peroxiredoxinas (PRXs) y algunos factores de transcripción sensibles al REDOX.<sup>64</sup>

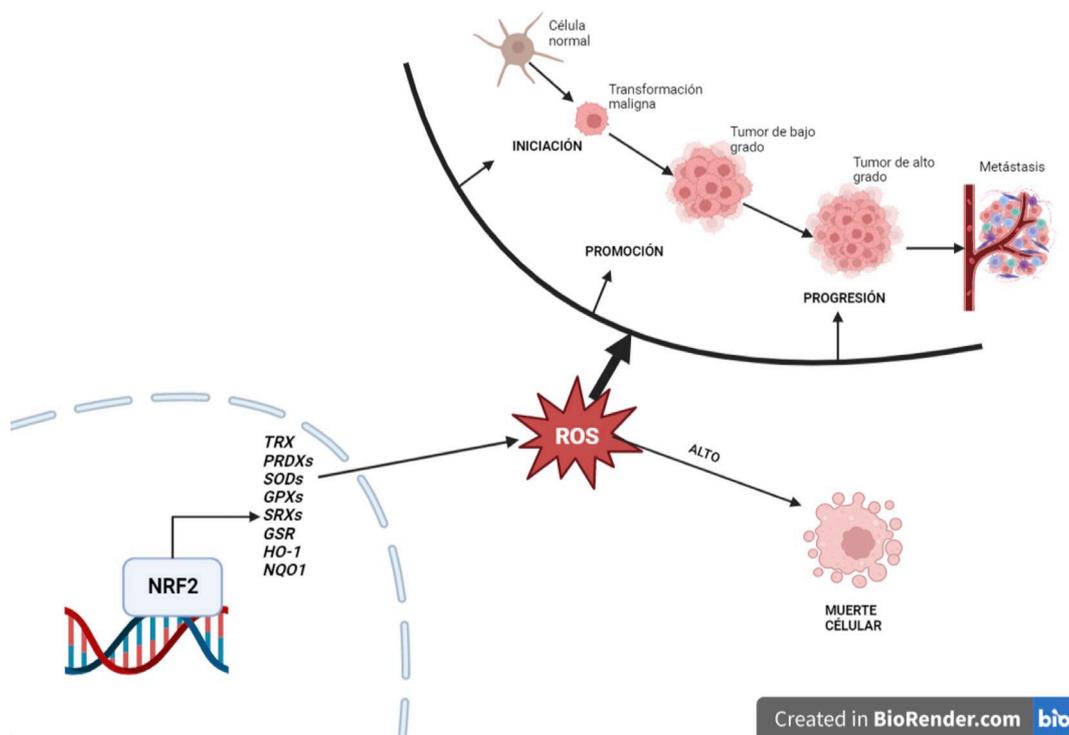
- **PRX's.** Las peroxiredoxinas son una familia muy grande de enzimas que reducen los peróxidos.<sup>65</sup>
- **GPX.** La enzima glutatión peroxidasa es una familia de múltiples isoenzimas derivadas del selenio que catalizan la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua. En los tejidos de mamíferos hay cuatro principales isoenzimas GPX dependientes del selenio: GPX clásico (GPX1) presente principalmente en los eritrocitos, hígado, pulmón y riñón; GPX gastrointestinal (GPX2); GPX plasmático (GPX3) presente en diferentes órganos como riñón, pulmón, epidídimo, placenta, vesícula seminal, corazón y músculo, y GPX fosfolípido (PHGPx4 o GPX4) ampliamente distribuida en diferentes tejidos.<sup>43</sup>

## ***2.4 Melanoma y mecanismos antioxidantes***

Por mucho tiempo se ha creído que los antioxidantes desempeñan un papel beneficioso como estrategia para combatir el cáncer.<sup>69</sup> Sin embargo, en años recientes y a través de diferentes estudios se ha demostrado que dependiendo del tipo, concentración y tiempo de exposición a los radicales libres, la respuesta puede no ser tan favorable.<sup>41, 68</sup>

Las células neoplásicas tienen un perfil metabólico diferente al de las células normales.<sup>46</sup> Las ROS, así como los diversos mecanismos antioxidantes pueden ser modulados por las células tumorales<sup>34</sup> en las diferentes etapas de la carcinogénesis.<sup>32</sup> Grandes cantidades de ROS generadas por las células cancerosas controlan los cambios moleculares que impulsan la iniciación, la promoción, la progresión y la resistencia tumoral.<sup>41</sup>

De acuerdo con la concentración y la duración de la exposición, las ROS pueden provocar inestabilidad genómica, activar oncogenes o inactivar genes supresores tumorales, modular las actividades de las vías de señalización involucradas en la proliferación del tumor y citocinas que se sabe son clave en la invasividad.<sup>102</sup> Las ROS son capaces de mediar los procesos de angiogénesis mediante la modulación de la proliferación y apoptosis de las células endoteliales.<sup>119</sup> También las ROS, en particular el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participa activamente en la dirección de varios eventos que son esenciales para la invasión de las células cancerosas y metastásicas (Figura 3).<sup>70</sup>



**Figura 3. Interacciones entre las ROS y antioxidantes durante la carcinogénesis.** Las ROS son necesarias para promover el proceso carcinogénico<sup>32</sup>, sin embargo si las ROS llegan a cantidades excesivas dentro de la célula, pueden conducirla hacia algún tipo de muerte celular.<sup>41</sup> Los mecanismos antioxidantes guiados principalmente por el factor de transcripción NRF2 serán de vital importancia para evitar la muerte de la célula, ayudando a regular las cantidades de ROS.  
Diseño de la imagen: Mariana Elisa Ramírez Mitre mediante el software *Biorender.com*

Se ha demostrado que alteraciones en la regulación de los mecanismos antioxidantes promueve el proceso carcinogénico y además resulta perjudicial en el tratamiento del melanoma, ya que su activación puede favorecer la

viabilidad de las células neoplásicas mediante la regulación de los niveles de ROS.<sup>34, 69, 71, 72, 82, 83.</sup>

En un inicio, se reconoció el papel protector de NRF2 debido a su capacidad para desintoxicar los carcinógenos y proteger a las células del daño por estrés oxidativo.<sup>45</sup> Sin embargo, NRF2, así como sus diferentes genes blanco, en estadios avanzados se ha involucrado en la modulación de la proliferación celular, invasión, angiogénesis y progresión tumoral, así como la quimioresistencia y radioresistencia de varios tumores malignos, incluyendo el melanoma.<sup>44</sup>

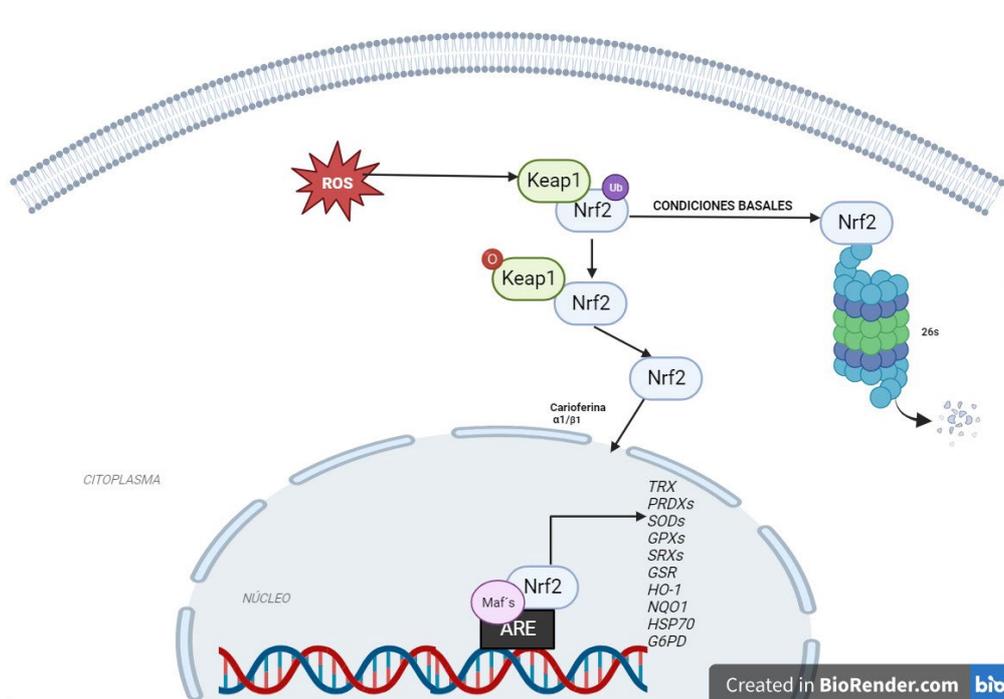
#### **2.4.1 NRF2/KEAP1 y melanoma.**

NRF2 (Factor nuclear eritroide similar al factor 2) es el principal factor de transcripción implicado en el equilibrio REDOX por medio de la inducción transcripcional de genes citoprotectores importantes.<sup>44</sup> NRF2 está compuesto de 7 dominios homólogos (Neh) y cada uno desempeñan funciones relevantes como la unión al ADN y a otros factores o proteínas que participan en la respuesta antioxidante. A su vez estos dominios cuentan con varios motivos involucrados en el acoplamiento a KEAP1, como DLG y ETGE.<sup>78</sup>

KEAP1 (proteína asociada a ECH similar a Kech) es un miembro de la familia de proteínas BTB-kelch y cuenta con 5 dominios: BTB, IVR, DGR, CTR y NTR. Estos son importantes en el acople y desacople de NRF2, así como en su degradación en el proteosoma.<sup>85</sup>

En condiciones basales, NRF2 se encuentra en el citosol vinculado a su inhibidor KEAP1 mediante la unión entre sus dominio Neh2, motivo DLG y ETGE y el dominio DGR correspondiente a KEAP1. Como se mencionó anteriormente, KEAP1 conduce a la inactivación de NRF2 a través de la ubiquitinación y la degradación proteasómica. La primera se da mediante el complejo ubiquitinador, conformado por CULLIN-3, RBX1, E2 y NEDD8, que se une al dominio BTB de KEAP1 para posteriormente ser transferido a NRF2 en su dominio Neh2 donde ubiquitina los 7 residuos de lisina presentes dentro de él.<sup>78, 86</sup> Posteriormente NRF2 ubiquitinado es conducido a su degradación en el proteosoma 26s mediante el complejo UBX7, P27, UFD1/NPL4.<sup>86</sup>

No obstante, bajo estrés oxidativo los residuos de cisteína presentes en el dominio IVR de KEAP1 se oxidan, por lo que sufre un cambio conformacional que libera a NRF2 y éste se transloca al núcleo.<sup>44,85</sup> La traslocación nuclear de NRF2 requiere de la fosforilación de S40 presente en el dominio Neh2 por PKC $\delta$  y S558, además de la fosforilación de NEH1 por AMPK y, la acetilación de K598/K591 y NEH3 por CBP.<sup>78, 85</sup> El transporte al núcleo de NRF2 es mediado por las carioferinas  $\alpha$ 1 y  $\beta$ 1 a través de complejos de poro nuclear (**Figura 4**).<sup>78</sup>



**Figura 4. Interacciones entre NRF2/KEAP1.** En condiciones basales NRF2 es ubiquitinado gracias a KEAP1 y, posteriormente degradado en el proteosoma 26s.<sup>86</sup> Bajo estímulo de las ROS, éstas promueven la oxidación de los residuos de cisteína en KEAP1, lo que evita la ubiquitinación de NRF2, dejándolo libre en el citosol para translocarse al núcleo donde forma heterodímeros con las proteínas MAF's y se unirá al elemento de respuesta antioxidante (ARE) en el ADN para promover la transcripción de genes que participan en la respuesta antioxidante.<sup>44</sup>  
 Diseño de la imagen: Mariana Elisa Ramírez Mitre mediante el software *Biorender.com*

En el núcleo NRF2 forma heterodímeros con pequeñas proteínas MAF (MAFF, MAFG y MAFK) por medio de su dominio Neh1 y, posteriormente se une a las secuencias del elemento de respuesta antioxidante (ARE) induciendo la actividad transcripcional de enzimas antioxidantes como SOD, PRDX, TXN, así

como a los genes involucrados en la síntesis de GSH, como la  $\gamma$ -glutamato-cisteína ligasa (GCL), y la GPX, que cataliza la oxidación de GSH.<sup>44, 78</sup>

Por otra parte, los antioxidantes no enzimáticos también desempeñan un papel fundamental en la neutralización de los radicales libres y los oxidantes dentro de las células, ya que modifican las ROS para formar especies menos reactivas. Éstos incluyen antioxidantes solubles en agua que están presentes en el citosol, como el ascorbato, y moléculas de bajo peso como la coenzima Q-10, el ácido lipoico y los antioxidantes liposolubles como los tocoferoles, los carotenoides, los flavonoides y los  $\omega$ -3, así como metales traza (Se y Zn) que se pueden suministrar externamente.<sup>35</sup>

En la última década se han realizado diversos estudios con el objetivo de tratar de explicar el rol que desempeña NRF2, así como algunas de las enzimas que este induce en su translocación (SOD1, SOD2, GPX1/2) en las diferentes etapas del melanoma. En 2014, Miura *et al.*, realizaron diversos ensayos en líneas celulares de MC con mutaciones en *KEAP1*. Sus resultados indicaron que presentaban una activación aberrante de NRF2 y por lo tanto un incremento en la resistencia a cisplatino y dacarbazina.<sup>76</sup>

En 2016 Hintsala *et al.*, realizaron otro estudio en muestras de 121 pacientes (23 nevos benignos, 13 nevos displásicos, 15 léntigos malignos, 28 melanomas nodulares, 20 melanomas de extensión superficial y 8 melanomas acrales) en el que demostraron por medio de inmunohistoquímica que NRF2 se encontraba expresado en el núcleo ante un aumento de la profundidad del índice de Breslow en las muestras de melanoma maligno, al contrario de las muestras de nevos benignos en la que los núcleos seguían siendo en su mayoría negativos.<sup>73</sup>

En 2017, Hintsala *et al.*, volvieron a realizar otro estudio en el que también compararon la expresión entre NRF2 y KEAP1, pero esta vez en muestras de melanomas cutáneos primarios y melanomas cutáneos metastásicos. La expresión nuclear de NRF2 fue más alta y KEAP1 citoplasmático más bajo en las lesiones metastásicas comparado con los tumores primarios. La expresión nuclear de NRF2 se asoció con la presencia de metástasis a distancia.<sup>74</sup>

En 2019, Hämäläinen *et al.*, demostraron que la inhibición de NRF2 con siRNA u otras estrategias genéticas o farmacológicas provoca una amplia gama de respuestas antitumorales en modelos experimentales de melanoma tanto *in vitro* como *in vivo*. La regulación a la baja de NRF2 inhibió la proliferación y la invasión de células de melanoma.<sup>75</sup>

Curiosamente, un estudio reciente que investigó los cambios en el proteoma del melanoma después de la modulación de NRF2 reveló que la inhibición de su expresión llevó a cambios en genes relacionados con la progresión del melanoma, incluido el marcador de células madre CD44.<sup>77,78</sup> Se planteó la hipótesis de que la reducción de la expresión de NRF2 podría contribuir al cambio de fenotipos exhibidos en melanomas en los que un estado proliferativo cambia a un estado invasivo o viceversa. A pesar de los niveles reducidos de expresión de NRF2 durante la progresión del melanoma, hay una expresión continua de los objetivos transcripcionales de NRF2.<sup>78</sup>

En contraste en 2016, Zhu y col. realizaron experimentos en un modelo *in vivo* de ratones (Nrf2-null) injertados con células de melanoma B16-F10), encontrando un incremento considerable de metástasis a pulmón.<sup>79</sup> Para explicar sus hallazgos, los autores sugirieron que el efecto podría relacionarse con una respuesta inmune anómala de este tipo de ratones, lo que pudo impactar en la progresión de la enfermedad.<sup>78</sup>

La ganancia funcional de NRF2 y las mutaciones que llevan a la pérdida de función de KEAP1 son frecuentes en los tumores y se correlacionan con la quimio/radioresistencia. Se han identificado mutaciones en *KEAP1* y *NRF2* en melanoma, aunque son poco frecuentes.<sup>78</sup> El balance REDOX es clave para la proliferación y la supervivencia tumoral. El factor de transcripción NRF2 es un determinante principal de este equilibrio, ya que puede inducir la transcripción de genes involucrados en la síntesis y regeneración de GSH.<sup>67</sup>

### **2.4.2 Enzimas antioxidantes y melanoma**

En 2018, Bisevac *et al.*, analizaron la expresión de diferentes enzimas antioxidantes en muestras de 72 pacientes diagnosticados con MC en diferentes

estadios (séptima edición American Joint Committee on Cancer). La actividad total de SOD fue significativamente alta solo en el grupo III (grosor 2.01-4.00mm).<sup>71</sup>

En 1993, Hirose *et al.*, identificaron que la sobreexpresión de MnSOD (SOD2) promovía la supervivencia de las células de melanoma expuestas a los efectos citostáticos y citotóxicos de IL-1, TNF, doxorubicina, mitomicina C y radiación ionizante.<sup>41,8</sup>

Otro estudio realizado por Suresh *et al.*, demostró que se favorecía la formación de colonias en presencia de concentraciones crecientes de doxorubicina en líneas celulares de melanoma cutáneo (A375) transfectadas con SOD2.<sup>81</sup> El papel controvertido de SOD2 y su papel como supresor o inductor tumoral permanece por clarificarse en los melanomas.<sup>41,47</sup> Además respecto a la expresión de SOD1 en melanoma existen muy pocos estudios al respecto.<sup>104</sup>

El GSH principalmente ha sido estudiado por su papel en la resistencia a la quimioterapia.<sup>83,84</sup> Previamente se ha reportado que el GSH y el ciclo de cistina/cisteína son sistemas antioxidantes cruciales en el estado REDOX del melanoma.<sup>83,84</sup> En un modelo de ratón endógeno de melanoma maligno, en el que se estudió el efecto de la N-acetil-cisteína sobre las células de melanoma se observó incremento en la migración celular, mayor metástasis linfática y aumento de los niveles intratumorales de GSH.<sup>69</sup>

La expresión GPX1 aumenta en el melanoma y se ha relacionado con incremento de la proliferación celular.<sup>48</sup> Carvalho *et al.*, reportaron en 2022, el incremento de GPX1 durante la fase de crecimiento vertical del melanoma, mientras que GPX3 disminuyó en los casos metastásicos.<sup>41</sup>

Otros moduladores importantes de ROS involucrados en las respuestas antioxidantes en el melanoma son el factor de transcripción KLF9 (kruppel-like 9), MITF (factor de transcripción asociado a la microftalmia), PGC1 $\alpha$  (coactivador 1 $\alpha$  del receptor Y activado por el proliferador de peroxisomas), FOXM1 (factor de transcripción forkhead box protein M1), PHD2 (proteína 2 del dominio prolin hidroxilasa), HIF (factor inducible por hipoxia), NFAT (factor nuclear de células T activadas) y CAT (catalasa).<sup>68</sup>

La enzima CAT fue estudiada por Bisevac *et al.*, en sangre venosa de pacientes con melanoma, encontrando una alta actividad de CAT en los pacientes con melanoma estadio III (grupo III; grosor 2.01 - 4 mm). Sin embargo, se expresó también en el estadio I (no más de 1.0 mm de espesor) y II (1.01 – 2 mm).<sup>71</sup> En un estudio realizado por Carvalho *et al.*, se mostró que la expresión de la CAT disminuye al pasar por la fase de crecimiento vertical y en el melanoma metastásico.<sup>41</sup>

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los melanomas mucosos orales son muy raros y agresivos, generalmente diagnosticados en etapas tardías y con pronóstico altamente desfavorable. Estas neoplasias representan aproximadamente el 0.03% de todos los diagnósticos de cáncer y menos del 1% de todos los melanomas malignos. Es una entidad que es conocida por su baja tasa de supervivencia a 5 años (25%).

Debido a su baja frecuencia, son escasos los datos que aporten información sobre su etiología y patogénesis. Además, el melanoma mucoso oral se encuentra asociado a una alta tasa de resistencia a las terapias existentes.

Conocer la patogénesis de esta entidad resulta importante para comprender su origen y comportamiento agresivo, además de que en un futuro beneficiaría un mejor abordaje clínico.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad se reconoce que la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) está involucrada en la regulación de las funciones celulares normales y que su descontrol puede ser responsable de la aparición de eventos dañinos. Las células tumorales ajustan su metabolismo para aumentar los niveles de ROS intracelular, mantenerse viables y en proliferación mediante diferentes mecanismos mediados por las ROS. Sin embargo, éstas tienen un doble papel en el desarrollo del cáncer: provocar alteraciones epigenéticas que promuevan la aceleración de la progresión tumoral o, los niveles más altos favorecer la inestabilidad del genoma induciendo la evasión de la muerte celular e inhibiendo la resistencia a los tratamientos. Esta plasticidad que las células tumorales tienen para promover o suprimir sus funciones en presencia de las ROS es un campo de estudio prometedor.

El melanoma mucoso oral debido a su baja incidencia es una entidad de la que se conoce poco la patogénesis. En los últimos años se han realizado algunos estudios en melanoma cutáneo para comprender el papel del balance REDOX en la promoción, progresión y metástasis. Se ha observado que dependiendo de la etapa en la que se encuentre la enfermedad, las células de melanoma son capaces de ajustar su metabolismo para resistir a los cambios del microambiente tumoral durante las diferentes etapas de la enfermedad al incrementar la producción de enzimas antioxidantes que les permitan limitar el estrés oxidativo e incluso, incrementar la resistencia a las terapias.

Este trabajo plantea la identificación de marcadores enzimáticos antioxidantes en muestras de melanoma mucoso oral, así como discutir el papel que desempeñan los sistemas antioxidantes en su patogénesis.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 General.**

Identificar la expresión de marcadores enzimáticos de estrés oxidativo en casos de melanoma mucoso oral primario.

### **5.2 Específicos.**

- Determinar mediante inmunohistoquímica<sup>49</sup> el patrón de expresión de los marcadores enzimáticos SOD1, SOD2, CAT, y GPX1/2 en muestras de melanoma mucoso oral primario.
- Comparar el patrón de expresión de los marcadores enzimáticos SOD1, SOD2, CAT, y GPX1/2 del melanoma mucoso oral primario y melanoma cutáneo.

## **6. HIPÓTESIS.**

El melanoma mucoso oral primario expresa los marcadores enzimáticos SOD1, SOD2, CAT y GPX1/2.

## **7. MATERIALES Y MÉTODO**

### **7.1 Materiales**

#### **1. Muestras.**

Las muestras corresponden a cortes histológicos de 3µm procedentes de cinco bloques incluidos en parafina diagnosticados como melanomas primarios de mucosa oral humana de paladar duro (2 casos) y encía (3 casos) procedentes de consulta privada. Los casos fueron revisados y, confirmado el diagnóstico por dos patólogos experimentados (Dr. Adalberto Mosqueda Taylor de la UAM-Xochimilco y el Dr. Marco Antonio Durán Padilla del Hospital General de México). Además de 5 cortes histológicos de melanoma lentiginoso acral obtenidos de práctica privada.

Como control sano se utilizaron muestras de mucosa oral humana del banco de muestras del Laboratorio de Inmunología, DEPeI, Facultad de Odontología. De estas muestras se obtuvieron cortes histológicos de 3µm a los

cuales se les realizó el mismo procedimiento inmunohistoquímico que a los casos de melanoma mucoso oral primario (MMOP) y melanoma lentiginoso acral descrito a continuación.

## 7.2 Método

### 7.3 Técnica de inmunohistoquímica.

El protocolo ha sido descrito previamente<sup>49</sup> y se resume a continuación:

- Procesamiento histoquímico mediante baños seriados de xilol y alcohol.
- Recuperación de antígenos mediante buffer de citratos 0.1M, pH 6.
- Bloqueo de la peroxidasa endógena (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%).
- Lavado en Tritón al 0.2%.
- Incubación en albúmina bovina al 2%.
- Incubación del anticuerpo primario (monoclonales anti-mouse).

Antígeno	Dilución	Producto y fuente
SOD1	1:150	SOD-1 (B-1). sc-271014, SC Biotechnology, Inc.
SOD2	1:250	SOD-2 (B-1). sc-133254, SC Biotechnology, Inc.
GPX1/2	1:200	GPx-1/2 (E-7). sc-74498, SC Biotechnology, Inc.
CAT	1:200	CAT (H-9): sc-271803, SC Biotechnology, Inc.

- Incubación del anticuerpo secundario (sistema MultiLink DAKO) por 1 hora.
- Revelado con diaminobencidina (DAB), DAKO.
- Contraste de núcleos con hematoxilina.
- Deshidratación de los cortes mediante baños seriados en alcohol y xilol.
- Montaje con resina epóxica.

EQUIPO	MATERIAL	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Microscopio de luz AmScope.</li> <li>● Micropipetas de diversos calibres.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Portaobjetos.</li> <li>● Cubreobjetos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Alcohol 100%.</li> <li>● Alcohol 96%.</li> <li>● Xilol.</li> <li>● PBS.</li> </ul>

<ul style="list-style-type: none"> <li>● Microondas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Puntos de micropipetas de distintos volúmenes.</li> <li>● Tubos Eppendorf de 0.5ml y 1.5ml.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● BSA, Sigma.</li> <li>● Tritón X-100, Sigma.</li> <li>● Anticuerpos: SOD1, SOD2, Catalasa, GSH, GPX1/2, Santa Cruz Biothecnology.</li> <li>● Sistema MultiLink DAKO.</li> <li>● DAB, DAKO.</li> <li>● Hematoxilina de Gill.</li> </ul>
---	---	--

### 7.2.2 Variables.

Tipo de muestra	Melanoma cutáneo/Melanoma oral
Inmunomarcaje	Leve (+), moderado (++) , intenso (+++)

### 7.2.3 Financiamiento.

El presente estudio se realizó con recursos del proyecto UNAM DGAPA-PAPIIT 223720 para la adquisición de los anticuerpos primarios. La alumna Mariana Elisa Ramírez Mitre es becaria del proyecto DGAPA-PAPIIT 223720 (folio de beca 322821).

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La expresión de enzimas antioxidantes como las superóxido dismutasas 1 y 2 (SOD1 y SOD2), catalasa (CAT) y Glutación peroxidasa 1 y 2 (GPX1/2), además del factor transcriptional NRF2 han sido evaluadas previamente en melanomas cutáneos (MC).<sup>41,48,71-81</sup> De la revisión exhaustiva de la literatura disponible, concluimos que no existen estudios previos acerca de los mecanismos antioxidantes en melanoma mucoso oral primario (MMOP).

### **El melanoma mucoso oral presenta inmunoexpresión positiva a SOD1, SOD2, GPX1/2y CAT: el papel de las especies reactivas del oxígeno (ROS).**

En el presente estudio se logró identificar la expresión positiva de SOD1, SOD2, GPX1/2y CAT en muestras de melanoma mucoso oral primario (MMOP). Sin embargo, no se expresaron con la misma intensidad en todos los casos (**Anexo. Figura 5**). Destaca el resultado negativo de los marcadores SOD1, SOD2 y CAT en el MMOP subtipo amelanótico, el cual solo fue positivo para las enzimas GPX1/2 (**Anexo. Figura 5.E5**)

El análisis inmunohistoquímico de SOD1 y SOD2 en los MMOP se presentó de la siguiente manera.

SOD1 mostró inmunoreactividad leve (2 casos) (**Anexo. Figura 5.B2, 5.D2**) y moderada (2 casos) (**Anexo. Figura 5.A2, 5.C2.**). En el caso del MMOP amelanótico fue negativo a SOD1 y SOD2 (**Anexo. Figura 5.E2 y 5.E3**). La expresión de SOD2 fue moderada (3 casos) (**Anexo. Figura 5.B3, 5.C3, 5.D3**) y leve (1 caso) (**Anexo. Figura 5.A3**).

Respecto a la enzima CAT, se encontró inmunoreactividad moderada en cuatrocasos de MMOP (**Anexo. Figura 5.A6, 5.B6, 5.C6, 5.D6.**), mientras que el caso correspondiente al MMOP amelanótico fue negativo (**Anexo. Figura 5.E6**).

A diferencia de las enzimas descritas, se encontró que todos los casos de MMOP (incluyendo el amelanótico) fueron altamente positivos a la

enzima GPX1/2 (**Anexo. Figura 5.A5, 5.B5, 5.C5, 5.D5, 5.E5**). De esta manera y considerando todos los marcadores analizados, parece que las enzimas antioxidantes tienen participación en la patogénesis de los MMOP.

En el **Anexo. Figura 8** podemos observar que la expresión de las enzimas SOD1, SOD2, CAT y GPX1/2 en MMOP está relacionada con la producción de melanina<sup>7,29,41,44,99,101,102,120,121,122</sup>. La síntesis de melanina es un proceso que requiere un alto consumo de oxígeno y están implicadas una serie de reacciones de oxidación que dan como resultado la formación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>94</sup> Así, las células de melanoma también cuentan con diferentes fuentes generadoras de ROS, como la cadena transportadora de electrones en los complejos I y III de la mitocondria, la familia de enzimas NADPH oxidasas (NOX), las óxido nítricosintasas (NOS), los peroxisomas, así como los melanosomas.<sup>93</sup>

Las células neoplásicas utilizan las ROS para promover la carcinogénesis<sup>95</sup> y, la melanogénesis por sí misma favorece un ambiente pro-oxidante y un microambiente mutagénico idóneo para que ésto ocurra.<sup>120,121,122</sup> Las ROS tienen una amplia participación como inductoras de factores transcripcionales relacionados con la proliferación, angiogénesis, metástasis y control de la producción de enzimas antioxidantes, como HIF-1<sup>94</sup>, NFκB<sup>98</sup>, p53,<sup>99</sup> y NRF2<sup>44</sup> (**Anexo. Figura 8**).

Asimismo, las ROS son capaces de provocar la reducción catalítica de PTEN (proteína fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato 3 fosfatasa), supresor tumoral implicado en la regulación de AKT mediante la vía de PI3K<sup>102</sup> (**Anexo. Figura 8**). Esta vía también se encuentra alterada en el MMO debido al receptor KIT mutado.<sup>100</sup>

Por el efecto positivo de las ROS en la progresión tumoral, es de suponer que las células de melanoma procuren mantener un equilibrio entre la producción de ROS y sus mecanismos antioxidantes. La excesiva producción de ROS podría activar diferentes vías de muerte celular como la apoptosis, autofagia, necrosis y ferroptosis.<sup>41</sup> Sin embargo, los factores transcripcionales NRF2 y SP-1 tienen un papel esencial al favorecer

la expresión de las enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, GPX1/2 y CAT (**Anexo. Figura 8**).

### **El melanoma mucoso oral primario amelanótico es inmunopositivo únicamente a las enzimas antioxidantes GPX1/2.**

El caso del melanoma mucoso oral primario (MMOP) amelanótico llamó particularmente nuestra atención, porque a diferencia de los MMOP pigmentados, solo fue positivo a la enzima GPX1/2 (**Anexo. Figura 5.E5**). Esta entidad es aún más rara que su contraparte pigmentada<sup>123</sup>, ya que además de la ausencia de melanina, presenta mayor grado de atipia celular y, elevada tasa de proliferación.<sup>105,106</sup> Por lo observado, podríamos sugerir que la ausencia de melanina en el MMOP amelanótico representa una menor carga de producción de ROS propia de la melanogénesis, y que la expresión de las enzimas GPX1/2 podría estar más relacionada con el mantenimiento de su viabilidad celular.<sup>41,48,71-81</sup> Se ha identificado que los casos de melanoma amelanótico son más frecuentes en mucosa bucal que en piel.<sup>133</sup>

### **Inmunoexpresión de los marcadores enzimáticos SOD1, SOD2, GPX1/2y CAT en melanoma lentiginoso acral: diferencias y similitudes con el melanoma mucoso oral primario (MMOP).**

Respecto a los casos de melanoma lentiginoso acral (MLA) (**Anexo. Figura 6**) utilizados en nuestro estudio para comparar la expresión de las enzimas antioxidantes, encontramos que fueron positivos a todas las enzimas antioxidantes (SOD1, SOD2, Gpx1/2 y CAT). La inmunoreactividad para la enzima SOD1 fue leve en todos los casos (**Anexo. Figura 6.A2, 6.B2, 6.C2, 6.D2**). La enzima SOD2 fue moderada (3 casos) (**Anexo. Figura 6.A3, 6.B3, 6.C3**) y, leve (un caso) (**Anexo. Figura 6.D3**). La enzima CAT fue moderada (3 casos) (**Anexo. Figura 6.A6, 6.B6, 6.C6**) y, leve (1 caso). (**Anexo. Figura 6.D6**). Sin embargo, a diferencia del MMOP que tuvo un inmunomarcaje intenso para GPX1/2 en

todos los casos, en los MLA fue intensa (2 casos) (**Anexo. Figura 6.A5, 6.B5**) y moderada (2 casos) (**Anexo. Figura 6.C5, 6.D5**).

Aunque el MMOP y el MLA comparten un mismo linaje celular, la inmunoexpresión diferente de las enzimas GPX1/2 podría estar relacionada al microambiente tumoral en el que ambas entidades se desarrollan. Ésto se hace notar por la inmunoexpresión intensa de la GPX1/2 encontrada en el MMOP amelanótico de nuestro estudio.

Las funciones de los melanocitos dentro de la mucosa oral no han sido del todo clarificadas.<sup>52</sup> Se estima que en la cavidad oral existen más de 700 especies de microorganismos, algunas de ellas relacionadas con el desarrollo y progresión de diversas enfermedades.<sup>124</sup> Por ejemplo, en enfermedades cardiovasculares como aterosclerosis<sup>125</sup>, miocarditis<sup>126</sup> y artritis reumatoide.<sup>127</sup>

Particularmente, se ha identificado el potencial carcinogénico de algunas bacterias como *Porphyromona gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*.<sup>108</sup> Asimismo, estas dos bacterias han sido relacionadas con diversos tipos de cáncer, especialmente del tracto digestivo (oral, esófago, páncreas, colon y recto).<sup>124</sup> Teniendo en cuenta lo anterior, la participación de la microbiota oral podría tener también participación en la carcinogénesis de MMO.

El MLA es una entidad que se desarrolla en la piel glabra (palmas de pies, manos y lechos ungueales) de etiología desconocida, aunque se ha relacionado con el trauma físico. Entre las mutaciones más frecuentes en el MLA se encuentran las asociadas a *KIT*, *CCND1* y *CDK4*.<sup>107</sup> La piel glabra exhibe diferencias notables en comparación con la piel de otras zonas corporales, ya que no cuenta con folículos pilosos y glándulas sebáceas, además posee un estrato córneo compacto y grueso.<sup>107</sup> Las características histológicas de la mucosa oral varían dependiendo de la zona, pero a diferencia de la piel glabra, se puede destacar que la mucosa oral no cuenta con un estrato lúcido y su estrato córneo no llega a ser tan grueso.<sup>109</sup> El estrato lúcido y córneo cumplen una función de protección extra a estas

zonas, generando una piel más gruesa y resistente a la constante fricción y presión a la que es sometida.<sup>128</sup>

Las diferencias intrínsecas de la piel y la mucosa oral se relacionan con la función especializada que tienen, y dependen ampliamente de los factores ambientales a los que están expuestas. Por ejemplo, la superficie de la piel glabra debe soportar cambios de temperatura y humedad, mientras que la mucosa oral es un entorno continuamente cálido y húmedo, lo que constituye un excelente hábitat para diversos microorganismos. Por otra parte, la mucosa oral tiene que soportar el estrés mecánico propio de la masticación, el habla y la deglución, además de los cambios químicos generados por la alimentación, el consumo de alcohol, tabaco y drogas diversas, adicional a la exposición continua a antígenos extraños.<sup>109</sup> Todos estos factores debieran ser promotores de entornos altamente estresantes y generadores de grandes cantidades de radicales libres. Sin embargo, a diferencia de las muestras de MMOP y MLA que fueron positivas a todas las enzimas antioxidantes analizadas, las muestras de mucosa oral fueron negativas (**Anexo. Figura 7.D1**). Destaca solo un caso de las muestras de mucosas orales estudiadas, que fue positiva a GPX1/2, lo mismo que en los casos del MMOP pigmentado, MMOP amelanótico y MLA.

### **Macrófagos y células endoteliales son positivos a las enzimas GPX1/2 en melanoma mucoso oral y mucosa oral inflamada.**

Las muestras de mucosa oral analizadas fueron negativas a los marcadores enzimáticos SOD1, SOD2, GPX1/2 y CAT, excepto una muestra con componente inflamatorio asociado (**Anexo. Figura 7.D1, 7.D5**). Las células positivas en este caso fueron macrófagos, células endoteliales y conductos salivales (**Anexo. Figura 7.D5**). Los macrófagos y células endoteliales asociados al entorno tumoral de los casos de MMOP y MLA también fueron positivos a GPX1/2 (**Anexo. Figura 5 y figura 6**).

Los macrófagos cuentan con una maquinaria especializada para destruir a los agentes patógenos, destacando la generación de radicales libres durante los procesos inflamatorios.<sup>111</sup> Si los niveles de ROS rebasan

los límites, estas células podrían morir mediante diferentes vías.<sup>129</sup> No obstante, los macrófagos evitarán el daño causado por el estrés oxidativo mediante mecanismos antioxidantes que incluyen la producción de GPX1/2. Durante el proceso inflamatorio se encuentra expresado intensamente el transcrito de GPX1, lo que favorece la cicatrización.<sup>112</sup>

Los macrófagos son esenciales para la protección contra patógenos, así como para la regulación de la homeostasis. En el proceso inflamatorio pueden promover la angiogénesis y la cicatrización.<sup>130</sup> Debido a que secretan una gran cantidad de citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, pueden activar distintos tipos celulares.<sup>111</sup> La versatilidad de los macrófagos les permite modificar su fenotipo productor de citocinas hacia uno de tipo M1 o M2. Esto es altamente importante porque los macrófagos M2 muestran un perfil anti-inflamatorio que protege del daño generado por procesos inflamatorios prolongados, induciendo la reparación y/o la remodelación de los tejidos.<sup>130</sup> Mientras tanto, los macrófagos M1 están implicados en el mantenimiento de la inflamación y el daño tisular, por lo que se consideran pro-inflamatorios.<sup>111</sup>

La inducción y el mantenimiento de la polarización a macrófagos tipo M1 están relacionados con las ROS, ya que favorecen la producción de interleucinas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF.<sup>111</sup> Algunos estudios destacan la participación de las ROS en la activación de las vías de señalización de NFκB y p38 MAPK, capaces de promover el fenotipo M1.<sup>131</sup> La generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tras la estimulación del TLR4 puede activar a las enzimas NOX, SOD y GPX1/2.<sup>113</sup>

Se ha descrito que en el micro ambiente tumoral (MAT), la inflamación crónica es clave en la carcinogénesis. El macrófago M1 es importante en el MAT por la producción de citocinas pro-inflamatorias.<sup>132</sup> Los casos de MMOP y MLA analizados en nuestro estudio, presentaron macrófagos y células endoteliales positivos a GPX1/2. Esto no parece extraño si consideramos que las células del MAT interactúan constantemente con las células neoplásicas creando un ambiente idóneo para el libre desarrollo de éstas<sup>110,114</sup>, y el caso de los melanomas no debe ser la excepción.

La expresión positiva de GPX1/2 en las células endoteliales de nuestro estudio podría deberse al estrés generado por las fuerzas de cizallamiento durante el proceso inflamatorio. Dicho fenómeno es importante para la trans migración endotelial y, de otros tipos celulares para el establecimiento del MAT.<sup>115</sup> El estrés de cizallamiento estimula la producción de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), lo que resulta en la sobreproducción de óxido nítrico (potente vasodilatador) y, altas cantidades de O<sub>2</sub><sup>-</sup>.<sup>116,117</sup> Esto último resulta en la sobrerregulación de SOD endotelial para convertir al O<sub>2</sub><sup>-</sup> en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>118</sup> En estas condiciones, la actividad de la GPx1 es crucial para evitar el daño excesivo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>118</sup>

## **9. Conclusiones**

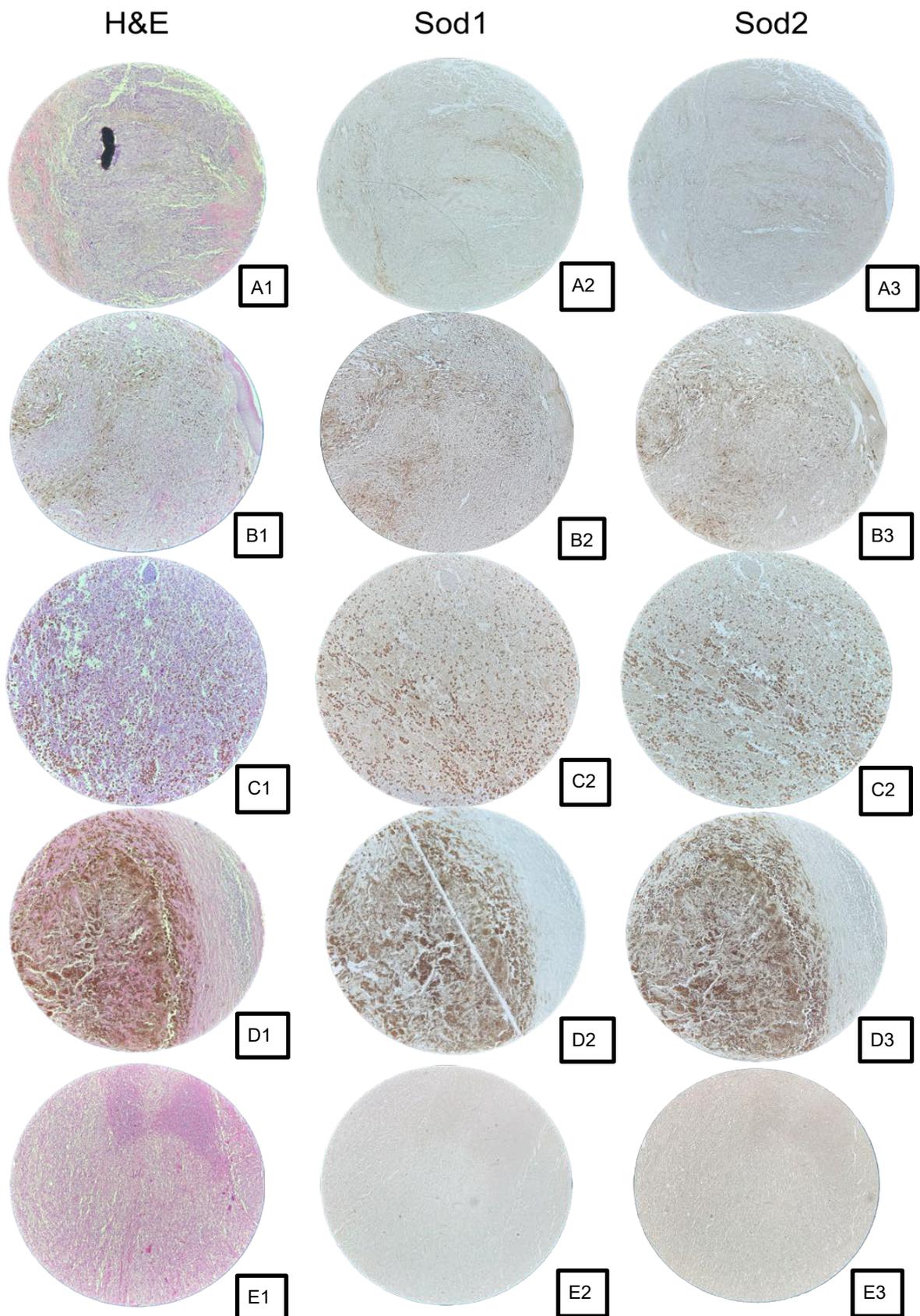
Las enzimas antioxidantes SOD1, SOD2, GPX1/2 y CAT se encuentran sobrepresadas en el melanoma mucoso oral primario. Hasta nuestro conocimiento, este estudio es el primero en analizar la expresión de enzimas antioxidantes. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos sugerir que al igual que en otros tipos de neoplasias malignas, las enzimas antioxidantes desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento del estado REDOX en el melanoma mucoso oral primario.

Para clarificar la participación de los mecanismos antioxidantes, será necesario realizar estudios que incluyan una mayor casuística y, se apoye de técnicas de biología molecular que permitan identificar otras moléculas clave en la regulación de las señales antioxidantes.

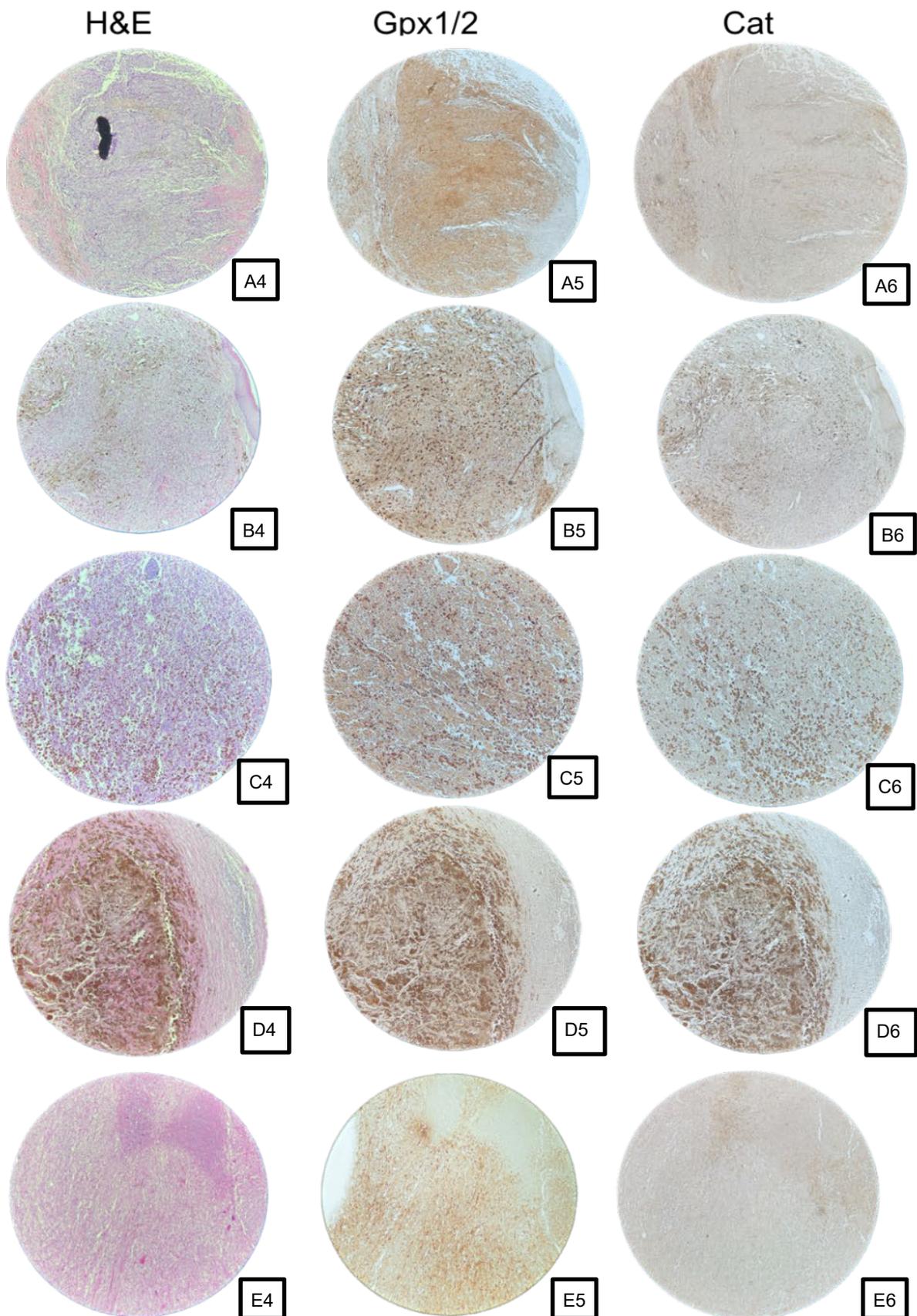
## 10. ANEXOS

Diagnóstico	Inmunomarcaje*			
	SOD1	SOD2	GPX1/2	CAT
<i>Melanoma mucoso oral</i>	++	+	+++	++
	+	++	+++	++
	++	++	+++	++
	+	++	+++	++
	-	-	+++	-
<i>Melanoma lentiginoso acral</i>	+	++	+++	++
	+	++	+++	++
	+	++	++	++
	+	+	++	+
<i>Mucosa oral</i>	-	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	-	-
	-	-	++	-

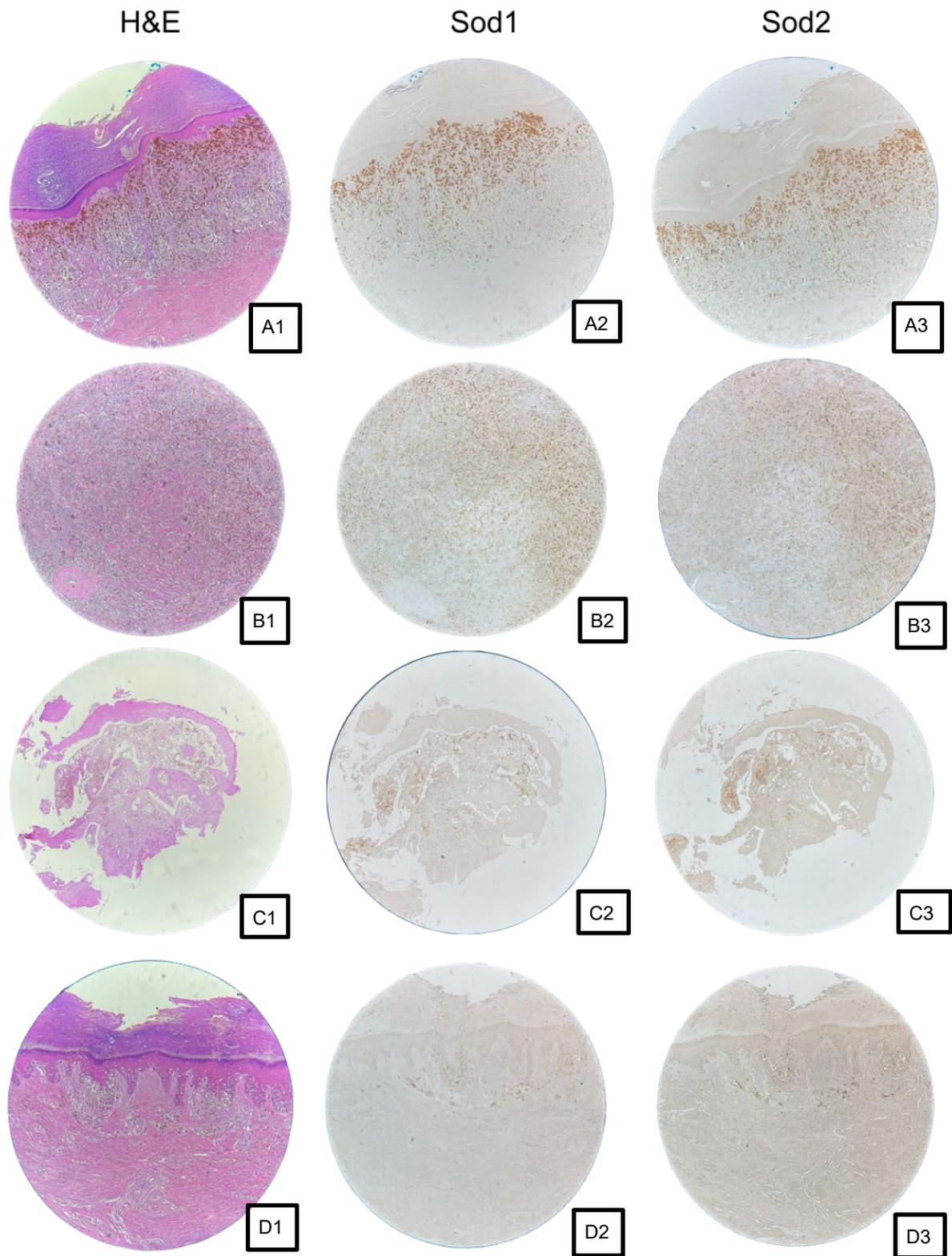
\*Inmunorreactividad: Negativa: -, Leve: +, Moderada: ++, Intensa: +++



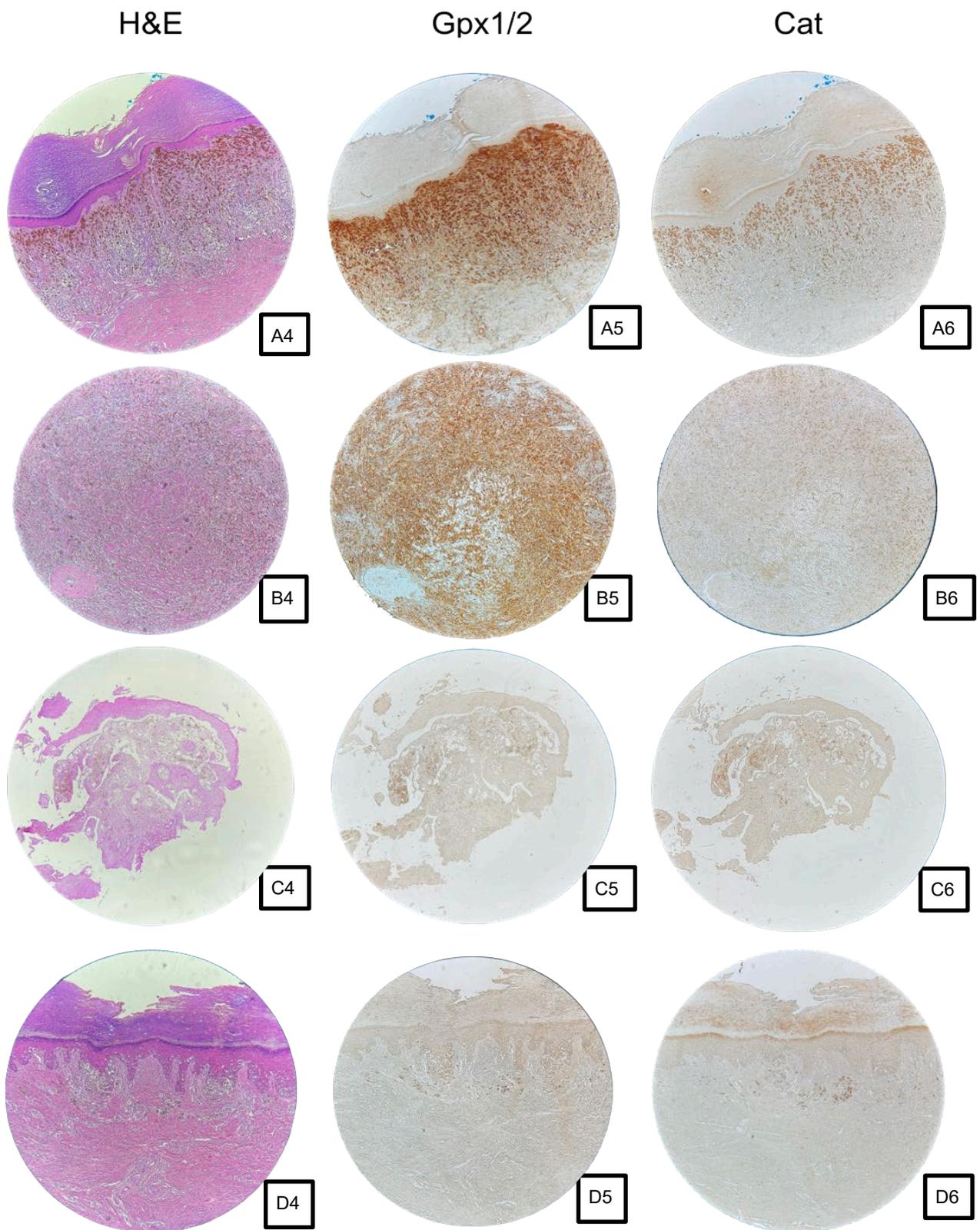
**Figura 5. Melanomas mucosos orales. H&E:** **A1.** Melanoma pigmentado, epiteloide y fusocelular con patrón sólido. **B1.** Melanoma pigmentado, fusocelular y epiteloide sólido. **C1.** Melanoma pigmentado, fusocelular y epiteloide con células gigantes e inflamación crónica. **D1.** Melanoma pigmentado, nodular, fusocelular, con patrón cicatrizal e inflamación crónica. **E1.** Melanoma fusocelular amelanótico con patrón sólido de tipo nodular. **Anti-SOD1:** **A2, B2, C2, D2.** Positividad citoplasmática en células tumorales. **Anti-SOD2 (A3, B3, C3, D3).** Positividad citoplasmática en células tumorales. **Anti-SOD1 y Anti-SOD2 (E2,E3):** Inmunomarcaje negativo. Magnitud: 10x.



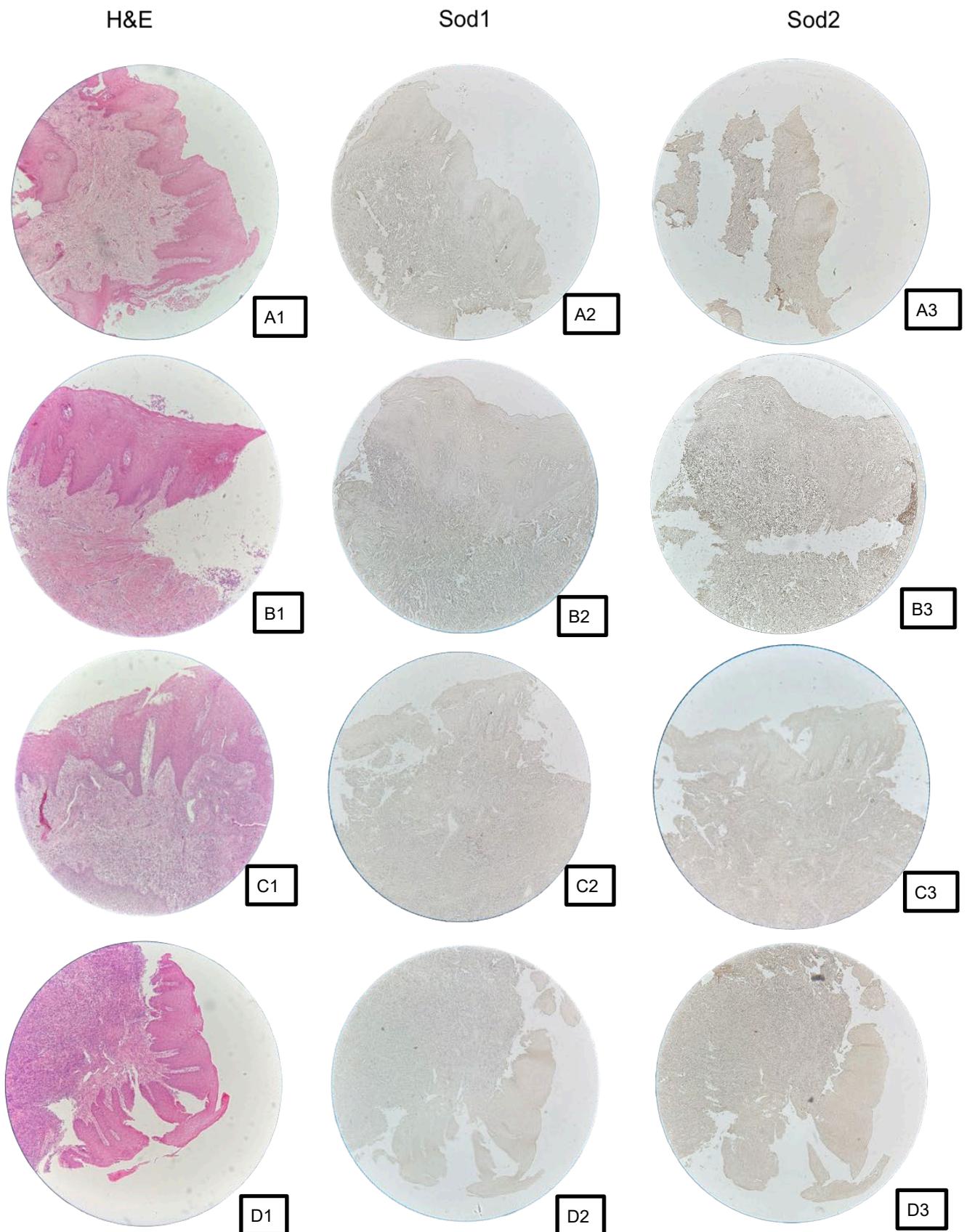
**Continuación Fig. 5. Melanomas mucosos orales. H&E:** **A4.** Melanoma pigmentado, epiteloide y fusocelular con patrón sólido. **B4.** Melanoma pigmentado, fusocelular y epiteloide sólido. **C4.** Melanoma pigmentado, fusocelular y epiteloide con células gigantes e inflamación crónica; **D4.** Melanoma pigmentado, nodular, fusocelular con patrón cicatrizal e inflamación crónica. **E4.** Melanoma fusocelular amelanótico con patrón sólido de tipo nodular. **Anti-Gpx1/2:** **A5, B5, C5, D5, E5.** Positividad citoplasmática en células tumorales. **Anti-CAT:** **A6, B6, C6, D6.** Positividad citoplasmática en células tumorales. **Anti-CAT:** **E6.** Inmunomarcaje negativo. Magnitud 10x.



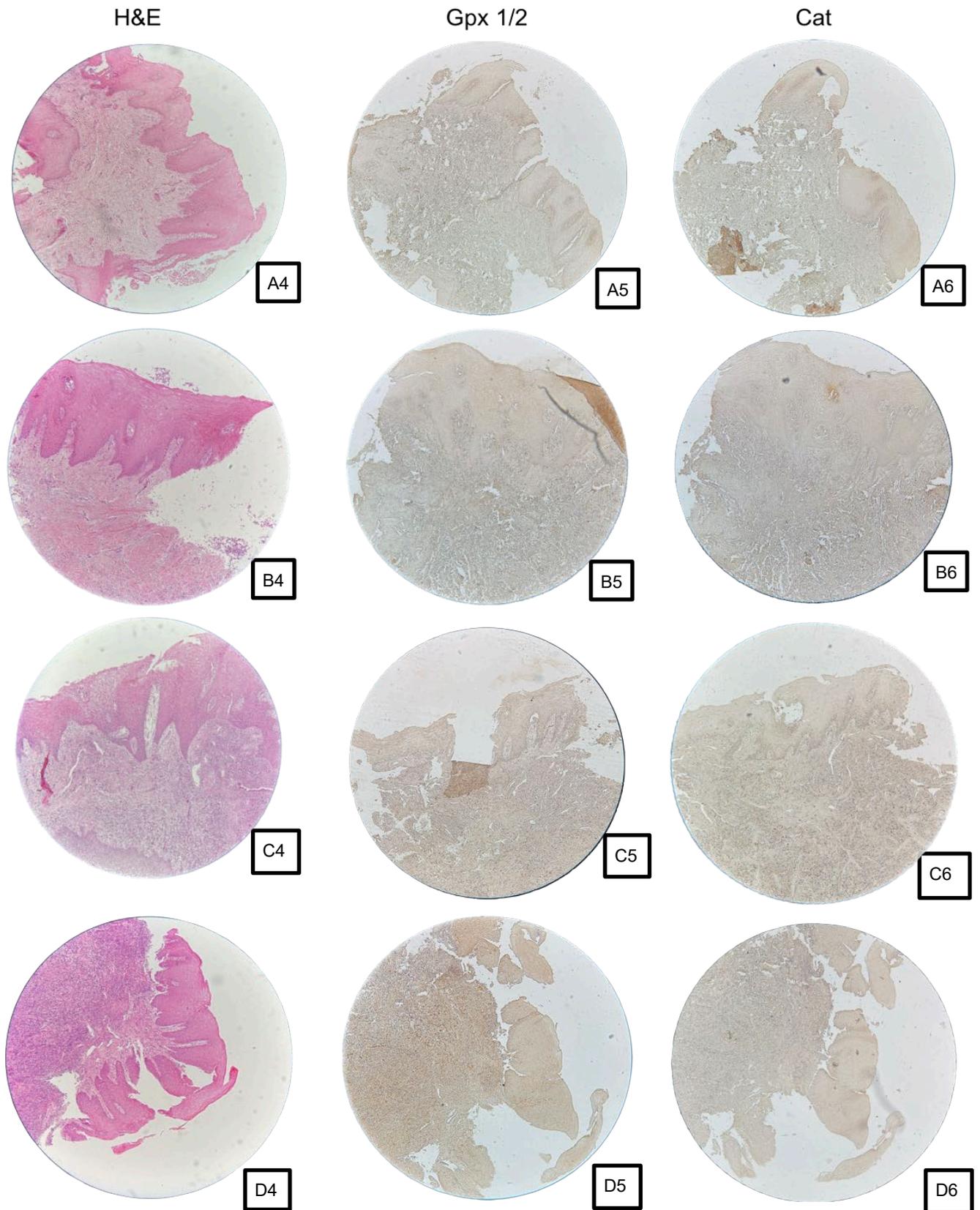
**Figura 6. Melanomas lentiginosos acrales.** *H&E*: **A1**. Melanoma pigmentado, fusocelular y epitelioide, acompañado de abundante infiltrado inflamatorio. **B1**. Melanoma pigmentado, fusocelular con invasión perivasculare y perineural. **C1**. Melanoma pigmentado, epitelioide; **D1**. Melanoma pigmentado, fusocelular y epitelioide. *Anti-SOD1*: **A2**, **B2**, **C2**, **D2**. Positividad citoplasmática en células tumorales. *Anti-SOD2*: **A3**, **B3**, **C3**, **D3**. Positividad citoplasmática en células tumorales.



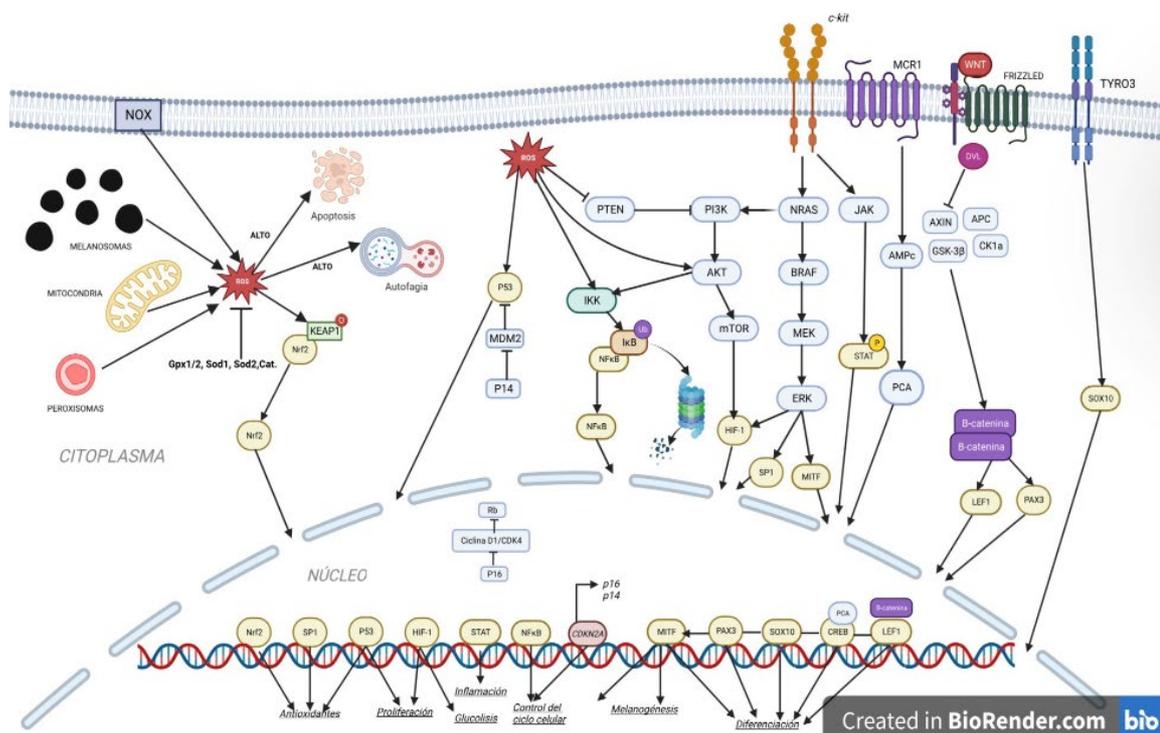
**Continuación Figura 6. Melanomas lentiginosos acrales. H&E: A4.** Melanoma pigmentado, fusocelular y epiteliode, acompañado de abundante infiltrado inflamatorio. **B4.** Melanoma pigmentado, fusocelular con invasión perivascular y perineural. **C4.** Melanoma pigmentado, epiteliode. **D4.** Melanoma pigmentado, fusocelular y epiteliode. **Anti-Gpx1/2: A5, B5, C5, D5.** Positividad citoplasmática en células tumorales. **Anti-CAT: A6, B6, C6, D6.** Positividad citoplasmática en células tumorales.



**Figura 7. Mucosas orales. H&E:** **A1.** Mucosa oral (MO) compuesta de epitelio escamoso no queratinizado, soportado por tejido conjuntivo fibroso maduro, con presencia de hiperplasia basal y ligera pigmentación melánica. **B1.** MO compuesta de epitelio escamoso estratificado no queratinizado, soportado por tejido conjuntivo fibroso maduro y con escaso infiltrado inflamatorio. **C1.** MO compuesta de epitelio escamoso estratificado no queratinizado, soportado por tejido conectivo fibroso, con infiltrado crónico. **D1.** MO compuesta de epitelio escamoso estratificado no queratinizado, soportado por tejido conjuntivo fibroso maduro, con abundante infiltrado crónico linfoplasmocitario. Epitelio ligeramente hiperplásico. **Anti-SOD1:** **A2, B2, C2, D2.** Inmunomarcaje negativo. **Anti-SOD2:** **A3, B3, C3, D3.** Inmunomarcaje negativo.



**Figura 7. Mucosas orales. H&E: A4.** Mucosa oral (MO) compuesta de epitelio escamoso no queratinizado, soportado por tejido conjuntivo fibroso maduro, con presencia de hiperplasia basal y ligera pigmentación melánica. **B4.** MO compuesta de epitelio escamoso estratificado no queratinizado, soportado por tejido conjuntivo fibroso maduro y con escaso infiltrado inflamatorio. **C4.** MO compuesta de epitelio escamoso estratificado no queratinizado, soportado por tejido conectivo fibroso con infiltrado crónico. **D4.** MO compuesta de epitelio escamoso estratificado no queratinizado, soportado por tejido conjuntivo fibroso maduro con abundante infiltrado crónico linfoplasmocitario. Epitelio ligeramente hiperplásico. **Anti-GPX1/2: A5, B5, C5.** Inmunomarcaje negativo. **D5.** Inmunomarcaje positivo en macrófagos y células endoteliales. **Anti-CAT: A6, B6, C6, D6.** Inmunomarcaje negativo.



**Figura 8. El melanoma es una neoplasia controlada por las especies reactivas del oxígeno (ROS).** En el melanoma las ROS pueden ser generadas en la mitocondria, NOX's, peroxisomas, y en los melanosomas.<sup>121,122</sup> A bajas cantidades las ROS son capaces de inducir la actividad de proteínas como IKK, P53, además provocar modificaciones en otras como KEAP1 y PTEN.<sup>44,102</sup> La modificación en KEAP1 induce la traslocación de NRF2, mientras que las ROS cuando actúan sobre PTEN provocan la activación de la vía AKT. Sin embargo las ROS a altas proporciones pueden provocar muerte celular.<sup>41</sup> Debido a esto, la célula tendrá que activar mecanismos antioxidantes como la producción de enzimas mediadas por NRF2, Sp1 y p53.<sup>99, 44</sup> En el MMO primario humano se han identificado mutaciones en *c-KIT*, así como en *CDK4* y en menor medida en *BRAF*<sup>101</sup>. Estas mutaciones implican la activación incontrolada de las vías de señalización PI3K, JAK/STAT, y RAS-RAF-MAPK<sup>52</sup> induciendo a la translocación de diversos factores de transcripción como MTF, STAT, HIF1, NFκB y SP1, importantes para el proceso carcinogénico.<sup>7,94,98</sup> Además la adquisición de mutaciones en *CDK4* implicará una progresión en el ciclo celular.<sup>29</sup> Diseño de la figura: Mariana Elisa Ramírez Mitre mediante el software *Biorender.com*

## 11. REFERENCIAS

1. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of Melanoma. *Med. Sci.* 2021; 9(4): 1-9. <https://doi.org/10.3390/medsci9040063>
2. Hernández-Rodríguez DA, Aldaco-Sarvide F, Cervantes-Sánchez G, Erazo-Valle-Solís A, Pérez-Pérez P, Torrecillas-Torres L, Cortés-Esteban P, Juárez-Ramiro A, Díaz-Alvarado G. La mortalidad por melanoma en Mexico aumenta. *Rev Esp Méd Quir.* 2018;23(3):123-129.
3. Olla D, Neumeister MW. Mucosal melanoma. *Clin Plast Surg.* 2021; 48(4): 707-711. doi: 10.1016/j.cps.2021.05.010.
4. Yde SS, Sjoegren P, Heje M, Stolle LB. Mucosal melanoma: a literature review. *Curr Oncol Rep.* 2018; 20(3): 28. doi: 10.1007/s11912-018-0675-0.
5. Aggarwal V, Tuli HS, Varol A, Thakral F, Yerer MB, Sak K, Varol M, Jain A, Khan MA, Sethi G. Role of reactive oxygen species in cancer progression: Molecular mechanisms and recent advancements. *Biomolecules.* 2019; 9(11): 735. doi: 10.3390/biom9110735.
6. Davis LE, Shalin SC, Tackett AJ. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther.* 2019; 20(11): 1366-1379. doi: 10.1080/15384047.2019.1640032.
7. D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016; 17(7): 1144. doi: 10.3390/ijms17071144.
8. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 2007; 445(7130): 843-50. doi: 10.1038/nature05660.
9. Pingault V, Zerad L, Bertani-Torres W, Bondurand N. SOX10: 20 years of phenotypic plurality and current understanding of its developmental function. *J Med Genet.* 2022; 59(2): 105-114. doi: 10.1136/jmedgenet-2021-108105.
10. Boudjadi S, Chatterjee B, Sun W, Vemu P, Barr FG. The expression and function of PAX3 in development and disease. *Gene.* 2018; 666: 145-157. doi: 10.1016/j.gene.2018.04.087.

11. Rabbie R, Ferguson P, Molina-Aguilar C, Adams DJ, Robles-Espinoza CD. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *J Pathol.* 2019; 247(5): 539-551. doi: 10.1002/path.5213.
12. Hicks MJ, Flaitz CM. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. *Oral Oncol.* 2000; 36(2): 152-69. doi: 10.1016/s1368-8375(99)00085-8.
13. Barker BF, Carpenter WM, Daniels TE, Kahn MA, Leider AS, Lozada-Nur F, et al. Oral mucosal melanomas. Oral mucosal melanomas: the WESTOP Banff workshop proceedings. *Western Society of Teachers of Oral Pathology. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997; 83(6): 672-9. doi: 10.1016/s1079-2104(97)90318-8.
14. Delgado-Azañero WA, Mosqueda-Taylor A. Un método práctico para el diagnóstico clínico de melanomas de la mucosa oral. *Med Oral.* 2003;8:348-52.
15. Kappes UP, Luo D, Potter M, Schulmeister K, Rüniger TM. Short and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells. *J. Investig. Dermatol.* 2006; 126(3): 667–675. doi: 10.1038/sj.jid.5700093.
16. Guy GP Jr, Berkowitz Z, Everett Jones S, Watson M, Richardson LC. Prevalence of indoor tanning and association with sunburn among youth in the United States. *JAMA Dermatol.* 2017; 153(5): 387-390. doi: 10.1001/jamadermatol.2016.6273.
17. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur. J. Cancer.* 2005; 41(1): 28–44. doi: 10.1016/j.ejca.2004.10.016.
18. Berwick M, Erdei E, Hay J. Melanoma epidemiology and public health. *Dermatol. Clin.* 2009; 27(2): 205–214. doi: 10.1016/j.det.2008.12.002.
19. Áviles AJ, Lázaro P. Predisposición genética en el melanoma cutáneo. *Actas Dermosifiliogr.* 2006; 97(4): 229-40. doi: 10.1016/s0001-7310(06)733907.

20. Kefford R, Bishop JN, Tucker M, Bressac-de Paillerets B, Bianchi-Scarrá G, Bergman W, Goldstein A, Puig S, Mackie R, Elder D, Hansson J, Hayward N, Hogg D, Olsson H. Melanoma genetics consortium. Genetic testing for melanoma. *Lancet Oncol.* 2002; 3(11): 653-4. doi: 10.1016/s1470-2045(02)00894-x.
21. Rawson RV, Wilmott JS, Scolyer RA. Mucosal melanoma: a review emphasizing the molecular landscape and implications for diagnosis and management. *Surg Pathol Clin.* 2021; 14(2): 293-307. doi: 10.1016/j.path.2021.01.005.
22. Schwartz AR. Melanoma maligno y diagnóstico diferencial de lesiones pigmentadas en piel. *Rev. Med. Clínica. Condes.* 2011; 22(6): 728-734.
23. Elder DE, Bastian BC, Cree IA, Massi D, Scolyer RA. The 2018 world health organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma: detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway. *Arch Pathol Lab Med.* 2020; 144(4): 500-522. doi: 10.5858/arpa.2019-0561-RA.
24. Hawryluk EB, Tsao H. Melanoma: clinical features and genomic insights. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 4(9): 1-17. doi: 10.1101/cshperspect.a015388.
25. Teixido C, Castillo P, Martinez-Vila C, Arance A, Alos L. Molecular markers and targets in melanoma. *Cells.* 2021; 10(9): 2320. doi: 10.3390/cells10092320.
26. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghi A, Spandidos DA, Mccubrey JA, Candido S, Libra M. Cutaneous melanoma: from pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol.* 2018; 52(4): 1071-1080. doi: 10.3892/ijo.2018.4287.
27. López F, Rodrigo JP, Cardesa A, Triantafyllou A, Devaney KO, Mendenhall WM, et al. Update on primary head and neck mucosal melanoma. *Head & Neck.* 2016; 38(1): 147-155. doi: 10.1002/hed.23872.
28. Ma Y, Xia R, Ma X, Judson-Torres RL, Zeng H. Mucosal Melanoma: Pathological Evolution, Pathway dependency and targeted therapy. *Front Oncol.* 2021; 11: 1-16. doi: 10.3389/fonc.2021.702287.

29. Nassar KW, Tan AC. The mutational landscape of mucosal melanoma. *Semin Cancer Biol.* 2020; 61: 139-148. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.013.
30. Newell F, Kong Y, Wilmott JS, et al. Whole-genome landscape of mucosal melanoma reveals diverse drivers and therapeutic targets. *Nat Commun.* 2019; 10(1): 1-15. doi: 10.1038/s41467-019-11107-x.
31. Ronnstrand L. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-kit. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(19-20): 2535-48.
32. Harris IS, DeNicola GM. The Complex Interplay between Antioxidants and ROS in Cancer. *Trends Cell Biol.* 2020; 30(6): 440-451. doi: 10.1016/j.tcb.2020.03.002.
33. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015; 97:55-74. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
34. Venza I, Venza M, Visalli M, Lentini G, Teti D, d'Alcontres FS. ROS as regulators of cellular processes in melanoma. *Oxid Med Cell Longev.* 2021; 2021: 1-19. doi: 10.1155/2021/1208690.
35. Willett WC. The Mediterranean diet: science and practice. *Public Health Nutr.* 2006; 9(1A): 105-10. doi: 10.1079/phn2005931.
36. Eleutherio ECA, Silva Magalhães RS, de Araújo Brasil A, Monteiro Neto JR, de Holanda Paranhos L. SOD1, more than just an antioxidant. *Arch Biochem Biophys.* 2021; 697: 108701. doi: 10.1016/j.abb.2020.108701.
37. Kim YS, Gupta Vallur P, Phaëton R, Mythreye K, Hempel N. Insights into the Dichotomous regulation of SOD2 in cancer. *Antioxidants (Basel).* 2017; 6(4): 86. doi: 10.3390/antiox6040086.
38. Banks CJ, Andersen JL. Mechanisms of SOD1 regulation by post-translational modifications. *Redox Biol.* 2019; 26: 101270. doi: 10.1016/j.redox.2019.101270.
39. Somwar R, Erdjument-Bromage H, Larsson E, et al. Superoxide dismutase 1 (SOD1) is a target for a small molecule identified in a screen for inhibitors of the growth of lung adenocarcinoma cell lines. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A. 2011; 108(39): 16375-16380. doi:10.1073/pnas.1113554108
40. Papa L, Hahn M, Marsh EL, Evans BS, Germain D. SOD2 to SOD1 switch in breast cancer. *J Biol Chem*. 2014; 289(9): 5412-6. doi: 10.1074/jbc.C113.526475.
41. Carvalho LAC, Queijo RG, Baccaro ALB, Siena ÁDD, Silva WA Jr, Rodrigues T, Maria-Engler SS. Redox-related proteins in melanoma progression. *Antioxidants (Basel)*. 2022; 11(3): 438. doi: 10.3390/antiox11030438.
42. Goyal MM, Basak A. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell*. 2010; 1(10): 888-97. doi: 10.1007/s13238-010-0113-z.
43. Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family an evolutionary overview. *FEBS J*. 2008; 275(15): 3959-70. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06542.x.
44. Pizzimenti S, Ribero S, Cucci MA, Grattarola M, Monge C, Dianzani C, Barrera G, Muzio G. Oxidative stress-related mechanisms in melanoma and in the acquired resistance to targeted therapies. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10(12): 1-30. doi: 10.3390/antiox10121942.
45. Rojo de la Vega M, Chapman E, Zhang DD. NRF2 and the hallmarks of cancer. *Cancer Cell*. 2018; 34(1): 21–43. doi: 10.1016/j.ccell.2018.03.022.
46. Huang C, Radi RH, Arbiser JL. Mitochondrial metabolism in melanoma. *Cells*. 2021; 10(11): 1-27. doi: 10.3390/cells10113197.
47. Hempel N, Carrico PM, Melendez JA. Manganese superoxide dismutase (SOD2) and redox-control of signaling events that drive metastasis. *Anticancer Agents Med Chem*. 2011; 11(2): 191-201. doi: 10.2174/187152011795255911.
48. Schott M, de Jel MM, Engelmann JC, Renner P, Geissler EK, Bosserhoff AK, Kuphal S. Selenium-binding protein 1 is down-regulated in malignant melanoma. *Oncotarget*. 2018; 9(12): 10445-10456. doi: 10.18632/oncotarget.23853.

49. Jiménez-Farfán D, Guevara J, Zenteno E, Malagón H, Hernández-Guerrero JC. EGF-R and erbB-2 in murine tooth development after ethanol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2005; 73(2): 65-71. doi:10.1002/bdra.20113
50. Jiménez-Farfán D, Guevara J, Zenteno E, Hernández-Guerrero JC. Alteration of the sialylation pattern of the murine tooth germ after ethanol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2005; 73(12): 980-988. doi:10.1002/bdra.20198
51. Hartman RI, Lin JY. Cutaneous melanoma: a review in detection, staging, and management. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2019; 33(1): 25-38. doi: 10.1016/j.hoc.2018.09.005. PMID: 30497675.
52. Feller L, Khammissa RAG, Lemmer J. A Review of the Aetiopathogenesis and Clinical and Histopathological Features of Oral Mucosal Melanoma. *ScientificWorldJournal*. 2017; 2017: 9189812. doi: 10.1155/2017/9189812.
53. Tiholoe MM, Khammissa RA, Bouckaert M, Altini M, Lemmer J, Feller L. Oral mucosal melanoma: some pathobiological considerations and an illustrative report of a case. *Head Neck Pathol*. 2015; 9(1): 127-34. doi: 10.1007/s12105-014-0526-8.
54. Kim BJ, Kim HS, Chang YJ, Kwon KH, Cho SJ. Primary amelanotic melanoma of the mandibular gingiva. *Arch Craniofac Surg*. 2020; 21(2): 132-136. doi: 10.7181/acfs.2019.00633.
55. Thomas AJ, Erickson CA. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008; 21(6): 598-610. doi: 10.1111/j.1755-148X.2008.00506.x. PMID: 19067969.
56. Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrist BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66(9): 1493-506. doi: 10.1007/s00018-009-8703-8. PMID: 19153661.
57. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary

- cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol.* 2006; 126(1): 154-60. doi: 10.1038/sj.jid.5700026.
58. Warszawik-Hendzel O, Słowińska M, Olszewska M, Rudnicka L. Melanoma of the oral cavity: pathogenesis, dermoscopy, clinical features, staging and management. *J Dermatol Case Rep.* 2014; 8(3): 60-6. doi: 10.3315/jdcr.2014.1175.
59. Lin J, Koga H, Takata M, Saida T. Dermoscopy of pigmented lesions on mucocutaneous junction and mucous membrane. *Br J Dermatol.* 2009; 161(6): 1255-1261. PMID: 19673880.
60. Duarte AF, Sousa-Pinto B, Azevedo LF, Barros AM, Puig S, Malvehy J, Haneke E, Correia O. Clinical ABCDE rule for early melanoma detection. *Eur J Dermatol.* 2021; 31(6): 771-778. doi: 10.1684/ejd.2021.4171.
61. Prasad S, Gupta SC, Tyagi AK. Reactive oxygen species (ROS) and cancer: role of antioxidative nutraceuticals. *Cancer Lett.* 2017; 28: 387:95-105. doi: 10.1016/j.canlet.2016.03.042.
62. Carvajal Carvajal C. Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo / Reactive oxygen species: training, function and oxidative stress. *Med. leg. Costa Rica.* 2019; 36(1): 91-100.
63. Ghareeb H, Metanis N. The thioredoxin system: a promising target for cancer drug development. *Chemistry.* 2020; 26(45): 10175-10184. doi: 10.1002/chem.201905792.
64. Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med.* 2014; 66: 75-87. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036.
65. Rhee SG. Overview on peroxiredoxin. *Mol Cells.* 2016; 39(1): 1-5. doi: 10.14348/molcells.2016.2368.
66. Ashok S, Damera S, Ganesh S, Karri R. Oral malignant melanoma. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2020 ;24(Suppl 1):S82-S85. doi: 10.4103/jomfp.
67. Kreß JKC, Jessen C, Marquardt A, Hufnagel A, Meierjohann S. NRF2 Enables EGFR Signaling in Melanoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 7;22(8):3803. doi: 10.3390/ijms22083803.

68. Arslanbaeva LR, Santoro MM. Adaptive redox homeostasis in cutaneous melanoma. *Redox Biol.* 2020; 37: 101753. doi: 10.1016/j.redox.2020.101753.
69. Le Gal K, Ibrahim MX, Wiel C, Sayin VI, Akula MK, Karlsson C, Dalin MG, Akyürek LM, Lindahl P, Nilsson J, Bergo MO. Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Sci Transl Med.* 2015; 7(308): 308re8. doi: 10.1126/scitranslmed.aad3740.
70. Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radic Biol Med.* 2017 ; 104: 144-164. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.
71. Bisevac JP, Djukic M, Stanojevic I, Stevanovic I, Mijuskovic Z, Djuric A, Gobeljic B, Banovic T, Vojvodic D. Association between oxidative stress and melanoma progression. *J Med Biochem.* 2018; 37(1): 12-20. doi: 10.1515/jomb-2017-0040.
72. Hintsala HR, Soini Y, Haapasaari KM, Karihtala P. Dysregulation of redox-state-regulating enzymes in melanocytic skin tumours and the surrounding microenvironment. *Histopathology.* 2015; 67(3): 348-57. doi: 10.1111/his.12659.
73. Hintsala HR, Jokinen E, Haapasaari KM, Moza M, Ristimäki A, Soini Y, Koivunen J, Karihtala P. Nrf2/Keap1 pathway and expression of oxidative stress lesions 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and nitrotyrosine in melanoma. *Anticancer Res.* 2016; 36(4): 1497-506.
74. Hintsala HR, Haapasaari KM, Soini Y, Karihtala P. An immunohistochemical study of NFE2L2, KEAP1 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and the EMT markers SNAI2, ZEB1 and TWIST1 in metastatic melanoma. *Histol Histopathol.* 2017; 32(2): 129-136. doi: 10.14670/HH-11-778.
75. Hämäläinen M, Teppo HR, Skarp S, Haapasaari KM, Porvari K, Vuopala K, Kietzmann T, Karihtala P. NRF1 and NRF2 mRNA and protein expression decrease early during melanoma carcinogenesis: an insight into survival and microRNAs. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019: 2647068. doi: 10.1155/2019/2647068.

76. Miura S, Shibazaki M, Kasai S, Yasuhira S, Watanabe A, Inoue T, Kageshita Y, Tsunoda K, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. A somatic mutation of the KEAP1 gene in malignant melanoma is involved in aberrant NRF2 activation and an increase in intrinsic drug resistance. *J Invest Dermatol.* 2014; 134(2): 553-556. doi: 10.1038/jid.2013.343.
77. Weitzenböck HP, Gschwendtner A, Wiesner C, Depke M, Schmidt F, Trautinger F, Hengstschläger M, Hundsberger H, Mikula M. Proteome analysis of NRF2 inhibition in melanoma reveals CD44 up-regulation and increased apoptosis resistance upon vemurafenib treatment. *Cancer Med.* 2022; 11(4): 956-967. doi: 10.1002/cam4.4506.
78. Carpenter EL, Becker AL, Indra AK. NRF2 and key transcriptional targets in melanoma redox manipulation. *Cancers (Basel).* 2022; 14(6): 1531. doi: 10.3390/cancers14061531.
79. Zhu H, Jia Z, Trush MA, Li YR. Nrf2 deficiency promotes melanoma growth and lung metastasis. *React Oxyg Species (Apex).* 2016; 2(4): 308-314. doi: 10.20455/ros.2016.853.
80. Hirose K, Longo DL, Oppenheim JJ, Matsushima K. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. *FASEB J.* 1993; 7(2): 361-8. doi: 10.1096/fasebj.7.2.8440412.
81. Suresh A, Guedez L, Moreb J, Zucali J. Overexpression of manganese superoxide dismutase promotes survival in cell lines after doxorubicin treatment. *Br J Haematol.* 2003; 120(3): 457-63. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04074.
82. Feller L, Masilana A, Khammissa RA, Altini M, Jadwat Y, Lemmer J. Melanin: the biophysiology of oral melanocytes and physiological oral pigmentation. *Head Face Med.* 2014; 10: 8. doi: 10.1186/1746-160X-10-8.
83. Venè R, Castellani P, Delfino L, Lucibello M, Ciriolo MR, Rubartello A. The Cystine/Cysteine Cycle and GSH are independent and crucial

- antioxidant systems in malignant melanoma cells and represent druggable targets. *Antioxid. Redox Signal.* 2010; 15(9): 2439–2453.
84. Drozd E, Gruber B, Marczevska J, Drozd J, Anuszevska E. Intracellular glutathione level and efflux in human melanoma and cervical cancer cells differing in doxorubicin resistance. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2016; 70: 319-28. doi: 10.5604/17322693.1199712.
85. Kopacz A, Kloska D, Forman HJ, Jozkowicz A, Grochot-Przeczek A. Beyond repression of Nrf2: An update on Keap1. *Free Radic Biol Med.* 2020; 157: 63-74. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.03.023.
86. Silva-Islas CA, Maldonado PD. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol Res.* 2018; 134:92-99. doi: 10.1016/j.phrs.2018.06.013.
87. Dzwierzynski WW. Melanoma risk factors and prevention. *Clin Plast Surg.* 2021; 48(4): 543-550. doi: 10.1016/j.cps.2021.05.001.
88. Glorieux C, Zamocky M, Sandoval JM, Verrax J, Calderon PB. Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med.* 2015; 87: 84-97.
89. Mondón Álvarez HN, Tancredi Cueto NF. Primary oral melanoma. Literature review. *Salud Mil* 2019; 38(2): 59-64. <http://dx.doi.org/10.35954/SM2019.38.2.4>
90. Zhang H, Kong Q, Wang J, Jiang Y, Hua H. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer. *Exp Hematol Oncol.* 2020; 9(1): 32. doi: 10.1186/s40164-020-00191-1.
91. ElBaiomy MA, Aref S, El Zaafarany M, Atwa S, Akl T, El-Beshbishi W, El-Ashwah S, Ibrahim L, El-Ghonemy M. Prognostic impact of lymphoid enhancer factor 1 expression and serum galectin.3 in egyptian AML patients. *Adv Hematol.* 2019; 2019: 2352919. doi: 10.1155/2019/2352919.
92. Solano F. Photoprotection and skin pigmentation: melanin-related molecules and some other new agents obtained from natural sources. *Molecules.* 2020; 25(7): 1537.

93. Liu-Smith F, Dellinger R, Meyskens FL Jr. Updates of reactive oxygen species in melanoma etiology and progression. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 563: 51-5.
94. Slominski RM, Sarna T, Płonka PM, Raman C, Brożyna AA, Slominski AT. Melanoma, melanin, and melanogenesis: the yin and yang relationship. *Front Oncol.* 2022; 12: 842496. doi: 10.3389/fonc.2022.842496.
95. Aggarwal V, Tuli HS, Varol A, Thakral F, Yerer MB, Sak K, Varol M, Jain A, Khan MA, Sethi G. Role of reactive oxygen species in cancer progression: molecular mechanisms and recent advancements. *Biomolecules.* 2019; 9(11):735. doi: 10.3390/biom9110735.
96. Simonetti O, Lucarini G, Rubini C, Lazzarini R, DI Primio R, Offidani A. Clinical and prognostic significance of survivin, AKT and VEGF in primary mucosal oral melanoma. *Anticancer Res.* 2015; 35(4): 2113-20.
97. Bai D, Ueno L, Vogt PK. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J Cancer.* 2009; 125(12):2863-70. doi: 10.1002/ijc.24748.
98. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-kB signaling. *Cell Res.* 2011; 21(1): 103-15. doi: 10.1038/cr.2010.178.
99. Liu B, Chen Y, St Clair DK. ROS and p53: a versatile partnership. *Free Radic Biol Med.* 2008; 44(8): 1529-35. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.011.
100. Papaspyrou G, Garbe C, Schadendorf D, Werner JA, Hauschild A, Egberts F. Mucosal melanomas of the head and neck: new aspects of the clinical outcome, molecular pathology, and treatment with c-kit inhibitors. *Melanoma Res.* 2011; 21(6): 475-82. doi: 10.1097/CMR.0b013e32834b58cf.
101. Lyu J, Song Z, Chen J, Shepard MJ, Song H, Ren G, Li Z, Guo W, Zhuang Z, Shi Y. Whole-exome sequencing of oral mucosal melanoma reveals mutational profile and therapeutic targets. *J Pathol.* 2018; 244(3): 358-366. doi: 10.1002/path.5017.

102. Zhang Y, Park J, Han SJ, Yang SY, Yoon HJ, Park I, Woo HA, Lee SR. Redox regulation of tumor suppressor PTEN in cell signaling. *Redox Biol.* 2020; 34: 101553. doi: 10.1016/j.redox.2020.101553.
103. Son Y, Cheong YK, Kim NH, Chung HT, Kang DG, Pae HO. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct.* 2011; 2011: 792639. doi: 10.1155/2011/792639.
104. Sander CS, Hamm F, Elsner P, Thiele JJ. Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol.* 2003; 148(5): 913-22. doi: 10.1046/j.1365-2133.2003.05303.
105. Notani K, Shindoh M, Yamazaki Y, Nakamura H, Watanabe M, Kogoh T, Ferguson MM, Fukuda H. Amelanotic malignant melanomas of the oral mucosa. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 40(3): 195-200. doi: 10.1054/bjom.2001.0713.
106. Soares CD, Hernandez-Guerrero JC, Andrade BA, Romañach MJ, Mosqueda-Taylor A, Carlos R, Macedo MR, Almeida OP, Jorge J. Comparative expression of cyclooxygenase 2 and Ki67 in amelanotic and conventional oral melanomas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2020; 25(6): e728-e731. doi: 10.4317/medoral.23737.
107. Basurto-Lozada P, Molina-Aguilar C, Castaneda-Garcia C, Vázquez-Cruz ME, Garcia-Salinas OI, Álvarez-Cano A, Martínez-Said H, Roldán-Marín R, Adams DJ, Possik PA, Robles-Espinoza CD. Acral lentiginous melanoma: basic facts, biological characteristics and research perspectives of an understudied disease. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2021; 34(1): 59-71. doi: 10.1111/pcmr.12885.
108. Tuominen H, Rautava J. Oral microbiota and cancer development. *Pathobiology.* 2021; 88(2): 116-126. doi: 10.1159/000510979.
109. Waasdorp M, Krom BP, Bikker FJ, van Zuijlen PPM, Niessen FB, Gibbs S. The bigger picture: why oral mucosa heals better than skin. *Biomolecules.* 2021; 11(8): 1165. doi: 10.3390/biom11081165.
110. Arneth B. Tumor microenvironment. *Medicina (Kaunas).* 2019; 56(1): 15. doi: 10.3390/medicina56010015.

111. Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F, Seifi B, Mohammadi A, Afshari JT, Sahebkar A. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018; 233(9): 6425-6440. doi: 10.1002/jcp.26429.
112. Hariharan S, Dharmaraj S. Selenium and selenoproteins: it's role in regulation of inflammation. *Inflammopharmacology.* 2020; 28(3): 667-695. doi: 10.1007/s10787-020-00690-x.
113. Rendra E, Riabov V, Mossel DM, Sevastyanova T, Harmsen MC, Kzhyshkowska J. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. *Immunobiology.* 2019; 224(2): 242-253. doi: 10.1016/j.imbio.2018.11.010.
114. Kainulainen K, Takabe P, Heikkinen S, Aaltonen N, de la Motte C, Rauhala L, Durst FC, Oikari S, Hukkanen T, Rahunen E, Ikonen E, Hartikainen JM, Ketola K, Pasonen-Seppänen S. M1 macrophages induce protumor inflammation in melanoma cells through TNFR-NF- $\kappa$ B Signaling. *J Invest Dermatol.* 2022; 142(11): 3041-3051.e10. doi: 10.1016/j.jid.2022.04.024.
115. Hashemi G, Dight J, Khosrotehrani K, Sormani L. Melanoma tumour vascularization and tissue-resident endothelial progenitor Cells. *Cancers (Basel).* 2022; 14(17): 4216. doi: 10.3390/cancers14174216.
116. Arneth B. Tumor microenvironment. *Medicina (Kaunas).* 2019; 56(1): 15. doi: 10.3390/medicina56010015.
117. Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal.* 2014; 20(7): 1126-67. doi: 10.1089/ars.2012.5149.
118. Takeshita S, Inoue N, Ueyama T, Kawashima S, Yokoyama M. Shear stress enhances glutathione peroxidase expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 273(1):66-71. doi: 10.1006/bbrc.2000.2898.
119. Peshavariya H, Dusting GJ, Jiang F, Halmos LR, Sobey CG, Drummond GR, Selemidis S. NADPH oxidase isoform selective regulation of endothelial cell proliferation and survival. *Naunyn*

- Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2009; 380(2): 193-204. doi: 10.1007/s00210-009-0413-0.
120. Meyskens FL Jr, Farmer PJ, Yang S, Anton-Culver H. New perspectives on melanoma pathogenesis and chemoprevention. *Recent Results Cancer Res.* 2007; 174: 191-5. doi: 10.1007/978-3-540-37696-5\_16.
121. Graham DG, Tiffany SM, Vogel FS. The toxicity of melanin precursors. *J Invest Dermatol.* 1978; 70(2): 113-6. doi: 10.1111/1523-1747.ep12541249.
122. Wick MM. Levodopa/dopamine analogs as inhibitors of DNA synthesis in human melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 1989; 92(5 Suppl): 329S-331S. doi: 10.1111/1523-1747.ep13076753.
123. Tanaka N, Mimura M, Kimijima Y, Amagasa T. Clinical investigation of amelanotic malignant melanoma in the oral region. *J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 62(8): 933-7. doi: 10.1016/j.joms.2004.01.017.
124. Hoare A, Soto C, Rojas-Celis V, Bravo D. Chronic Inflammation as a Link between periodontitis and carcinogenesis. *Mediators Inflamm.* 2019; 2019: 1029857. doi: 10.1155/2019/1029857.
125. Bale BF, Doneen AL, Vigerust DJ. High-risk periodontal pathogens contribute to the pathogenesis of atherosclerosis. *Postgrad Med J.* 2017; 93(1098): 215-220. doi: 10.1136/postgradmedj-2016-134279.
126. Hoare A, Soto C, Rojas-Celis V, Bravo D. Chronic inflammation as a link between periodontitis and carcinogenesis. *Mediators Inflamm.* 2019; 2019: 1029857. doi: 10.1155/2019/1029857. PMID: 31049022; PMCID: PMC6458883.
127. Schmickler J, Rupprecht A, Patschan S, Patschan D, Müller GA, Haak R, Mausberg RF, Schmalz G, Kottmann T, Ziebolz D. Cross-sectional evaluation of periodontal status and microbiologic and rheumatoid parameters in a large cohort of patients with rheumatoid arthritis. *J Periodontol.* 2017; 88(4): 368-379. doi: 10.1902/jop.2016.160355.
128. Yousef H, Alhajj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. 2022 Nov 14. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls

Publishing; 2023. Disponible en:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>

129. Robinson N, Ganesan R, Hegedús C, Kovács K, Kufer TA, Virág L. Programmed necrotic cell death of macrophages: focus on pyroptosis, necroptosis, and parthanatos. *Redox Biol.* 2019; 26: 101239. doi: 10.1016/j.redox.2019.101239.
130. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol.* 2013; 229(2): 176-85. doi: 10.1002/path.4133.
131. Miao X, Leng X, Zhang Q. The current state of nanoparticle-induced macrophage polarization and reprogramming research. *Int J Mol Sci.* 2017; 18(2): 336. doi: 10.3390/ijms18020336.
132. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008; 454(7203): 436-44. doi: 10.1038/nature07205.
133. Bansal SP, Dhanawade SS, Arvandeekar AS, Mehta V, Desai RS. Oral amelanotic melanoma: a systematic review of case reports and case series. *Head Neck Pathol.* 2022; 16(2): 513-524. doi: 10.1007/s12105-021-01366-w.