

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA Y CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLÓGICAS

**MELANOMA MALIGNO CUTÁNEO.
ESTUDIO DE CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS E
INMUNOHISTOQUÍMICAS DEL TUMOR PRIMARIO
PREDICTIVAS DE METÁSTASIS EN GANGLIO
CENTINELA.**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
M^a SALOMÉ MARTÍNEZ GONZÁLEZ

Dirigida por:
Dr. PERE HUGUET REDECILLA

Bellaterra (Barcelona), 2007.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de investigación ha podido realizarse gracias a la contribución de numerosas personas que han colaborado en su desarrollo:

A mi director de Tesis, Dr. Pere Huguet Redecilla, fuente de motivación y gran amigo que me enseñó a valorar, entre otras cosas, la histopatología cutánea en mis años de residente. Gracias por tu paciencia durante el tiempo que ha durado su elaboración y por continuar siendo mi amigo a pesar de la presión a la que te he sometido.

Al Dr. Manel Jarrod por su ayuda incondicional en la realización del estudio estadístico de esta tesis y a Montse por permitir que su marido dedicara parte de su tiempo para ayudarme a entender los entresijos del mismo.

Al Dr. Santiago Ramón y Cajal por permitirme disponer del material del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebrón que él dirige y facilitarme su estudio.

A mis compañeros del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Joan XXIII por ayudarme a soportar las largas horas de trabajo y a poder compaginarlo con las tareas asistenciales.

A mis amigos y compañeros de profesión, porque en nuestros continuos encuentros se han interesado por la evolución de este trabajo.

A mi madre, a mi padre (aunque ya no esté con nosotros) y al resto de familiares, por su continuo apoyo y ánimo para concluir la elaboración de esta tesis.

A mi marido Carlos y a mis hijos Carles y María, porque sin ellos ningún trabajo se hubiera podido hacer con ilusión.

Espero no haberos defraudado. Gracias a todos.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	MELANOMA MALIGNO CUTÁNEO	3
1.1.1	ASPECTOS HISTÓRICOS	4
1.1.2	DEFINICIÓN Y EMBRIOLOGÍA	5
1.1.3	EPIDEMIOLOGÍA	6
1.1.4	ETIOPATOGENIA	9
1.1.4.1	FACTORES DEPENDIENTES DEL INDIVIDUO	9
1.1.4.1.1	DENSIDAD MELANOCÍTICA	9
1.1.4.1.2	FENOTIPO CUTÁNEO	9
1.1.4.1.3	LESIONES PRECURSORAS	10
1.1.4.1.4	FACTORES GENÉTICOS	11
1.1.4.2	FACTORES EXÓGENOS AL INDIVIDUO	12
1.1.4.2.1	FACTORES AMBIENTALES: RADIACIÓN ULTRAVIOLETA (UV)	12
1.1.4.2.2	FACTORES FARMACOLÓGICOS	13
1.1.4.2.3	FACTORES OCUPACIONALES	13
1.1.4.2.4	OTROS FACTORES	13
1.1.5	CLASIFICACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA DE CLARK	14
1.1.5.1	MELANOMA SOBRE LENTIGO MALIGNO (LMM)	16
1.1.5.2	MELANOMA DE EXTENSIÓN SUPERFICIAL (MES)	16
1.1.5.3	MELANOMA NODULAR (MN)	17
1.1.5.4	MELANOMA LENTIGINOSO ACRO (MLA)	18
1.1.5.5	OTRAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	20
1.1.5.5.1	REGRESIÓN DEL MELANOMA	20
1.1.5.5.2	MELANOMA PRIMARIO OCULTO	20
1.1.6	ESTADIFICACIÓN	21
1.1.7	DIAGNÓSTICO	27
1.1.7.1	DIAGNÓSTICO CLÍNICO	27
1.1.7.2	DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO	28
1.1.8	TRATAMIENTO	30
1.2	BIOPSIA DEL GANGLIO CENTINELA	32
1.3	RECUERDO DE CONCEPTOS BÁSICOS MOLECULARES E INMUNOHISTOQUÍMICOS	36
1.3.1	INTRODUCCIÓN	36
1.3.2	KI67	41
1.3.3	ÍNDICE DE P53	42
1.3.4	P16	44
1.3.5	BCL2	46
1.3.6	MELAN A	47
1.3.7	HMB-45	48
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	49
2.1	HIPÓTESIS DE TRABAJO	51
2.2	OBJETIVOS	52
2.2.1	OBJETIVO PRINCIPAL	52
2.2.2	OBJETIVOS SECUNDARIOS	52

3	MATERIAL Y MÉTODOS	53
3.1	TIPO DE ESTUDIO Y CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	55
3.2	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	56
3.3	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	56
3.4	VARIABLES A ESTUDIO.....	56
3.4.1	DATOS CLÍNICOS	56
3.4.2	CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL MELANOMA CUTÁNEO.....	57
3.4.2.1	ÍNDICE DE BRESLOW.....	57
3.4.2.2	NIVEL DE CLARK	58
3.4.2.3	FASE DE CRECIMIENTO TUMORAL.....	58
3.4.2.4	CONTAJE DE MITOSIS	58
3.4.2.5	ULCERACIÓN	59
3.4.2.6	INVASIÓN VASCULAR ANGIOLINFÁTICA	59
3.4.2.7	PRESENCIA DE INFILTRADO INFLAMATORIO PERITUMORAL ..	60
3.4.2.8	SIGNOS DE REGRESIÓN	60
3.4.2.9	NEUROTROPISMO	60
3.4.2.10	MICROSATELITOSIS.....	60
3.4.2.11	AFECTACIÓN ANEXIAL.....	61
3.4.2.12	NEVUS PREEXISTENTE	61
3.4.3	TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS DEL MELANOMA	61
	CUTÁNEO	61
3.4.3.1	ÍNDICE DE KI67	62
3.4.3.2	ÍNDICE P53.....	63
3.4.3.3	ÍNDICE DE P16.....	63
3.4.3.4	ÍNDICE DE BCL2	64
3.4.3.5	ÍNDICE DE MELAN A.....	64
3.4.3.6	ÍNDICE DE HMB45	64
3.4.4	GANGLIO CENTINELA	65
3.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	70
4	RESULTADOS	73
4.1	ANÁLISIS DESCRIPTIVO	75
4.2	ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES.....	81
4.2.1	ASOCIACIÓN ENTRE DATOS CLÍNICOS.....	81
4.2.2	ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES HISTOLÓGICAS	82
4.2.3	ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS	92
4.2.4	ASOCIACIÓN ENTRE DATOS CLÍNICOS, VARIABLES HISTOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS	93
4.2.5	ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES HISTOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS	97
4.2.6	ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES CLÍNICAS, HISTOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS Y GANGLIO CENTINELA.....	101
5	DISCUSIÓN	109
6	CONCLUSIONES	125
7	BIBLIOGRAFÍA	131

1 INTRODUCCIÓN

1.1 MELANOMA MALIGNO CUTÁNEO

En los últimos años se ha incrementado progresivamente el interés sobre el melanoma maligno, un tipo de cáncer cutáneo muy agresivo y potencialmente fatal. Los datos epidemiológicos referentes a este tumor son alarmantes, ya que su incidencia va en aumento en gran número de países, a un ritmo aproximado del 5% al año. En la actualidad, el melanoma es la principal causa de muerte por cáncer cutáneo, siendo responsable del 65-75% de ellas, así como del 1-2% de todas las muertes por cáncer.

Estudios recientes han permitido correlacionar múltiples factores que predicen la probabilidad de desarrollo de la enfermedad y, en los pacientes ya afectados, la de aparición de enfermedad metastásica y muerte. Asimismo, han permitido la elaboración de nuevos sistemas de estadificación y de tratamiento.

La detección precoz de estos tumores es de importancia vital para reducir su mortalidad y puede conseguirse mediante simple inspección o exploración física, ya que la apariencia macroscópica del tumor cutáneo primario suele ser característica, permitiendo diagnosticar alrededor del 90% de los mismos.

1.1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

La primera descripción de melanoma se atribuye a René Laënnac [1] quien, en 1.806, discutió la “melanosis” (del griego *melas*-negro-) en la Facultad de Medicina de Paris. En 1.820 William Norris realizó una detallada descripción del melanoma cutáneo, contribuyendo en 1.857 con la descripción de 8 casos de “melanosis” y planteando su posible relación con productos industriales.

El término melanoma ya había sido sugerido por primera vez por Robert Carswell en 1.838. En 1.890, Jonathan Hutchinson describió el lentigo maligno que lleva su nombre. En 1.907, William Sampson Handley describió las vías anatómicas de diseminación y su extensión linfática centrífuga [2].

Aunque en 1.820 Norris había reconocido una posible predisposición familiar a desarrollar melanoma y hoy sabemos que aproximadamente el 10% de los melanomas surgen en un contexto familiar, no fue hasta hace 25 años que empezaron a desarrollarse los estudios para determinar las bases genéticas de susceptibilidad para desarrollar melanoma. En 1.978 algunos autores [3, 4] describieron familias con melanoma múltiple.

1.1.2 DEFINICIÓN Y EMBRIOLOGÍA

El melanoma maligno es la proliferación neoplásica maligna originada en los melanocitos de la epidermis.

Los melanocitos, células productoras de melanina y responsables de la pigmentación de la piel, derivan de células pluripotenciales de la cresta neural. Sus inmediatos precursores, los melanoblastos, emigran durante el primer trimestre de la gestación desde la cresta neural a diversas regiones anatómicas como la piel, la úvea y el folículo piloso. La diferenciación progresiva de los melanoblastos en la piel durante el desarrollo embrionario, fetal y neonatal produce los melanocitos maduros de la epidermis del adulto, que son células dotadas de un citoplasma con prolongaciones o dendritas, con pigmento intracitoplasmático (melanina).

En condiciones normales, en la piel, los melanocitos se sitúan en la capa basal epidérmica y contactan con los queratinocitos por medio de sus dendritas, existiendo un melanocito por cada 36-40 queratinocitos y por cada 8-9 células basales (unidad melánica epidérmica). La densidad de los melanocitos es variable dependiendo de la región anatómica (mayor en la región genital y areola mamaria), pero es muy constante entre los individuos de las diferentes razas.

Los melanocitos tienen unas organelas (melanosomas) que contienen el aminoácido tirosina que, al oxidarse por acción de la tirosinasa, se convierte en DOPA (dihidroxifenilalanina) y, después, en dopaquinona que se polimeriza para formar el pigmento melánico. La actividad de la tirosinasa está estimulada por la unión de la hormona estimuladora del melanocito alfa (α -MSH: melanocyte stimulating hormone) a un receptor en la membrana de los melanocitos. Este receptor de melanocortina (MCR: melanocortin receptor) presenta hasta 5 variantes y, según cual sea ésta, se va a determinar la respuesta en la producción de un tipo u otro de melanina (eumelanina -color pardo- o feomelanina -pigmento rojo amarillento-) de la que va a depender, en definitiva, la respuesta del individuo a la luz solar.

1.1.3 EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia y mortalidad del melanoma maligno cutáneo han aumentado de forma espectacular en las últimas décadas. El incremento anual en las cifras de incidencia varía entre diferentes poblaciones, pero desde principios de los años 60 del pasado siglo se ha detectado un incremento sostenido de la incidencia del melanoma, entre un 3 y un 7% anual, en muchos países occidentales [5]. Se calcula que durante el año 2.000 se produjeron en el mundo desarrollado unos 100.000 nuevos casos, lo que representa un 7-8% de todos los cánceres [6], aunque la cifra varía de un país a otro [7]. Las estimaciones más recientes sugieren una duplicación de la incidencia del melanoma cada 10-20 años [8].

Según cifras del Registro Nacional del Melanoma, en el año 2.001 se declararon en Cataluña un total de 271 casos de melanoma (4,36/100.000 habitantes). En España cada año se diagnostican cerca de 2.000 nuevos casos. En la Unión Europea se estima una incidencia de 8 afectados por cada 100.000 habitantes y año, lo que supone 36.000 casos anuales y unas 12.000 muertes provocadas por este tumor. En Europa del Norte la incidencia del melanoma cutáneo se ha multiplicado por 15 en los últimos 50 años. En Estados Unidos la incidencia aumenta alrededor del 4% cada año.

Australia es el país que presenta mayor incidencia de melanoma (50 casos al año por 100.000 habitantes); se explica porque su latitud condiciona una exposición solar muy intensa a la que está habituada la población aborigen pero no la población caucásica (de piel clara), de origen inmigrante, que es mayoría. En Australia el melanoma es el cuarto cáncer más frecuente en el hombre, tras el de próstata, intestino y pulmón, y el tercero en la mujer tras el de mama e intestino.

La incidencia y mortalidad del melanoma maligno son mayores en áreas cercanas al ecuador, donde la intensidad de radiación ultravioleta es mayor [9].

Los factores de riesgo del melanoma incluyen una combinación de predisposición constitucional y exposición a factores ambientales. Los datos epidemiológicos confirman que el principal factor ambiental para el desarrollo

de melanoma es la exposición intermitente a la luz solar. La función genoprotectora de la melanina parece estar en relación con la aparición de neoplasias cutáneas, incluido el melanoma, que se asocian a la exposición solar.

La evidencia epidemiológica [10-12] sugiere que las razas de color tienen menor incidencia de melanoma y de neoplasias cutáneas, en general. Pero, aunque el melanoma maligno cutáneo sea más frecuente en los individuos de raza blanca (caucásicos), en los de raza negra el diagnóstico de la enfermedad suele ser tardío y, por tanto, su pronóstico peor. En parte, esto se debe a que en razas no blancas, el tumor con frecuencia aparece en localizaciones atípicas y, a menudo, ocultas (palmas o plantas, mucosa oral, rectal, vaginal). Las diferencias raciales en la incidencia se asocian con el grado de pigmentación y éste con la melanogénesis.

En relación con la edad, la incidencia es mayor en sujetos relativamente jóvenes, entre los 30 y los 60 años, con una media de 50 años. En niños es raro y su comportamiento suele ser relativamente benigno.

No hay predilección por sexo, siendo su incidencia similar; sin embargo, la localización suele ser diferente: predomina en miembros inferiores en las mujeres, y en tronco, cara, cuello y extremidades superiores en los varones. En aquéllas suele aparecer a edades tempranas y, en éstos, más avanzadas.

El melanoma maligno constituye el 3% de los cánceres cutáneos, pero ocasiona el 65% de las muertes por esta causa. En los últimos 30 años la cifra de mortalidad por melanoma ha aumentado del 2,0/100.000 casos en 1.969 al 3,0/100.000 casos en 1.999, en parte debido al aumento de mortalidad entre los varones de edad superior o igual a 65 años [13, 14]. Actualmente este incremento de la mortalidad está comenzando a compensarse gracias al mayor grado de sospecha y vigilancia que se ejerce, permitiendo diagnósticos más precoces y una cierta disminución de la exposición a los factores de riesgo. El reconocimiento precoz del melanoma es muy importante, ya que la extirpación de tumores primarios de espesor inferior a 1,0 mm comporta mejor pronóstico, con supervivencia libre de enfermedad a los 10 años superior al 90%.

INTRODUCCIÓN

La supervivencia varía en función del estadiaje del tumor. La supervivencia a los 5 años en estadio I es superior al 90% (mayor del 95% en estadio Ia y alrededor del 90% en estadio Ib); en estadio II, entre el 45 y el 80% (80% en el IIa , 65% en el IIb y 45% en el IIc); en el estadio III entre el 25 y el 70% (65-70% para el IIIa, 45-53% para el IIIb y 25-30% para el IIIc) y del 6.7% al 18.8% en el estadio IV [15, 16].

En relación con la presencia de metástasis ganglionares, en los pacientes con melanoma cutáneo sin afectación ganglionar la supervivencia a los 10 años es del 70-80%, mientras que en los pacientes con metástasis ganglionar la supervivencia es del 20-30% [17].

Las campañas de prevención primaria y secundaria son esenciales para la reducción de la incidencia y de la mortalidad del melanoma en el futuro.

1.1.4 ETIOPATOGENIA

Dado que la etiología del melanoma es muy compleja, se siguen estudiando diversos factores que parecen intervenir en su aparición, entre los que se encuentran factores ambientales así como otros dependientes del huésped, sobre todo de tipo genético.

1.1.4.1 Factores dependientes del individuo

1.1.4.1.1 Densidad melanocítica

Se define como el número de melanocitos por unidad de superficie cutánea. Este factor no parece mostrar correlación significativa con la predisposición a desarrollar melanoma. Lo demuestra el hecho de que este tumor es más frecuente en la raza blanca que en la población negra u oriental. Además, aunque la incidencia del melanoma aumenta de forma considerable cada año en las poblaciones blancas de Europa, Estados Unidos, Canadá, Australia, etc., sólo lo ha hecho muy ligeramente entre las poblaciones de origen africano o asiático.

Existe una relación inversa entre el grado de pigmentación y el daño actínico en la piel, incluyendo la fotocarcinogénesis [18].

1.1.4.1.2 Fenotipo cutáneo

Consistente en las características del color de ojos, pelo, piel y la tendencia a la aparición de pecas o efélides. Presenta una clara asociación con el desarrollo del melanoma cutáneo.

Los fototipos cutáneos definidos por Fitzpatrick son los siguientes:

- ✓ Fototipo I: individuos de piel blanca en los que la exposición solar provoca quemaduras, sin bronceado.
- ✓ Fototipo II: individuos de piel blanca en los que la exposición solar provoca quemaduras, con mínimo bronceado.

- ✓ Fototipo III: individuos de piel blanca en los que la exposición solar provoca tanto quemadura como bronceado.
- ✓ Fototipo IV: individuos de piel blanca en los que la exposición solar no provoca quemaduras, permitiendo el bronceado.
- ✓ Fototipo V: individuos de piel parda en los que la exposición solar no provoca quemaduras, permitiendo el bronceado.
- ✓ Fototipo VI: individuos de piel negra en los que la exposición solar no provoca quemaduras, permitiendo el bronceado.

Las personas de raza blanca con el pelo rubio o rojizo, los ojos azules o verdes, piel muy clara y abundantes pecas (fototipo cutáneo I de Fitzpatrick) son especialmente susceptibles para desarrollar esta neoplasia.

1.1.4.1.3 Lesiones precursoras

Es bien conocido que un melanoma puede desarrollarse sobre tumores melanocíticos benignos como son los nevus melanocíticos comunes congénitos o adquiridos y los nevus displásicos. Los nevus melanocíticos comunes congénitos, presentes por definición en el momento del nacimiento o durante el primer año de vida, presentan un riesgo del 2% de desarrollar melanoma mientras que, en el caso de nevus congénitos gigantes (cuyas dimensiones son superiores a 20 cm. de diámetro) el riesgo de desarrollar melanoma oscila entre el 5 y el 20%. El riesgo de aparición de este tumor sobre un nevus melanocítico común adquirido es inferior al 1%.

Los nevus atípicos o displásicos se consideran marcadores de riesgo y precursores directos de melanoma. El nevus displásico puede presentarse de forma esporádica o familiar. Se ha acuñado el término “síndrome del nevus displásico” (SND) familiar o “síndrome del nevus atípico” para describir un conjunto de lesiones clínicas e histológicas que se heredan de forma autosómica dominante. Los pacientes afectados presentan múltiples nevus que comienzan a aparecer en la adolescencia. Este síndrome se asocia tanto a melanoma familiar como a esporádico aunque, si el paciente tiene antecedentes familiares de melanoma, el riesgo de desarrollar la enfermedad

es prácticamente del 100%. En los pacientes con nevos displásicos esporádicos el riesgo de asociación a melanoma es del 10-20%.

1.1.4.1.4 Factores genéticos

La mayoría de los melanomas son esporádicos, pero entre el 5 y el 10% de los mismos tienen un claro componente hereditario. En el cáncer hereditario lo que se transmite a la descendencia no es el cáncer propiamente dicho, sino un aumento en el riesgo de desarrollar la enfermedad.

En los últimos años, los avances en las técnicas de mapeo genético han permitido localizar e identificar numerosos genes causantes de enfermedades. Los estudios dirigidos a caracterizar los genes implicados en los síndromes de cáncer familiar han proporcionado numerosas pruebas que apuntan a la inactivación de los genes supresores tumorales, siendo raras las alteraciones que activen oncogenes en la línea germinal. Uno de los avances más importantes y recientes en la investigación del melanoma es la identificación de alteraciones genéticas y citogenéticas responsables de su desarrollo y progresión. En este tumor, los cromosomas 1, 6, 7, 9 y 10 son los más frecuentemente alterados [19-23].

El gen que más se ha estudiado, por desempeñar un papel predominante en el desarrollo neoplásico, es el del inhibidor de quinasas dependiente de ciclina 2 (CDKN2) o p16INK4a, localizado en la región p21 del cromosoma 9. Este gen se encuentra alterado con mucha frecuencia en las líneas celulares de melanoma esporádico y también en pacientes con presentación familiar.

Algunos estudios epidemiológicos han demostrado que la predisposición genética y la exposición solar juegan papeles importantes en el riesgo de melanoma cutáneo [24-27]. Estudios recientes [25, 28, 29] han dado algunas claves sobre los mecanismos moleculares que permiten la susceptibilidad genética.

1.1.4.2 Factores exógenos al individuo

1.1.4.2.1 Factores ambientales: Radiación ultravioleta (UV)

La presentación del melanoma cutáneo comenzó a relacionarse con la exposición a los rayos ultravioleta desde que su incidencia aumentó en las zonas soleadas, en gente que trabajaba al aire libre. Actualmente se considera que la exposición a las radiaciones ultravioletas es el principal factor etiológico del melanoma, siendo responsable de, al menos, un 65% de los mismos en todo el mundo. Los datos epidemiológicos implican a la exposición intermitente a la luz solar y a quemaduras repetidas como las principales causas de melanoma [30, 31].

Las radiaciones UV corresponden a toda radiación de longitud de onda inferior a los 400 nm. Fue descubierta por Johannes Ritter a principios del siglo XIX y se divide en tres regiones:

-UVA: entre 400 y 320 nm, responsable del bronceado de la piel.

-UVB: varía entre 280 y 320 nm y representa sólo el 0.25% de toda la radiación solar que llega a la superficie de la Tierra.

-UVC: de menor longitud de onda que las anteriores, es absorbida totalmente por la atmósfera.

La intensidad de la radiación ultravioleta que llega a la superficie terrestre depende de la hora del día y la época del año, de la latitud, de la altura, del espesor de la capa de ozono, del clima y de la contaminación atmosférica.

En relación con el patrón de exposición solar no se conoce exactamente cuál es el esquema más peligroso de exposición. Algunos estudios apoyan la hipótesis de que la exposición a la radiación ultravioleta intensa e intermitente de la piel que se encuentra normalmente protegida de la luz es la responsable de la formación del melanoma. Este dato refuerza la idea de que la relación existente entre riesgo de melanoma y exposición al Sol no es un simple efecto acumulativo [24, 32].

Al parecer, el ADN de los melanocitos absorbe las radiaciones ultravioletas, produciéndose lesiones moleculares en el mismo que estimulan la división celular y la producción de melanina. Estudios recientes han puesto de manifiesto que la radiación UV produce roturas cromosómicas y alteraciones del ADN celular, tanto en los melanomas como en los nevos displásicos [33].

1.1.4.2.2 Factores farmacológicos

Algunos autores han demostrado la asociación positiva entre el melanoma cutáneo y la administración de fármacos empleados en el tratamiento de la esterilidad, como el clomifeno y la gonadotropina coriónica humana (HCG) [34].

La ingesta de otros fármacos, como la levodopa [35], algunos beta-bloqueantes, tiazidas y benzodiazepinas, también se ha asociado con el desarrollo de melanoma.

1.1.4.2.3 Factores ocupacionales

En cuanto a las exposiciones ocupacionales a sustancias químicas, se ha establecido asociación entre el melanoma y la exposición a bifenilos policlorados (PCB) y cloruro de polivinilo (PVC) [36].

1.1.4.2.4 Otros factores

No se ha demostrado una clara asociación entre factores hormonales e incidencia de melanoma. Sin embargo, parece ser que la producción de melanina puede estimularse por acción de estrógenos, como ocurre durante el embarazo. La gestación, la ingesta de anticonceptivos orales y el tratamiento hormonal sustitutivo durante la menopausia son factores en discusión con resultados contradictorios [37].

1.1.5 CLASIFICACIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICA DE CLARK

A finales de los años 60, Clark [38] propuso clasificar el melanoma en tres tipos fundamentales en función de los rasgos clínicos y anatomopatológicos, de modo que reflejaran su patrón de crecimiento. Éstos son:

- Melanoma sobre lentigo maligno o Lentigo maligno melanoma (LMM).
- Melanoma de extensión superficial (MES).
- Melanoma nodular (MN).

Posteriormente, McGovern [39] y, sobre todo, Reed [40] describieron las formas clínicas de localización acral (MLA) y de mucosas.

Además, en 1.969 Clark [41] reconoció dos fases en el desarrollo de este tumor:

-La denominada fase de crecimiento radial u horizontal, que se caracteriza por la proliferación de melanocitos neoplásicos en el espesor de la epidermis, sin invasión de la dermis papilar. Esta fase se observa en el melanoma de extensión superficial, en el melanoma sobre lentigo maligno y en el melanoma lentiginoso acro.

-La segunda fase, denominada de crecimiento vertical, muestra la proliferación de melanocitos originados en la epidermis que invaden la dermis papilar, reticular y/o la hipodermis. El melanoma nodular es un ejemplo básico de este patrón de crecimiento.

La progresión de esta segunda fase ha permitido definir los niveles de invasión (niveles de Clark) y las medidas de espesor tumoral (índice de Breslow), que son algunos de los principales parámetros histológicos que se han utilizado durante años para determinar el pronóstico de estos tumores.

Los niveles de invasión definidos por Clark y sus características son los siguientes:

Nivel I: o melanoma "in situ", donde todas las células tumorales se encuentran por encima de la membrana basal, en la epidermis.

Nivel II: Invasión de la dermis papilar por células aisladas o pequeños nidos celulares, sin expandirla.

Nivel III: El tumor ocupa la interfase entre la dermis papilar y reticular media.

Nivel IV: Infiltración franca de la dermis reticular profunda.

Nivel V: Infiltración del tejido celular subcutáneo.

1.1.5.1 Melanoma sobre lentigo maligno (LMM):

También denominado melanosis precancerosa de Dubreuilh o mácula melanótica de Hutchinson, constituye el 4-15% de todos los melanomas.

Aparece en pacientes de edad avanzada (edad media al diagnóstico de 65 años), con mayor afectación del sexo femenino (4:1).

Su principal localización es en la cara, sobre todo en regiones malar y temporal. Su predilección por aparecer en zonas expuestas justifica que sea el único tipo de melanoma que claramente se relaciona con la radiación solar.

Las lesiones de LMM suelen ser máculas grandes (mayores de 3 cm.), planas e hiperpigmentadas, con una fase de crecimiento radial o intraepidérmica larga, por lo que en su evolución a melanoma invasivo pueden transcurrir muchos años.

Histológicamente, en las áreas no invasivas se observa una proliferación de melanocitos atípicos que muestran un crecimiento radial limitado al compartimento intraepidérmico; si invaden la dermis papilar sólo lo hacen en forma de células aisladas o en pequeños nidos de melanocitos, de similar tamaño y número (no más de 5-10 células de melanoma). Además, suele acompañarse de degeneración basofílica del colágeno dérmico. Las figuras de mitosis se ven con frecuencia en la epidermis, pero no en la dermis.

Tras su extirpación quirúrgica completa suelen ir seguidos de una supervivencia larga y libre de metástasis [42-46].

1.1.5.2 Melanoma de extensión superficial (MES)

Constituye la forma clínica más frecuente en la raza blanca y representa el 50-70% de todas las lesiones.

La edad de aparición se encuentra entre los 30 y los 50 años, sin predilección por uno u otro sexo.

Suele ser más frecuente en espalda y miembros inferiores (en mujeres) y en tronco (en hombres). En una buena proporción de casos (40-50%) aparece sobre lesiones melánicas previas, como un nevus común o un nevus displásico preexistente.

Suele ser una lesión plana, asimétrica, hiperocrómica, aunque con variaciones del color con áreas acrómicas secundarias a procesos de regresión.

La fase de crecimiento radial dura entre 6 meses y 7 años antes de iniciarse la fase de crecimiento vertical, que se manifiesta con la aparición de una lesión nodular, que conlleva una reducción de la supervivencia del paciente.

En la fase de crecimiento radial de este tipo de melanoma se observa una proliferación de melanocitos atípicos bastante uniformes, aislados y en grupos en la epidermis. En la fase de crecimiento vertical, los melanocitos infiltran la dermis papilar y se extienden hacia la dermis reticular y la hipodermis.

1.1.5.3 Melanoma nodular (MN)

Es el segundo tipo más frecuente de melanoma y comprende entre el 10 y el 30% de los mismos. Puede afectar a cualquier grupo de edad, aunque suelen ser personas entre 40 y 60 años, sin predilección por sexo.

Sus principales localizaciones son el tronco, la cabeza o el cuello.

Aunque suele darse sobre piel normal, puede también desarrollarse sobre un nevus.

El melanoma nodular se manifiesta en general como una lesión de color homogéneo, de 1 a 2 cm. de diámetro, de crecimiento rápido durante varios meses. Aproximadamente el 5% de ellos carecen de pigmento y son difíciles de diferenciar de otras lesiones pápulo-nodulares de la piel tipo hemangioma, granuloma piógeno, nevus azul, etc.

Su fase clínica previa a la invasión en profundidad es muy breve (carece de una fase de crecimiento radial preexistente), es decir, desde el inicio la lesión muestra una morfología macroscópica nodular secundaria a una fase de crecimiento vertical pura.

Su crecimiento rápido hacia la profundidad de la dermis comporta que se trate de la forma clínica con mayor agresividad y capacidad de metastatizar. Microscópicamente, es un tumor en el que el crecimiento intraepidérmico siempre va asociado a invasión dérmica. En esta última se identifica una proliferación de patrón difuso de melanocitos con marcada atipia citológica que infiltran dermis profunda y/o hipodermis. Las células pueden ser de hábito epitelioides o bien fusiformes.

1.1.5.4 Melanoma lentiginoso acro (MLA)

Es el menos frecuente en la raza blanca, constituyendo el 2-8% de todos los melanomas. En otras razas aparece en una proporción mucho mayor, como en la negra (60-72%) y en la oriental (29-46%).

Su incidencia es mayor en pacientes de edad avanzada (5ª y 6ª décadas de la vida), sin predilección de sexo.

Esta variante incluye los localizados en palmas de manos o plantas de pies (MLA palmo-plantar) y mucosas o uniones mucocutáneas oral y genital (MLA de mucosas).

Son lesiones con bordes irregulares, geográficos. En el momento del diagnóstico la medida oscila entre los 2 y 3 cm. de diámetro, con frecuente ulceración.

Histológicamente se caracteriza por la presencia de melanocitos a lo largo de la unión dermoepidérmica, con patrón lentiginoso y epidermis hiperplásica, de forma similar al melanoma sobre lentigo maligno, en la fase de crecimiento radial. La evolución a la fase de crecimiento vertical varía desde unos pocos meses hasta varios años, con una media de 2,5 años.

Dada su localización, su diagnóstico suele ser tardío por lo que es frecuente la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico. Así, el 25% de los pacientes con lesiones localizadas a nivel vaginal presentan metástasis en el momento del diagnóstico y tienen una supervivencia del 40% a los 5 años. Los pacientes con melanoma anorrectal presentan metástasis en el 50% al diagnóstico -adenopatías regionales o masa pélvica- y tienen una supervivencia del 10% a los 5 años.

1.1.5.5 Otras características clínicas

1.1.5.5.1 Regresión del melanoma

En el 4-15% de los melanomas se detectan clínicamente cambios de regresión parcial (la más frecuente) o total, que se manifiestan como zonas hipocrómicas en una lesión pigmentada previa.

La regresión puede ser desencadenada por múltiples factores (traumatismos, patologías autoinmunes, procesos infecciosos, etc.) iniciándose una respuesta inflamatoria linfocitaria con liberación de citoquinas que destruyen la lesión, con incontinencia pigmentaria, fibrosis y colagenización.

1.1.5.5.2 Melanoma primario oculto

Su incidencia es del 4-6%. Se presenta como una enfermedad metastásica diseminada, sobre todo ganglionar, en la que no se logra identificar la lesión primaria. Las explicaciones propuestas son variadas: o bien el melanoma primario regresó espontáneamente antes de la aparición de la metástasis, o bien se originó inicialmente en un ganglio linfático, en los que no son infrecuentes las inclusiones de células névicas o la presencia de melanocitos aislados. Por otra parte, hay que tener en cuenta aquellas lesiones primarias no detectadas clínicamente, pese a existir, o a errores de diagnóstico anatomopatológico de melanomas extirpados y no diagnosticados.

1.1.6 ESTADIFICACIÓN

Los esquemas de clasificación y estadificación en cáncer son útiles ya que permiten identificar a aquellos pacientes que presentan un alto riesgo de desarrollar enfermedad avanzada, comparar resultados de tratamiento, recomendar las mejores terapias y ofrecer información pronóstica al paciente y a sus familiares. Para poder predecir la supervivencia, el sistema de estadiaje ha de tener en cuenta las características histológicas, biológicas y anatómicas del tumor primario, sus patrones de crecimiento local y de metástasis, así como la historia natural de la enfermedad.

En el melanoma, al igual que en la mayoría de neoplasias malignas de otras localizaciones, se utiliza el sistema TNM para describir la extensión anatómica de la enfermedad. Dicho sistema se basa en la evaluación de tres componentes: la extensión del tumor primario, la ausencia o presencia de afectación neoplásica de ganglios linfáticos regionales y la presencia o ausencia de metástasis a distancia. (Ver Esquema 1).

* El estudio de la extensión del melanoma primario (T) se realiza midiendo su espesor en milímetros desde la superficie hasta la profundidad. Históricamente se han establecido como puntos de corte los siguientes valores: 0,75 mm, 1,5 mm y 4,0 mm.

* La definición de ganglios regionales (N) depende de la localización del tumor primario. Así, en tumores de cabeza y cuello los ganglios regionales se localizan a nivel preauricular, submandibular, cervical y supraclavicular; en tórax, a nivel axilar; en abdomen, en el área genital y glútea los ganglios de drenaje se encuentran en la región inguinal; en la extremidad superior, en los espacios axilares y epitrocleares y, en la extremidad inferior, a nivel inguinal y poplíteo. En caso de melanomas primarios en localizaciones anatómicas con drenaje potencialmente ambiguo, se consideran ganglios linfáticos regionales los de ambos lados de la zona subsidiaria o los determinados por métodos específicos, como la linfogammagrafía. La introducción de nuevas técnicas como el estudio del ganglio centinela (cuya descripción se realiza posteriormente) ha hecho que el estadiaje ganglionar sea más preciso.

INTRODUCCIÓN

La presencia de metástasis en ganglios regionales se ha subclasificado en dependencia del tamaño de la metástasis, ya fuera menor o igual a 3 cm (N1) o superior a dicho valor (N2).

* La presencia de metástasis a distancia se ha venido incluyendo en una única categoría (M1), subdividida en dos según la afectación fuera visceral (M1b) o no (M1a).

Esquema 1.

pT

Tx El tumor primario no puede ser evaluado.

T0 Sin evidencia de tumor primario.

Tis Melanoma in situ.

T1 $\leq 0,75$ mm.

T2 $> 0,75 - \leq 1,5$ mm.

T3 $> 1,5$ mm – $\leq 4,0$ mm.

T4 $> 4,0$ mm.

pN

Nx Los ganglios linfáticos regionales no pueden evaluarse.

N0 Ganglios regionales negativos.

N1 Metástasis de ≤ 3 cm. de diámetro en cualquier ganglio regional.

N2 Metástasis de > 3 cm. de diámetro en cualquier ganglio regional y/o metástasis en tránsito.

a: Metástasis de > 3 cm de diámetro en cualquier ganglio regional

b: Metástasis en tránsito.

c: Ambos.

pM

Mx Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas.

M0 Ausencia de metástasis a distancia.

M1a Metástasis cutáneas, subcutáneas o ganglionares a distancia.

M1b Metástasis viscerales.

Los criterios de clasificación del melanoma maligno se han modificado en gran medida a lo largo de los años, según se han ido identificando nuevos factores pronósticos y confirmando la importancia de los ya conocidos. En 1.999, el American Joint Committee on Cancer (AJCC) creó el Comité de Estadaje del Melanoma, constituido por especialistas de América del Norte, Europa y Australia, para revisar el sistema de estadaje vigente hasta entonces. Así, se generó una base de datos prospectiva (con los casos recogidos en 13 centros) con el fin de validar las revisiones propuestas [47]. Los resultados de los análisis de factores pronósticos fueron utilizados por dicho Comité para crear un nuevo sistema de estadificación del melanoma que se publicó en el año 2.001 [16]. Este sistema de estadaje se hizo oficial con la publicación de la 6ª edición del Manual de Estadaje del Cáncer AJCC del 2.002 [48]. Las variables pronósticas independientes seleccionadas por el Comité de Estadaje del Melanoma se han utilizado en la clasificación revisada del TNM del melanoma cutáneo [49, 50], introduciéndose las siguientes modificaciones (Esquema 2):

* Así, en la categoría T no sólo se establece una modificación de la medida recomendada por Breslow en 1.970 [51, 52], sino que la presencia o ausencia de ulceración [16, 47, 53] origina una subclasificación de todos los niveles T, y el nivel de invasión de Clark lo hace en los melanomas con índice de Breslow inferior o igual a 1,0 mm (T1) [53-55].

* En la categoría N, el tamaño de la metástasis ganglionar [56, 57] se reemplaza por el número de ganglios metastásicos, subclasificándose según sean metástasis ganglionares microscópicas o macroscópicas. Además [56, 58, 59] se agrupan las lesiones satélite (es decir, la presencia de nidos tumorales de más de 0,05 mm de tamaño en la misma sección histológica que el tumor primario) y las metástasis en tránsito (aquellas lesiones neoplásicas a más de 3 cm. del tumor primario pero que no ha llegado al ganglio linfático de drenaje) en una entidad única (N2c).

* En la categoría M, la determinación [60, 61] de los niveles séricos de lactatodeshidrogenasa (LDH) establece varios subgrupos al asociarse con la localización visceral o no de las metástasis [47, 62].

Esquema 2.

pT

- Tx El tumor primario no puede ser evaluado.
- T0 Sin evidencia de tumor primario.
- Tis Melanoma in situ.
- T1 ≤ 1,0 mm.
a: sin ulceración o nivel II o III de Clark.
b: con ulceración o nivel IV o V de Clark.
- T2 1,01 – 2,0 mm.
a: sin ulceración.
b: con ulceración.
- T3 2,01 – 4,0 mm.
a: sin ulceración.
b: con ulceración.
- T4 > 4,0 mm.
a: sin ulceración.
b: con ulceración.

pN

- Nx Los ganglios linfáticos regionales no pueden evaluarse.
- N0 Ganglios regionales negativos.
- N1 1 ganglio linfático afecto.
a. micrometástasis.
b: macrometástasis.
- N2 2-3 ganglios linfáticos afectados.
a: micrometástasis.
b: macrometástasis.
c: metástasis en tránsito o lesiones satélites.
- N3 4 ó más ganglios afectados.

pM

- M0 Ausencia de metástasis a distancia.
- Mx Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas.
- M1a Metástasis cutáneas, subcutáneas o ganglionares a distancia. Lactatodeshidrogenasa (LDH) normal.
- M1b Metástasis pulmonares. LDH normal.
- M1c Metástasis otras vísceras con LDH normal o metástasis a distancia con LDH elevada.

La combinación de las diferentes categorías TNM con sus modificaciones da lugar al Sistema de estadiaje AJCC 2002 [47]. La incorporación de los datos del mapeo linfático con la biopsia del ganglio centinela [63] y la enfermedad micrometastásica permiten categorizar a los pacientes en estadios tanto clínicos como patológicos. (Esquema 3).

Esquema 3.

ESTADIO CLÍNICO				ESTADIO PATOLÓGICO		
0	Tis	N0	M0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	T1b	N0	M0
IIA	T2a	N0	M0	T2a	N0	M0
	T2b	N0	M0	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	T4b	N0	M0
III	Todo T	N1	M0			
		N2				
		N3				
IIIA				T1-T4a	N1a	M0
				T1-T4a	N2a	M0
IIIB				T1-T4b	N1a	M0
				T1-T4b	N2a	M0
				T1-T4a	N1b	M0
				T1-T4a	N2b	M0
				T1-T4a/b	N2c	M0
IIIC				T1-T4b	N1b	M0
				T1-T4b	N2b	M0
				Todo T	N3	M0
IV	Todo T	Todo N	Todo M1	Todo T	Todo N	Todo M1

INTRODUCCIÓN

Los criterios desarrollados en el análisis de los factores pronósticos de la AJCC han sido confirmados posteriormente de forma independiente por los resultados de otros centros [64-66]. Sin embargo, también han surgido diferentes grupos que ponen en entredicho algunos aspectos del mismo [67, 68], como son los relacionados con el impacto pronóstico del nivel de Clark en estadios I, el sobreestadiaje de los melanomas por el hecho de existir ulceración, así como la falta de inclusión en el mismo de otros parámetros, como la respuesta inflamatoria linfocítica [43, 69, 70] y el índice mitótico [71].

1.1.7 DIAGNÓSTICO

1.1.7.1 Diagnóstico clínico

Es el fundamental para la detección precoz del melanoma. Es importante conocer tanto los antecedentes familiares en relación a este tipo de tumor como la historia personal de exposición solar, asignando un fototipo cutáneo (según la clasificación de Fitzpatrick), en función del comportamiento de la piel (quemadura / bronceado) ante una exposición solar no protegida.

La exploración física permitirá determinar el número total de nevus, detectando aquellos que muestren características clínicas sugestivas de malignidad. Para ello, en el diagnóstico precoz del melanoma cutáneo se estableció [72] la regla ABCD, que corresponde a los siguientes acrónimos: **A**: Asimetría. **B**: Bordes irregulares. **C**: Coloración variable. **D**: Diámetro superior a 6 mm. En general, el melanoma presenta crecimiento asimétrico, márgenes irregulares, diversidad del color y del patrón de pigmentación y crecimiento rápido con tamaño superior a 6 mm.

Por otro lado, el aumento rápido de tamaño y cambio de color de una lesión pigmentada son los síntomas más precoces de alerta sobre su posible transformación maligna y se presentan en más del 70% de los melanomas fácilmente curables.

Sin embargo, en ocasiones se requieren técnicas complementarias que aumentan la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de melanoma, entre las cuales se incluye, fundamentalmente, la dermatoscopia. La dermatoscopia es una técnica no invasiva que permite el examen de la piel con un sistema óptico y una fuente de luz para la visualización en profundidad de estructuras dérmicas no accesibles a la simple inspección visual. La dermatoscopia, también denominada microscopía de epiluminiscencia, de luz incidente o de superficie, introducida en 1.989, permite la visualización de estructuras de la interfase dermis-epidermis y de la dermis papilar, basada en criterios que han sido correlacionados con características histológicas específicas. Algunos estudios incluso han demostrado una buena correlación entre algunos criterios

dermatoscópicos y el espesor de Breslow, estableciendo su utilidad conjunta como criterio de la realización de la Biopsia de Ganglio Centinela [73]. La dermatoscopia mejora la exactitud del diagnóstico clínico del melanoma, aumentando su sensibilidad entre un 10-30% y facilitando su diferenciación de otras lesiones pigmentadas no melanocíticas como hemangiomas, granulomas piógenos, etc.

1.1.7.2 Diagnóstico histológico

Dado que el melanoma es curable cuando se diagnostica en estadio precoz, es fundamental realizar estudio biopsico de las lesiones pigmentadas con características clínicas sospechosas.

La biopsia escisional es el procedimiento de elección, ya que extirpa la lesión en su totalidad y permite su análisis completo. La resección no se ha de realizar con márgenes amplios, porque puede no ser necesaria si la lesión resulta benigna (la escisión constituye el tratamiento), o insuficiente si el tumor es muy profundo.

En otras ocasiones el patólogo recibe biopsias incisionales (“punch”) de lesiones extensas. En estos casos la aplicación de los criterios diagnósticos puede ser difícil para diferenciar la benignidad o malignidad de la misma, así como para aportar los datos pronósticos requeridos en caso de tratarse de un melanoma maligno.

Desde el punto de vista microscópico, se observa una lesión asimétrica constituida por una proliferación de melanocitos atípicos con anisonucleosis y anisocariosis, núcleos hipercromáticos, cromatina irregular y nucleolo prominente, que pueden adoptar una morfología epitelióide o fusiforme. Pueden observarse en fase de crecimiento radial o vertical, con migración intraepidérmica ascendente o pagetoide y presencia de mitosis en el componente dérmico. De todas formas, cada presentación clínica muestra hallazgos histológicos específicos, ya comentados previamente.

Las técnicas de inmunohistoquímica no permiten discernir entre lesiones melanocíticas benignas o malignas, aunque en algunos casos pueden ser de

ayuda en algunas facetas, siendo las más utilizadas la proteína S-100, el HMB45, el Melan A /MART-1 y el Ki67 (MIB-1).

1.1.8 TRATAMIENTO

La cirugía constituye la base fundamental del tratamiento del melanoma cutáneo primario y consiste en la resección de los posibles nidos residuales de tumor (post-biopsia) o de la ampliación correcta y adecuada de los márgenes quirúrgicos de resección.

El margen quirúrgico de resección ha sido un tema muy controvertido, aunque actualmente se han definido pautas más concretas en función de los factores pronósticos. El margen de resección que se recomienda depende del rango de espesor tumoral; así,

- en melanomas "in situ" se aconseja un margen de 0,5 a 1 cm. (por el riesgo de recidiva local).

- Melanoma infiltrante con índice de Breslow inferior o igual a 1,0 mm, según un ensayo aleatorizado de la OMS [74], el margen de 1 cm es suficiente.

- Melanoma infiltrante con espesor de Breslow superior a 1,0 mm pero inferior a 2,0 mm, el margen ha de ser de 2 cm. [74].

- Lesiones infiltrantes superiores a 2,0 mm pero inferiores o iguales a 4,0 mm, no es necesario que el margen de escisión radial sea mayor de 2 cm. [75].

- Lesiones con índice de Breslow mayor de 4,0 mm, parece razonable un margen de 2-3 cm. [76].

Cuando el melanoma se reconoce precozmente, es decir, en la fase de crecimiento radial, y la enfermedad está todavía localizada a la piel, la escisión quirúrgica puede permitir la curación clínica [46, 77]. Sin embargo, en la fase de crecimiento vertical, el melanoma tiene capacidad metastásica y el tumor se suele hacer resistente a los métodos de terapia habituales [42-46].

En melanomas de grosor de Breslow superior a 1,0 mm se tiende a indicar la biopsia de ganglio centinela (es decir, del primer ganglio linfático regional que recibe la linfa de la zona donde asienta el tumor primario), seguida

de resección completa ganglionar si el resultado de la misma es la positividad macro o microscópica.

Los pacientes afectos de melanoma con espesor de Breslow superior a 4,0 mm se valorará su participación en terapia adyuvante sistémica con interferón alfa-2b a alta dosis, así como en pacientes con melanoma cutáneo con espesor de Breslow inferior a 4,0 mm pero con ganglios locoregionales metastásicos. Aparentemente aumenta el tiempo libre de enfermedad, aunque no se ha demostrado una mejora de la supervivencia global estadísticamente significativa.

En casos de melanoma con metástasis a distancia, se han de encontrar nuevas fórmulas de tratamiento con diferentes factores quimioterápicos e inmunoterápicos, que incluyan la administración de vacunas.

1.2 BIOPSIA DEL GANGLIO

CENTINELA

El estado de los ganglios linfáticos regionales en el melanoma primario es un determinante crítico para el pronóstico y supervivencia del paciente [78]. La estadificación ganglionar y el diagnóstico del estado de los ganglios linfáticos regionales de pacientes con melanoma maligno cutáneo se ha visto revolucionado por el desarrollo de la biopsia del ganglio centinela (BGC) [79]. El ganglio centinela (GC) se define como el primer ganglio de drenaje del tumor primario. El objetivo de esta técnica es conocer si el GC presenta o no metástasis de melanoma. Un estudio reciente [80] determinó que el estatus histológico del ganglio centinela es el factor aislado más importante para predecir la supervivencia; pacientes con metástasis en ganglio centinela tenían 6,5 veces más riesgo de morir de melanoma que los pacientes con ganglio centinela negativo.

La biopsia de ganglio centinela se desarrolló inicialmente para detectar metástasis linfáticas en el carcinoma de parótida [81], pero actualmente su principal utilidad es en el diagnóstico de metástasis linfáticas del cáncer de mama y del melanoma cutáneo [82, 83]. En este último, la biopsia de ganglio centinela se introdujo para intentar identificar aquellos pacientes que se pudieran beneficiar de la disección ganglionar regional electiva [84]. Dicha técnica fue ampliamente adoptada, posteriormente validada [85] y revalorizada para la identificación, con escasa morbilidad, de pacientes con metástasis ganglionares subclínicas.

El desarrollo de la tecnología de la biopsia del ganglio centinela [79, 82, 86, 87] ha sido un avance importante en el manejo de pacientes con melanoma. Está aceptada ampliamente como método de estadiaje de los ganglios linfáticos regionales del melanoma cutáneo y está implantada de forma estandarizada en múltiples centros. El procedimiento se basa en el hecho de que las diversas regiones de la piel tienen patrones específicos de

drenaje linfático, no sólo al territorio ganglionar regional sino también a uno o varios ganglios específicos de dicho territorio. Además, la histología del ganglio centinela refleja la del resto de ganglios de la región. Así, la técnica del estudio del ganglio centinela lleva a cabo un abordaje selectivo ganglionar que emplea el mapeo intraoperatorio, basándose en la linfoescintografía, mediante una sonda portátil, combinado con un colorante azul visible y con un marcador radioactivo para identificar un ganglio linfático centinela dentro de un grupo ganglionar [63].

La positividad de metástasis en biopsia de ganglio centinela se estima entre el 15 y el 20% [88]. En la mayoría de los casos, el ganglio centinela es el único sitio de enfermedad metastásica en los ganglios regionales [89, 90]. Sin embargo, en el 15-20% de pacientes con biopsia de ganglio centinela positiva hay algún otro ganglio no centinela positivo en la disección axilar completa [63, 79, 80, 91-94]. Su valor predictivo negativo es cercano al 100%; sin embargo, el 11% de los melanomas con ganglios centinelas negativos histológicamente desarrollan metástasis regionales ganglionares o a distancia después de 35 meses [95], es decir, son falsos negativos. Los resultados falsos negativos (5-10%) pueden explicarse por 4 mecanismos:

- error técnico de modificación del drenaje linfático primario por extirpación amplia previa del melanoma.

- el anatomopatólogo no detecta las micrometástasis en el ganglio centinela correcto.

- existen metástasis regionales debido a la diseminación secundaria a partir de enfermedad local o en tránsito, no identificadas en el momento de realizar la biopsia del ganglio centinela.

- los verdaderos falsos negativos, que se definen como la presencia de micrometástasis en los ganglios linfáticos de una estación superior en ausencia de micrometástasis en el ganglio linfático centinela.

La técnica de evaluación histológica del ganglio centinela todavía no está consensuada. Algunos autores [84] han demostrado que las metástasis del melanoma tienden a localizarse en planos centrales ganglionares (hipótesis

del plano central), a través del hilio y en el eje longitudinal (mayor). Para examinar la biopsia de ganglio centinela, por lo tanto, se debe realizar su bisección según el eje longitudinal, así como examinar múltiples secciones paralelas a este plano. Sin embargo, aún no se ha establecido cual es la mejor tinción o la más apropiada para la identificación de las células del melanoma. Algunos autores utilizan métodos morfométricos para gradar la profundidad de la metástasis desde la cápsula y el número de laminillas afectadas [96], demostrando que pocos pacientes con metástasis pequeñas tienen metástasis en el resto de los ganglios regionales. Otros autores intentan relacionar el patrón de la localización de las metástasis en el ganglio centinela (subcapsular, subcapsular y parenquimatosa, parenquimatosa, extensa) con la existencia de metástasis en el resto de ganglios regionales [97]. Establecen que la mayor parte (40%) de las metástasis se localizan en la zona subcapsular y que, cuando únicamente están en esta localización, no se asocian con metástasis en el resto de ganglios linfáticos regionales, es decir, no se beneficiarían de la linfadenectomía total. Actualmente están en evaluación nuevas técnicas para detectar las metástasis ganglionares centinelas submicroscópicas, es decir, con histología e inmunohistoquímica de ganglio centinela negativa. Así, se están realizando estudios mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) sólo o combinada con la transcripción inversa (RT-PCR) para la detección de la transcripción del antígeno del melanoma en los ganglios linfáticos y en las muestras de sangre periférica.

Aunque la biopsia de ganglio centinela es un procedimiento con baja morbilidad, el riesgo de complicaciones potenciales y su coste aconsejan que se realice una selección de los posibles candidatos [98]. De esta manera se establecen las indicaciones de la biopsia de ganglio centinela [99]:

- Pacientes con melanoma primario con espesor de Breslow entre 1,01 y 4,0 mm, sin ganglios regionales palpables ni metástasis a distancia conocidas;
- Pacientes con melanoma primario con espesor de Breslow menor o igual a 1,0 mm, pero con ulceración, con regresión o si el nivel de Clark es de III o superior;

- Pacientes con melanoma primario con espesor de Breslow mayor de 4,0 mm, con el fin de determinar la necesidad de tratamiento coadyuvante si el ganglio centinela presenta metástasis.

La necesidad o no de realizar la linfadenectomía completa tras una biopsia de ganglio centinela positiva es un área de controversia. Parece ser que la biopsia de ganglio centinela identifica a los pacientes con mayor riesgo para los cuales la disección ganglionar completa terapéutica y la terapia adyuvante son apropiadas. Por ello, la mayoría de autores defiende que la existencia de metástasis en el ganglio centinela es criterio de realización de disección ganglionar completa. Sin embargo, otros [79, 82, 89, 90] consideran que la presencia de enfermedad residual oculta remanente en ganglios linfáticos no-centinela tras un ganglio centinela positivo, junto con el incierto beneficio sobre la supervivencia de la linfadenectomía electiva, ponen en entredicho la necesidad de realizar la linfadenectomía completa tras biopsia de ganglio centinela positiva y abogan por la mera observación. Por otro lado, si bien varios estudios retrospectivos han demostrado un ligero beneficio de supervivencia para aquellos pacientes en los que se realizó disección ganglionar electiva comparada con la mera observación [100, 101], otros ensayos prospectivos recientes no han demostrado diferencias en la supervivencia entre los dos grupos [102, 103].

1.3 RECUERDO DE CONCEPTOS

BÁSICOS MOLECULARES E

INMUNOHISTOQUÍMICOS

1.3.1 INTRODUCCIÓN

En la célula cada proteína cumple un rol específico, formando parte de su estructura (proteínas que le dan forma y sostén a la célula) o participando en una función específica (producción de hormonas, contracción de un músculo, transmisión del impulso nervioso, etc.). En el ADN la información se encuentra codificada en forma de genes que se definen como las unidades elementales de información y que contienen los datos necesarios para la fabricación de una proteína. La información codificada en un gen es transmitida a una molécula intermedia, denominada ácido ribonucleico mensajero (ARNm), que es capaz de salir del núcleo y entrar en contacto con los ribosomas para iniciar la síntesis proteica. La transferencia de información genética de ADN a ARNm se denomina transcripción, el paso de ARNm a proteína traducción y el proceso global que engloba los dos previos, expresión génica. La transcripción está regulada por determinadas proteínas, denominadas factores de transcripción, que son capaces de unirse a unas regiones del ADN que anteceden a la secuencia de un gen y que se llaman regiones promotoras. La unión de factores de transcripción-ADN a nivel de regiones promotoras pone en marcha la expresión de un gen. Cada gen contiene las instrucciones necesarias para fabricar una proteína específica.

El ciclo vital de la célula está formado por cuatro etapas perfectamente diferenciadas. Normalmente, mientras la célula se encuentra en fase G1, realiza sus funciones fisiológicas y es metabólicamente muy activa. Cuando se va a dividir entra en un proceso que está constituido por las otras tres fases de su ciclo vital o celular. La primera etapa de esta división celular es la fase S, o

fase de síntesis. Durante este periodo, se sintetiza una copia del ADN. Al final del mismo, la célula todavía no dividida cuenta con dos copias de su ADN. Una vez completada la duplicación del ADN, proceso denominado replicación, entra en la siguiente etapa, o fase G2. En este periodo se preparan los mecanismos necesarios para acometer la fragmentación celular que se desarrollará en el siguiente paso, o fase de mitosis (fase M). Una vez realizada la separación de ambas células hijas cada una con su correspondiente copia de ADN, éstas quedan en fase G0 para reiniciar su actividad fisiológica concreta.

Este proceso de replicación es controlado por un grupo de proteínas que tienen por finalidad supervisar el ciclo celular de manera que una célula no entra en una nueva fase hasta no haber superado unas comprobaciones necesarias previas denominadas puntos de chequeo ("checkpoint"). La finalidad de esta supervisión radica en que la célula sólo se divida cuando sea preciso y respondiendo siempre a mecanismos de control más elevados a nivel supracelular. Asimismo, estas comprobaciones son necesarias para asegurar que las copias del ADN que se generen sean iguales a la molécula progenitora evitando la introducción de fallos o errores en el proceso de duplicación o replicación.

Agentes exógenos o errores endógenos pueden inducir la expresión de genes cuyas proteínas activan la entrada de la célula en división celular. Estos genes se llaman oncogenes, porque desencadenan una proliferación descontrolada dando lugar a una neoplasia. Entre éstos destacan el c-myc, ras, etc. Asimismo, estos mismos factores exógenos o endógenos pueden simultáneamente bloquear la expresión o dañar otros genes cuyas proteínas tienen un papel regulador de la proliferación (genes supresores de tumores).

En estado "salvaje" los genes supresores de tumores impiden la transformación celular inducida por oncogenes, y mantienen una correcta tasa de crecimiento bloqueando los procesos de división celular inadecuados y permitiendo una correcta homeostasis del organismo. Cuando un gen supresor deja de funcionar correctamente puede ser responsable de la formación de tumores.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se han descrito más de 30 genes considerados supresores de tumores de los cuales, la mitad aproximadamente, se han encontrado mutados o con deleciones en cánceres humanos.

La vida de una célula, tal como la conocemos hoy en día, se encuentra estrechamente unida al proceso de muerte celular. De la misma forma que la célula entra en el ciclo de replicación celular tras un estímulo apropiado, diversos y complejos mecanismos la llevan finalmente a la muerte, la cual ocurre a través de una serie de reacciones metabólicas específicas. A pesar de la descripción morfológica hecha por Vogt (en 1.842) en la metamorfosis de anfibios y de la observación del médico francés Boinet (en 1.890) de que las células mueren durante el transcurso normal de la vida, la idea de que la muerte celular pudiera llevarse a cabo por una serie de eventos programados fue rechazada durante muchos años por la comunidad científica. Diferentes grupos de embriólogos fueron capaces de observar, a principios del siglo XIX, que durante el proceso de desarrollo de diferentes organismos, millares de células mueren, pero este concepto no trascendió. Solamente desde 1.980, a través de los estudios de Hornvitz [104] se introduce el término de muerte celular programada, para la cual es necesaria la expresión de genes capaces de regular la muerte de un número específico de células durante el desarrollo de este organismo. En 1.972, Kerr y Wyllie [105] utilizaron el término apoptosis proveniente de dos vocablos griegos: apo (aparte) y ptosis (caer), inspirados en la caída de las hojas de los árboles, para describir una serie de características morfológicas observadas en diferentes tejidos. Estos cambios morfológicos no eran más que la manifestación de células en proceso de muerte, las cuales sólo pueden observarse en determinadas condiciones ya que su rápida desaparición mediante diversos y eficientes sistemas fagocíticos hace difícil su detección, razón por la cual el conocimiento de este proceso se desarrolló de forma posterior al de otros procesos celulares. En condiciones fisiológicas la muerte de las células ocurre a través de un mecanismo de apoptosis, mediante el cual las células pueden controlar su propia muerte.

La proliferación y la muerte celular constituyen importantes procesos fisiológicos que difícilmente podrían ser considerados independientes el uno del otro. La estrecha relación entre ambos permite el desarrollo normal y la

viabilidad de un organismo. Por esta razón la incidencia del proceso apoptótico en un determinado tejido dependerá, en gran parte, de su capacidad replicativa, del momento de su desarrollo y de las condiciones en que se encuentra. Existe una fina coordinación entre los procesos replicativos y los procesos apoptóticos. Esta estrecha relación puede romperse por diferentes estímulos, alterándose la incidencia del proceso ya sea por incremento o por bloqueo del mismo, tornándose nocivo para la integridad de un organismo [106]. El tiempo que tarda una célula en ejecutar el programa de muerte depende del tipo de célula y del tipo de estímulo recibido. La regulación interna de este programa, permite que una célula individual, tras un determinado estímulo endógeno u exógeno, realice una transición de un estado metabólicamente activo a la fragmentación de las organelas celulares con integridad de la membrana [104]. Estas células apoptóticas son eliminadas por sistemas fagocíticos o, simplemente, por las células que las rodean, razón por la cual también se ha denominado este proceso con el nombre de autofagia. Esta rápida eliminación de las células apoptóticas se lleva a cabo por medio de un eficiente mecanismo de reconocimiento por parte de otras células, gracias a cambios importantes que ocurren a nivel de la estructura de la membrana de las células muertas. Esta propiedad marca la diferencia con el proceso de muerte celular vía lisis o necrosis [104]. En éste la célula se comporta pasivamente, perdiendo poco a poco sus funciones, con una temprana disfunción de las membranas celulares, entrada de agua, ruptura de las distintas organelas y, finalmente, una desintegración celular y liberación de su material histolítico, permitiendo el establecimiento de una respuesta inflamatoria [106, 107]. De esta forma podemos decir que la apoptosis constituye un proceso fisiológico que permite el mantenimiento de una homeostasis celular y, simultáneamente, un importante mecanismo de defensa, ya que elimina células infectadas, dañadas, envejecidas o con un genoma alterado, evitando así un sinnúmero de procesos patológicos [106].

La célula que muere presenta una serie de cambios morfológicos por lo que, en algunos casos, aún es posible su identificación [105]. Las células apoptóticas presentan disminución del volumen celular y alteraciones en la estructura de la membrana. Ya que el objetivo del proceso apoptótico consiste

INTRODUCCIÓN

en la rápida eliminación de células potencialmente nocivas, uno de los principales mecanismos será la rápida destrucción del genoma impidiendo así que aquellas lleguen a dividirse [108]. La fragmentación nuclear ocurre a través de la activación de diferentes endonucleasas dependientes de Mg^{++} y reguladas por Ca^{++} que, con ayuda de diferentes proteasas, rompen el DNA en fragmentos de alto peso molecular.

El interés en el control de la apoptosis ha crecido exponencialmente con el reconocimiento de su rol vital en el desarrollo normal, en la homeostasis tisular y en la defensa contra patógenos.

En el cáncer, la presencia de un tumor podría deberse en parte a un aumento en la proliferación celular, acompañado de una disminución en el índice de mortalidad en las células tumorales. Debido a esto, el principal objetivo de la quimioterapia consiste en frenar el crecimiento de estas células e inducir su muerte. La mayor parte de las drogas utilizadas en terapias contra el cáncer causan la muerte de estas células vía apoptosis.

1.3.2 KI67

La capacidad de proliferación es uno de los parámetros citohistológicos clásicamente relacionados con el comportamiento biológico-clínico de cualquier neoplasia. En la historia de la Patología se han desarrollado muy diversas técnicas tendentes a cuantificar este parámetro que no debe confundirse, en sentido estricto, con la capacidad de crecimiento tumoral ya que ésta depende no sólo del porcentaje de células en ciclo celular, sino también de la cantidad de células que mueren bien por mecanismo apoptótico o por necrosis.

De entre las diversas técnicas desarrolladas para determinar el índice proliferativo, el más usado actualmente por su sencillez, economía, protocolización y reproducibilidad es la determinación inmunohistoquímica de la proteína Ki67, una proteína nuclear asociada a proliferación celular que se detecta en las fases G₁, S, G₂ y M del ciclo celular, pero no en la fase G₀.

El uso de marcadores de proliferación como el ki67 como indicadores de evolución clínica ha sido utilizado en múltiples tipos tumorales. Muchos estudios han demostrado que la tinción con ki67 es un método eficiente para evaluar la fracción de crecimiento en diferentes tumores, incluyendo el melanoma maligno cutáneo [109, 110].

1.3.3 ÍNDICE DE P53

El primer gen descrito que codificaba una proteína supresora de tumores fue p53. Descubierta en 1.979 [111], el gen p53 se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 (17p1.3), se extiende a lo largo de 20kb de ADN y está constituido por 11 exones.

Este gen da lugar a una proteína, la proteína p53, denominada así por su peso molecular (53Kdaltons), formada por 393 aminoácidos que pueden agruparse en tres dominios funcionales, de los cuales el más importante es el dominio central, que contiene la zona de unión al DNA específica de secuencia. Casi el 90% de las mutaciones presentes en tumores humanos se localizan entre los exones correspondientes a la región de unión al DNA, que pueden causar en p53 tanto pérdida de función supresora de tumores como ganancia de función oncogénica, y que modifican el repertorio de genes que son controlados por p53 como factor de transcripción [112].

p53 fue considerado durante una década como un nuevo oncogén - capaz de inducir transformación celular o tumores - ya que inicialmente el gen p53 descubierto era una forma mutada e inactiva de p53, por lo tanto, cooperaba con otros oncogenes en los procesos de transformación celular. Posteriormente se descubrió que p53 formaba parte de la nueva familia de proteínas supresoras de tumores que tenían en común su papel antitumoral. La proteína p53, se ha convertido en objeto de estudio intenso cuando se observó que un alto porcentaje de los cánceres humanos contenían mutaciones en p53 [113-115].

En p53, más del 70% de las mutaciones provocan el cambio de un aminoácido. En el caso de p53, la proteína "salvaje" tiene una vida media corta y es muy difícil de detectar mediante técnicas que utilicen anticuerpos anti-p53. Sin embargo, la proteína p53 mutada, presente en tumores humanos, al cambiar sólo un único aminoácido, modifica su conformación e incrementa su estabilidad y, por tanto, su acumulación y fácil detección con técnicas de inmunohistoquímica [116]. Aunque en la mayoría de los casos la mutación se produce inicialmente en uno de los dos alelos, la proteína p53 mutante anula la

expresión del alelo “salvaje” -pérdida de heterocigosidad- [117], siendo esta p53 mutada la única que se expresa y la que se detecta [118, 119].

En condiciones de agresión o daño celular (situaciones de estrés celular, como radiaciones ultravioleta, hipoxia), la proteína p53 incrementa sus niveles tanto por su activación bioquímica a través de fosforilaciones y acetilaciones [120] como aumentando la estabilidad y la vida media de la proteína, generando una respuesta que conduce o bien a una parada del ciclo celular y a la reparación del DNA dañado, o bien provoca la entrada de la célula en apoptosis [121-124], si la lesión del DNA está muy extendida. De este modo, p53 disminuye la probabilidad de que se generen clones celulares llevando defectos genéticos (mutaciones, deleciones, inversiones) y actúa como “guardián del genoma” [125].

Un gran número de tumores humanos, incluido el melanoma, tienen mutaciones y deleciones del gen p53 que resulta en una pérdida tanto de la función supresora tumoral como del control del ciclo celular [28, 126]. Se estima que el 21% de los melanomas humanos tienen mutaciones de p53 que conllevan sobreexpresión de proteína p53 [127], y en el 40% de los melanomas primarios hay una expresión anómala de p53 [128].

Dado que las mutaciones provocadas por las radiaciones UV en p53 son frecuentes en cáncer de piel [129] y que parece ser que p53 juega un papel importante en la protección contra el cáncer de piel inducido por radiación UV [28, 130] las alteraciones en la función de p53 pueden ser hechos importantes en el desarrollo del melanoma [131].

1.3.4 P16

El ciclo celular está regulado por la activación e inactivación secuencial de una serie de moléculas que incluyen un grupo de subunidades reguladoras llamadas ciclinas y otro grupo de subunidades catalíticas denominadas quinasas dependientes de ciclina (CDK).

Las ciclinas son una familia de proteínas que, como indica su nombre, son sintetizadas y destruidas durante cada ciclo celular. Las CDK se unen a ciclinas específicas y son activadas por ellas, formando una serie de complejos en determinadas fases del ciclo celular que conducen a la célula de un estado del ciclo celular a otro.

Además de esta serie de reguladores positivos del ciclo celular (ciclinas y CDK) existe una familia de reguladores negativos denominados inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (INK), que bloquean la actividad de uno o varios complejos ciclina-CDK. Entre ellas está la familia INK4. Estas proteínas inhibidoras de las CDK están implicadas en la parada del ciclo celular en respuesta a varias señales antiproliferativas como privación de factores de crecimiento, citoquinas, daño en el DNA celular, entre otras.

La familia INK4 incluye varias proteínas, entre las que se encuentra p16 (INK4A), que inhiben los complejos de ciclina/CDK que están implicados en el control de la fase G1. Su mecanismo de acción consiste en competir con las ciclinas por las subunidades catalíticas CDK.

El gen p16 o CDKN2A o MTS1 es un gen supresor de tumores localizado en 9p21 (región 21 del brazo corto del cromosoma 9). Se encuentra situado en el locus génico INK4 y codifica para una proteína de 16 kDa. La proteína p16 bloquea la actividad del complejo CDK-ciclina D (bloqueándose la transcripción de importantes proteínas reguladoras del ciclo celular y provocando el reposo del mismo) e impide que el ciclo progrese de G1 a S, es decir, inhibe la proliferación de células en condiciones normales [132]. La p16 o INK4 inactiva CDK4, compitiendo con ciclina D1 para unirse a CDK4 [133]. Se ha visto también que la proteína p16 juega un papel primordial en el control mediado de la proteína del retinoblastoma de la fase de transición de G1 a S

del ciclo celular [134]. La inactivación de la proteína p16 o bien de la proteína del retinoblastoma inclina el balance hacia la proliferación celular continuada.

El gen p16 es un gen supresor tumoral que se encuentra inactivado funcionalmente en muchos tumores, bien por mutación bien por hipermetilación del promotor. Las frecuentes mutaciones y deleciones de la p16 en líneas celulares de cáncer humano sugieren un importante papel de p16 en la carcinogénesis. En las neoplasias humanas, p16 está silenciado mediante tres posibles vías: deleción homocigota, metilación del promotor y mutación puntual, principalmente las dos primeras [135]. Sin embargo, en algunas entidades neoplásicas se describe una sobreexpresión fuerte nuclear y citoplasmática de p16.

1.3.5 BCL2

El proceso de apoptosis se encuentra rigurosamente controlado por diversos mecanismos, reguladores positivos y negativos. Los mecanismos que controlan la apoptosis son complejos e implican a varios genes, entre los que se encuentra bcl2.

El primer regulador de la apoptosis identificado en mamíferos fue el protooncogén *Bcl2* (*B-cell lymphoma 2*). La familia bcl2 está formada por un grupo de genes que codifican, por un lado, proteínas que promueven la vida (anti-apoptósicos) como bcl2, bcl-xl, bag y otros que promueven la muerte (pro-apoptósicos) como bax, bak, bcl-xs, bad.

El gen bcl2 codifica una proteína de 25 Kd localizada en las membranas mitocondriales, retículo endoplásmico y envoltura nuclear, la cual puede ser mostrada inmunohistoquímicamente en tejidos parafinados [136]. La expresión citoplasmática excesiva de la oncoproteína bcl-2 provoca la inhibición de la apoptosis, aumentando la probabilidad de generación de células cancerosas.

La familia Bcl2, aparte de en el linfoma folicular de células B, está implicada en un gran número de cánceres, incluyendo el melanoma y los carcinomas de mama, pulmón, próstata y pulmón [137]. También se cree relacionado con la resistencia a los tratamientos antitumorales convencionales.

1.3.6 MELAN A

El gen de Melan A, también denominado MART-1 codifica una proteína específica de 18kD (Melan A o MART-1) presente en las células del melanoma, que es reconocida por los linfocitos T citotóxicos autólogos [138]. Para efectuar dicho reconocimiento, las células T deben tener el receptor específico que vincula a MART-1 [139]. Se trata, por tanto, de un marcador de diferenciación melanocítica.

Basándose en este mecanismo de acción se ha sintetizado un anticuerpo específico para esta proteína, denominado asimismo Melan A o MART-1, que reconoce la fracción subcelular localizada en melanosomas y retículo endoplasmático [140, 141].

Algunos autores han descrito [142] que la disminución de la tinción inmunohistoquímica (IHQ) de este marcador (Melan A de aquí en adelante) en melanomas cutáneos indica peor pronóstico.

1.3.7 HMB45

El anticuerpo monoclonal HMB45, reconoce la proteína de la matriz del melanosoma gp 100/Pmel17/silver, una cadena lateral de oligosacáridos sensible a la neuraminidasa de un glucoconjugado presente en melanosomas inmaduros (premelanosoma) [143, 144].

Una reacción positiva para HMB45 indica formación activa de melanosomas y, en consecuencia, diferenciación melanocítica [145]. Reacciona con los melanocitos maduros y con lesiones melanocíticas (nevus, melanoma).

Su demostración inmunohistoquímica en células de melanoma maligno es de utilidad diagnóstica. Su papel como predictor de la evolución clínica permanece oscuro; sin embargo, algunos resultados apuntan su posible valor pronóstico [146, 147].

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las hipótesis de trabajo planteadas para la elaboración de esta tesis han sido las siguientes:

1.- Alguna de las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas con asiduidad en patología quirúrgica, cuando se aplica al melanoma primario cutáneo, tiene capacidad de predicción de metástasis en ganglio centinela en esta neoplasia.

2.- La realización de tinciones inmunohistoquímicas en el melanoma primario cutáneo combinado con el estudio de sus características histológicas (método histológico) y de los datos clínicos del paciente ayuda a mejorar la capacidad de predicción de metástasis en ganglio centinela.

3.- Alguna variable del método inmunohistoquímico del melanoma primario cutáneo se asocia con alguna variable histológica y/o clínica del paciente.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

El objetivo primario de este trabajo es estudiar si alguna tinción del método inmunohistoquímico aplicada al melanoma cutáneo tiene capacidad de predecir la presencia de metástasis en ganglio centinela.

2.2.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Estudiar la asociación entre sí de las diferentes variables del método inmunohistoquímico.
- Estudiar la asociación de las tinciones del método inmunohistoquímico con las variables histológicas y los datos clínicos que han demostrado mayor capacidad de predicción de metástasis de melanoma cutáneo en ganglio centinela en la literatura.
- Identificar variables inmunohistoquímicas, histológicas o clínicas en los melanomas cutáneos con índice de Breslow inferior o igual a 1,0 mm que tengan capacidad de predecir la presencia de metástasis en ganglio centinela.

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDIO Y

CARACTERÍSTICAS GENERALES

Se trata de un estudio retrospectivo de tipo analítico y observacional de pacientes diagnosticados de melanoma maligno cutáneo a los que se les realizó estudio biópsico de ganglio centinela en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebrón de Barcelona, desde Enero de 1.999 hasta Agosto de 2.005. De los 67 casos recogidos inicialmente, tras aplicar los criterios de inclusión y exclusión, la muestra sobre la que se ha realizado el estudio es de 50 casos.

A todos los pacientes se les realizó la escisión local amplia del melanoma primario con márgenes apropiados para el espesor tumoral [75, 148]. Cuarenta y cinco de las muestras extirpadas que incluían el tumor primario se remitieron al Departamento de Anatomía Patológica fijadas en formaldehído al 10%. Se procedió a pintar sus márgenes con tinta china (para facilitar su valoración posterior) y se realizaron secciones de unos 2 mm, aproximadamente, que contuvieran tanto la proliferación tumoral como los márgenes pintados previamente, procediéndose a su posterior inclusión en parafina. Los bloques de parafina de los 5 casos restantes fueron solicitados a los Servicios de Anatomía Patológica donde se diagnosticó el tumor primario. De todos ellos se realizaron cortes de unas 3 μ que se tiñeron en un teñidor automático con hematoxilina-eosina y con las tinciones inmunohistoquímicas descritas posteriormente. En las figuras se detalla, entre paréntesis, el método de tinción utilizado y los aumentos ópticos de la imagen.

Por otra parte se procedió al examen de las muestras remitidas correspondientes a ganglio centinela, tal y como se detalla posteriormente.

3.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los pacientes incluidos en este estudio cumplen los siguientes criterios:

1. Disponibilidad del bloque tisular de parafina sobre el que se ha realizado el diagnóstico de melanoma maligno.
2. Cualquier índice de Breslow.
3. Ganglios linfáticos clínicamente negativos.
4. No haber recibido tratamientos previos a la realización de la biopsia de ganglio centinela.

3.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

No se han incluido en el estudio:

1. Pacientes con melanoma localizado en mucosas o en área genital.
2. Casos de melanoma cutáneo con material insuficiente para la obtención de cortes histológicos seriados.

3.4 VARIABLES A ESTUDIO

3.4.1 DATOS CLÍNICOS

De cada paciente se han registrado las siguientes variables clínicas: sexo, edad al momento del diagnóstico y localización del tumor primario cutáneo.

La variable edad se recoge de forma continua y se distribuye en dos grupos: inferior o igual a 60 años y mayor de 60 años, es decir, los mismos que la AJCC obtuvo tras el análisis de varios factores pronósticos para predecir la supervivencia [47, 103].

Por otra parte, se establecen 3 grupos de localización anatómica: cabeza y cuello, tronco y extremidades.

Esta información clínica se ha obtenido tras la revisión de las solicitudes del estudio anatomopatológico del melanoma primario o de las historias clínicas (procedentes del archivo del hospital Vall d'Hebrón) de aquellos casos en los que no se disponía de la localización exacta.

3.4.2 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DEL MELANOMA CUTÁNEO

Las variables histológicas analizadas se han valorado de forma independiente por 2 patólogos (P.H y S.M.), sin conocimiento previo del estado del ganglio centinela, tras la tinción de hematoxilina-eosina (H-E). Se han denominado, en conjunto, MÉTODO HISTOLÓGICO, e incluyen el espesor de Breslow (medida en milímetros), el nivel de Clark (I, II, III, IV, V), la fase de crecimiento (vertical o radial), el número de mitosis por mm², el grado de infiltrado inflamatorio peritumoral, la presencia o ausencia de ulceración, de invasión vascular angiolinfática, de regresión, de neurotropismo, de microsateletosis, de afectación perianexial y de restos de nevus preexistente.

3.4.2.1 Índice de Breslow

El espesor o índice de Breslow es la medida del espesor de infiltración tumoral que se mide en sentido vertical, perpendicularmente a la superficie cutánea, desde el estrato granuloso de la epidermis hasta la parte más profunda de invasión, mediante un micrómetro ocular (Olympus BX50) (Figuras 1-3).

La medición ha obviado las áreas de infiltración a partir de los anejos.

Si la lesión está ulcerada, el espesor se mide verticalmente desde la superficie de la úlcera hasta el punto más profundo de infiltración.

De cara al análisis estadístico esta variable se ha expresado como variable continua y en forma categórica, siendo las categorías las indicadas en

el sistema de estadiaje de la AJCC: $\leq 1,0$ mm (Figura 1), 1,01-2,0 mm, 2,01-4,0 mm (Figura 2), $> 4,0$ mm (Figura 3).

3.4.2.2 Nivel de Clark

El nivel de invasión de Clark se establece en función de la profundidad de la invasión del tumor hacia las diferentes capas de la piel [38, 41].

Se han determinado los 5 niveles según su descripción original, es decir:

Nivel I. O melanoma “in situ”, donde todas las células tumorales se encuentran por encima de la membrana basal, en la epidermis.

Nivel II. Invasión de la dermis papilar por células aisladas o pequeños nidos celulares, sin expandirla.

Nivel III. El tumor ocupa la interfase entre la dermis papilar y reticular media. (Figura 4).

Nivel IV. Infiltración franca de la dermis reticular profunda.

Nivel V. Infiltración del tejido celular subcutáneo.

Por lo tanto, se ha tratado como variable ordinal distribuída en los 5 niveles antes mencionados.

3.4.2.3 Fase de crecimiento tumoral

Se trata de una variable categórica, dicotómica (2 categorías) que recoge la dirección preponderante del crecimiento neoplásico. La fase de crecimiento predominantemente radial u horizontal (Figura 5), se caracteriza por la proliferación de melanocitos neoplásicos en el espesor de la epidermis, sin invasión de dermis papilar. Por otra parte, la fase de crecimiento vertical (Figura 6) muestra proliferación de melanocitos malignos que se originan en la epidermis, con invasión de la dermis papilar, reticular y/o hipodermis.

3.4.2.4 Contaje de mitosis

Se realiza el contaje del número de mitosis por mm^2 , teniendo en cuenta que un milímetro cuadrado comprende, aproximadamente, de 4 a 5 campos de gran aumento (x400).

El método usado en este estudio para la valoración del índice mitótico tumoral es el recomendado por los participantes en el Workshop de Patología en 1.982 [149] que establecen que el número de mitosis debe ser valorado en el área donde mayor número de figuras de mitosis/mm² se observe.

Se ha tratado tanto como una variable continua como de forma categórica, estableciéndose dos categorías, una de 0 a 4 mitosis y la segunda de 5 ó más mitosis (Figura 7).

3.4.2.5 Ulceración

La ulceración se define como la ausencia de epidermis intacta sobre una porción del melanoma primario, basado en el examen microscópico de secciones histológicas [150-153] (Figura 8).

Los criterios aplicados en este estudio para definir la presencia de ulceración son los mismos que los utilizados por Spatz y cols. [131] con la combinación de las siguientes características:

- 1- defecto epidérmico de todo su espesor, incluyendo la ausencia del estrato córneo y de la capa basal,
- 2- evidencia de respuesta del huésped, es decir, depósito de fibrina, neutrófilos,
- 3- adelgazamiento, borramiento o hiperplasia reactiva de la epidermis circundante.

De esta manera se discrimina entre la ulceración debida a propiedades biológicas intrínsecas del tumor o secundaria a causas artefactuales o extrínsecas (trauma, rascado, etc) Se ha considerado como variable dicotómica según exista o no ulceración (de cualquier medida) en la tumoración.

3.4.2.6 Invasión vascular angiolinfática

Se considera la existencia de invasión vascular angiolinfática cuando, de forma inequívoca se detectan células tumorales en el interior de la luz de

estructuras vasculares localizadas en la región peritumoral, no intratumoral (Figuras 9 - 10).

Se trata de una variable dicotómica, definiéndose si se detecta o no la presencia de invasión vascular.

3.4.2.7 Presencia de infiltrado inflamatorio peritumoral

La respuesta del huésped a la enfermedad se traduce en un infiltrado inflamatorio celular de tipo linfocitario alrededor del tumor. Su gradación ha sido subjetiva, categorizando tres grupos de menor a mayor intensidad: ausencia de inflamación o presencia de escasos linfocitos peritumorales, presencia de moderada cantidad de celularidad inflamatoria y presencia de numerosos linfocitos en los límites tumorales (Figura 11).

3.4.2.8 Signos de regresión

Se considera como presencia de signos de regresión la desaparición de parte de la masa tumoral y/o la presencia de áreas de fibrosis en sustitución de las células neoplásicas desaparecidas (Figuras 12 y 13).

Se ha anotado su presencia o ausencia, es decir, de forma dicotómica.

3.4.2.9 Neurotropismo

La existencia de células neoplásicas en el espacio perineural se considera dato ineludible de la presencia de neurotropismo (Figura 14).

Se analiza su presencia o ausencia como una variable dicotómica.

3.4.2.10 Microsatelitosis

La satelitosis microscópica consiste en la presencia de agregados tumorales en dermis reticular, en tejido graso subcutáneo o en vasos, que se hallan separados de la parte principal del tumor por tejido normal y miden más de 0,05 mm de diámetro.

Su valoración se ha registrado como variable dicotómica, indicándose su presencia o ausencia.

3.4.2.11 Afectación anexial

La presencia de células neoplásicas en la zona de unión dermo-epidérmica de los anejos cutáneos se considera signo de afectación anexial. Se registra su presencia o ausencia en forma de variable dicotómica (Figura 15).

3.4.2.12 Nevus preexistente

Se ha valorado la presencia de restos de tecas de células névicas en el interior o cerca del melanoma maligno, independientemente del tipo de nevus observado (Figura 16).

Como variable dicotómica, se ha indicado su presencia o ausencia.

3.4.3 TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS DEL MELANOMA CUTÁNEO

Para la realización de las determinaciones inmunohistoquímicas se selecciona el bloque de parafina que contiene el volumen tumoral más representativo de la agresividad tumoral, es decir, donde mayor índice de Breslow se observa. Se realizan cortes seriados a 3 μ (6 de cada caso) que se montan sobre portaobjetos tratados con adhesivos tisulares para la posterior realización de la técnica inmunohistoquímica, cuya metodología común (de rutina en los laboratorios de Anatomía Patológica) a todos ellos es la siguiente:

- Desparafinización de las secciones y rehidratación con alcoholes en concentraciones decrecientes.
- Desenmascaramiento antigénico en horno microondas durante 30 minutos en buffer citrato a pH 6 (a excepción de HMB45, que no requiere desenmascaramiento).
- Inhibición de peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno (Dako S2023).

- Lavado con agua destilada.
- Incubación con el anticuerpo primario correspondiente al antígeno a identificar (ver detallado posteriormente en cada apartado).
- Lavado con buffer salino fosfato (PBS) durante 5 minutos.
- Incubación con el sistema de visualización (ENVISION DUAL LINK Dako 5027) durante 30 minutos.
- Revelado con diaminobencidina (DAB), incluido en el kit Dako 5007, durante 5 minutos.
- Contraintinción con hematoxilina de Harris durante 2 minutos. En los casos con exceso de pigmento melánico se ha utilizado contraintinción con May-Gruenwald-Giemsa durante el mismo tiempo.
- Posteriormente se deshidratan y montan con medio de montaje rápido (DPX).

Su valoración se ha realizado de forma independiente por dos patólogos (P.H y S.M.), consensuándose los resultados divergentes.

El conjunto de técnicas inmunohistoquímicas valoradas se ha denominado MÉTODO INMUNOHISTOQUÍMICO.

3.4.3.1 Índice de Ki67

El anticuerpo primario utilizado para el estudio inmunohistoquímico del índice de proliferación celular Ki67 ha sido Dako N1633 (clona MIB-1), prediluido, durante un tiempo de incubación de 10 minutos.

Se evalúa el número de células positivas (tinción nuclear) en 10 campos de gran aumento (Olympus BX50), y se expresa en porcentaje. Se ha considerado como variable continua y como variable categórica en dos grupos: $\leq 20\%$ de células positivas y $>20\%$ (Figura 17). El punto de corte del 20% se basa en estudios previamente publicados que demuestran asociación entre un índice proliferativo alto ($>20\%$) y peor evolución clínica [154-157].

3.4.3.2 Índice p53

Se ha utilizado el anticuerpo primario Dako M7001 (clona DO7), a dilución 1:25 e incubado durante 60 minutos. La presencia de núcleos positivos en la capa basal epidérmica se consideró control interno positivo.

Para la valoración de las tinciones inmunohistoquímicas de p53 se calcula el índice o histoscore de p53 a resultas de multiplicar la intensidad de la tinción con este anticuerpo (0 no-tinción, 1 tinción moderada, 2 tinción intensa) por una agrupación del porcentaje de núcleos de células teñidas en las que se asigna el valor: 1= del 1 a 25% de células positivas, 2= del 26 al 50%, 3= del 51 al 75% y 4= $\geq 76\%$. La multiplicación de los valores 0, 1 y 2 de la intensidad por 1, 2, 3 y 4 del porcentaje dan lugar a una variable ordinal con 7 posibles valores del índice de p53: 0, 1, 2 (Figura 18), 3, 4, 6, 8 [158].

3.4.3.3 Índice de p16

El anticuerpo utilizado ha sido Biocare CM020C (clona INK4a), a dilución 1:25 durante 30 minutos de incubación.

La tinción del epitelio escamoso epidérmico y de las células estromales se considera control positivo interno.

La interpretación de la tinción de p16 por inmunohistoquímica es controvertida. Algunos consideran la tinción tanto nuclear como citoplasmática específicas [159] mientras que otros argumentan que la tinción citoplasmática puede ser confundida con tinción de fondo y sólo consideran la tinción nuclear como relevante para la función de p16 [160-162].

En nuestro estudio consideramos la tinción para p16 tanto nuclear como citoplasmática, como previamente otros autores habían referido [159]. Se valora el porcentaje de células teñidas, es decir como variable continua y como variable dicotómica en dos grupos (similares a los establecidos en la tinción nuclear de ki67), correspondientes a casos con inmunotinción de $\leq 20\%$ o bien superior a dicho porcentaje (Figura 19).

3.4.3.4 Índice de bcl2

Se ha utilizado el anticuerpo Biogenex MU-287-UC (clona 100), a dilución 1:100, con tiempo de incubación de 30 minutos.

Su inmunotinción es citoplasmática, valorándose el porcentaje de células teñidas, es decir tratándola como variable continua. Asimismo se investigó su posible agrupación en dos apartados correspondientes a melanomas con tinción de las células neoplásicas menor o igual al 50% o bien con positividad superior a dicho porcentaje (Figura 20).

La positividad de las células linfoides circundantes sirvió de control interno positivo.

3.4.3.5 Índice de Melan A

El anticuerpo utilizado ha sido Biogenex MU-361-UC (clon A 103), a dilución 1:50, tiempo de incubación de 30 minutos.

La tinción citoplasmática se ha cuantificado en porcentaje de celularidad neoplásica positiva (%). Al igual que las otras tinciones citoplasmáticas se estudia su posible agrupación en dos grupos, que son $\leq 50\%$ y $> 50\%$ (Figura 21).

3.4.3.6 Índice de HMB45

Es la única técnica inmunohistoquímica que no ha requerido desenmascaramiento antigénico previo a la incubación del anticuerpo Dako M-0634 (clon HMB45), dilución 1:300, tiempo de incubación de 30 minutos.

Al igual que bcl2 y Melan A, su tinción citoplasmática se ha valorado tanto como variable continua en porcentaje (%) como dicotómica en dos categorías ($\leq 50\%$ y $> 50\%$) (Figura 22).

3.4.4 GANGLIO CENTINELA

Se administran 4 inyecciones intradérmicas alrededor de la tumoración primaria de un radiofármaco que, en nuestro caso, es el ^{99m}Tc -sulfuro coloidal (nanocoloide: *Nanocol*®). Se realiza una linfogammagrafía para obtener las imágenes de los sectores de drenaje linfático en proyección anterior, posterior, lateral y/o oblicua, siendo aconsejable tapar la zona tumoral de la inyección con un plomo [163-165]. A diferencia de otros autores [80, 166], en nuestro estudio no hemos usado de forma combinada el coloide sulfuro radionivelado junto con el colorante azul.

Para el marcaje del ganglio centinela, se localiza sobre la piel con un rotulador persistente en la localización aproximada. Con una fuente puntiforme de ^{57}Co o de ^{99m}Tc (pequeño punto de algodón con una microgota de tecnecio, localizado en la punta de una funda de aguja, y ésta colocada dentro de un guante de plástico no estéril):

-Se marca con un punto la proyección del ganglio centinela en la piel en las detecciones anterior y lateral.

-Se marca con una cruz rodeada por un círculo la proyección del ganglio centinela a piel en la detección oblicua.

La distancia entre los dos puntos y la cruz informa sobre la profundidad del ganglio centinela.

En el momento de la intervención quirúrgica se rastrea el campo operatorio con la sonda de detección manual, localizando el o los ganglios centinelas para su extirpación y estudio biopsico. Se registran las medidas de contaje obtenidas con la sonda manual sobre el/los ganglios centinelas y sobre el resto de los ganglios evaluados intraoperatoriamente.

Tras el aislamiento del/los ganglios centinelas se remiten en formaldehído (formol al 10%) al Servicio de Anatomía Patológica donde se enumeran y miden. Si el ganglio tiene una dimensión máxima de 5 mm, se secciona por la mitad, incluyéndose ambas partes en un mismo bloque tisular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Si su tamaño es superior a 5 mm, se realizan secciones transversales de 2 mm de espesor y se incluye la totalidad de la muestra seccionada en tantos bloques tisulares como sea necesario. En el Consenso de Augsburgo de 1.999 se acordaron los estándares fundamentales de las técnicas histológicas a aplicar a la biopsia de ganglio centinela. De cada bloque tisular se han de realizar secciones histológicas seriadas de 3-4 μ , profundizando 100-500 μ entre cada una. Se tiñen, en un teñidor automático, con Hematoxilina-eosina (H-E) y se reservan dos secciones sin teñir para, en caso de duda o de necesitar confirmación ante células sospechosas de metástasis, realizar tinciones de inmunohistoquímica con HMB45. Una vez finalizado el procesamiento de la/las muestras se procede a su valoración microscópica informándose la existencia o ausencia de células neoplásicas de melanoma maligno en el parénquima ganglionar.

De esta manera, la variable concerniente al ganglio centinela se considera como dicotómica según sea el estudio histológico positivo (Figuras 23-25) o negativo para células neoplásicas de melanoma.

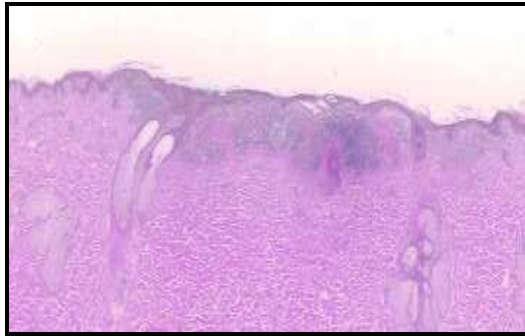


Figura 1: Melanoma maligno cutáneo con Índice de Breslow $\leq 1,0$ mm (H-Ex100)

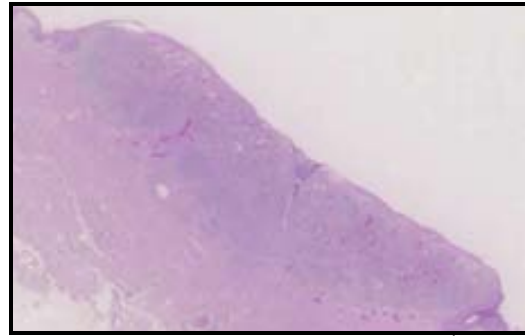


Figura 2: Melanoma maligno cutáneo con Índice de Breslow 2,01-4,0 mm (H-Ex100).

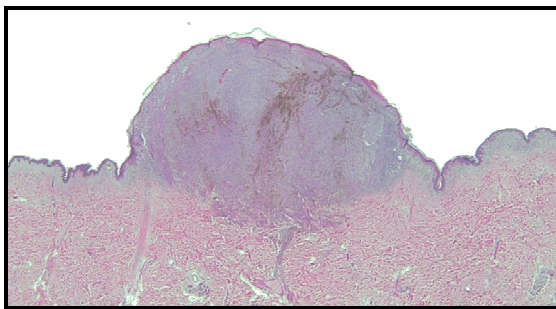


Figura 3: Melanoma maligno cutáneo con Índice de Breslow $>4,0$ mm (H-Ex100).

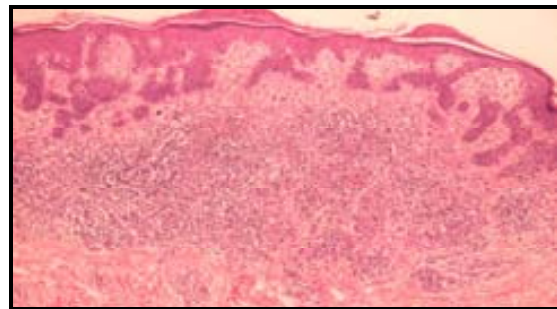


Figura 4: Melanoma maligno cutáneo con Nivel de Clark III (H-Ex200).

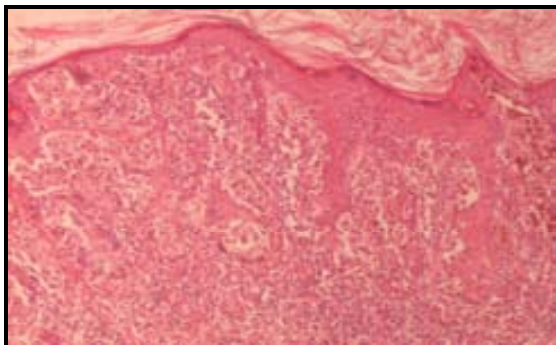


Figura 5: Melanoma maligno cutáneo en fase de crecimiento horizontal (H-Ex200).

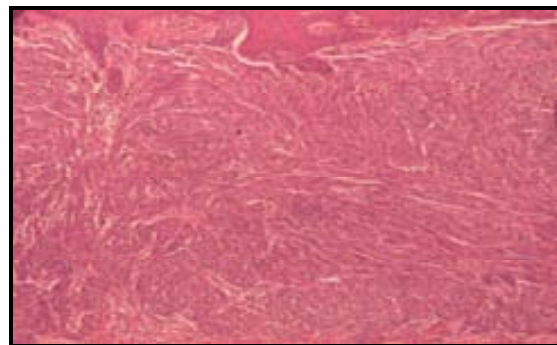


Figura 6: Melanoma maligno cutáneo en fase de crecimiento vertical (H-Ex200).

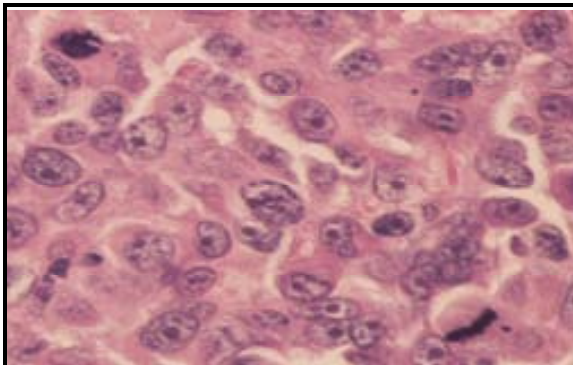


Figura 7: Melanoma maligno cutáneo con índice mitótico $\geq 5/\text{mm}^2$ (H-Ex400).

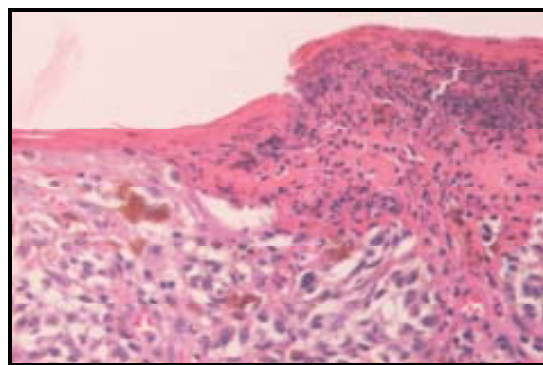


Figura 8: Melanoma maligno cutáneo con presencia de ulceración (H-Ex200).

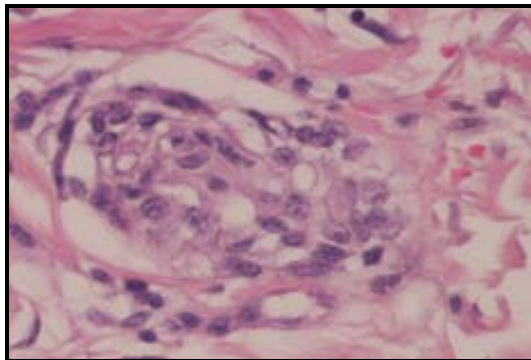


Figura 9: Melanoma maligno cutáneo con presencia de invasión vascular angiolinfática (H-Ex400).

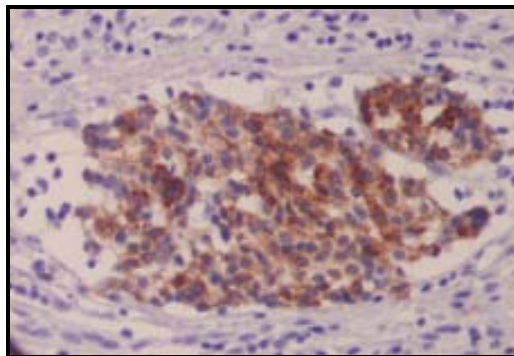


Figura 10: Melanoma maligno cutáneo con presencia de invasión vascular angiolinfática (Melan Ax400).

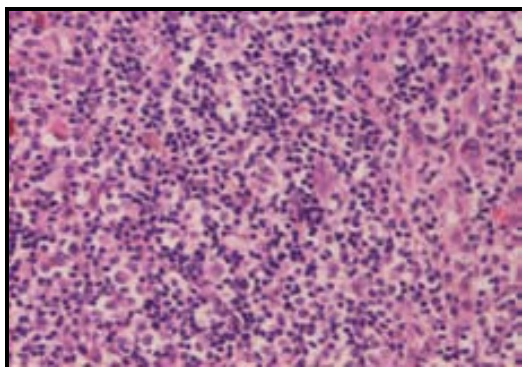


Figura 11: Melanoma maligno cutáneo con infiltrado inflamatorio marcado (H-Ex200).

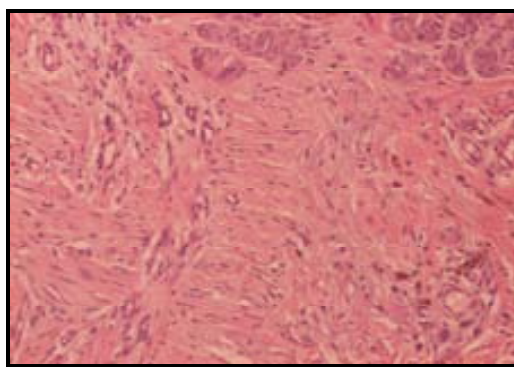


Figura 12: Melanoma maligno cutáneo con signos de regresión (H-Ex200).

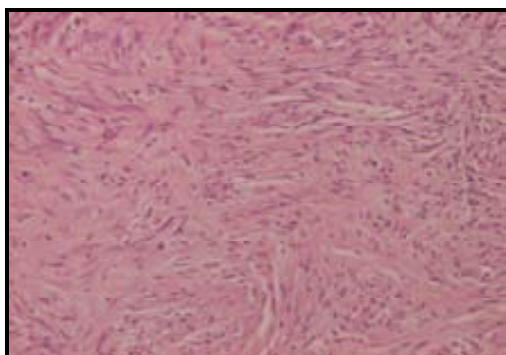


Figura 13: Melanoma maligno cutáneo con signos de regresión (H-Ex200).

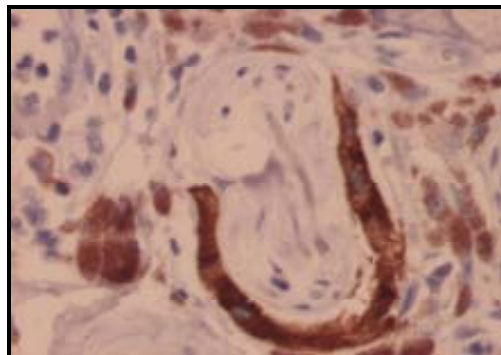


Figura 14: Melanoma maligno cutáneo con presencia de neurotropismo (H-Ex400).

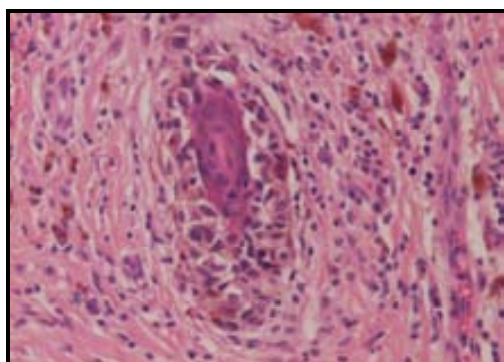


Figura 15: Melanoma maligno cutáneo con presencia de afectación anexial (H-Ex400).

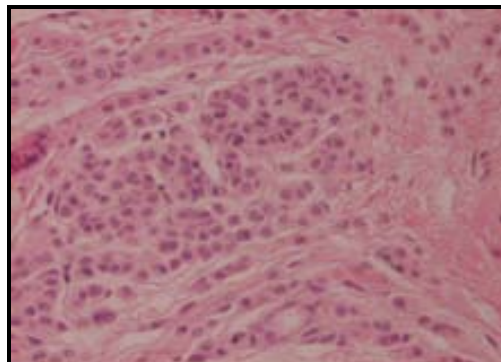


Figura 16: Melanoma maligno cutáneo con presencia de restos de nevus (H-Ex400).

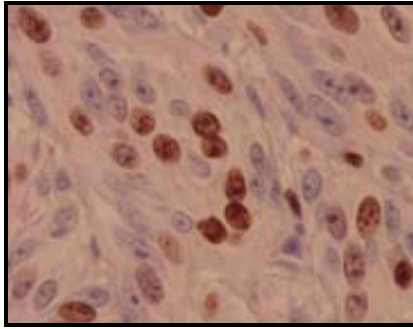


Figura 17: Melanoma maligno cutáneo con porcentaje de ki67 > 20% (ki67x400).

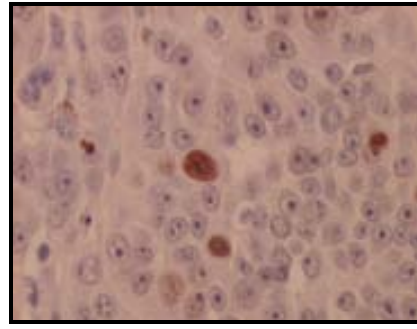


Figura 18: Melanoma maligno cutáneo con Índice de p53 igual a 2 (p53x400).

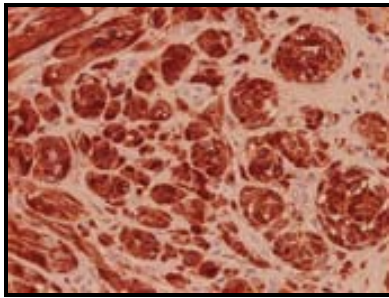


Figura 19: Melanoma maligno cutáneo con porcentaje de p16 >20% (p16x200).

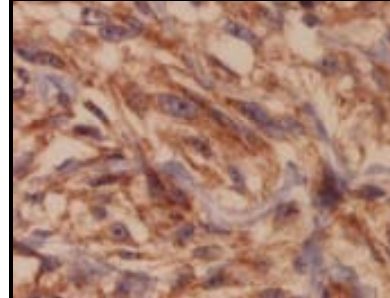


Figura 20: Melanoma maligno cutáneo con porcentaje de bcl2 >50% (bc12x400).

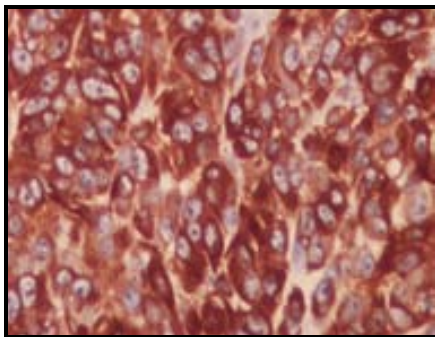


Figura 21: Melanoma maligno cutáneo con porcentaje de Melan A >50% (Melan Ax400).

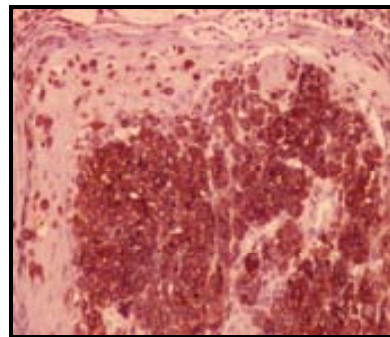


Figura 22: Melanoma maligno cutáneo con porcentaje de HMB45 >50% (HMB45x200).

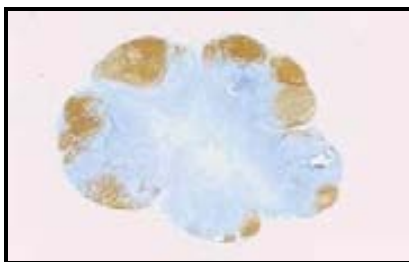
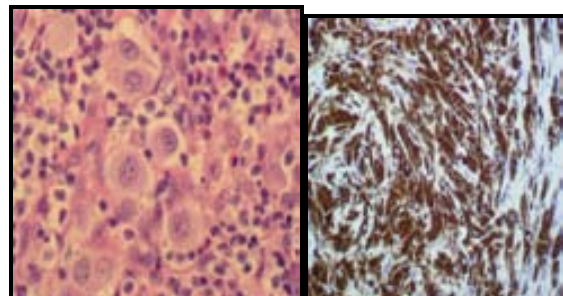


Figura 23: Ganglio centinela con metástasis de melanoma maligno (HMB45x25).



Figuras 24 y 25: Ganglio centinela con metástasis de melanoma maligno (H-Ex400) (HMB45x200)

3.5 ANALISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se ha realizado con el paquete estadístico SPSS versión 13.

Se realiza un análisis descriptivo de todas las variables valoradas en el estudio, tanto del método histológico como inmunohistoquímico. En aquellas variables que se han recogido de forma continua (edad, índice de Breslow, número de mitosis, tinciones inmunohistoquímicas) se calcula la media (M) y desviación estándar (DE), mientras que en el resto (categóricas) la expresión de los resultados se realiza mediante la anotación del número de casos observados (N) y su porcentaje (%).

La asociación entre variables continuas u ordinales se analiza mediante el coeficiente de correlación de Spearman.

La asociación entre una variable continua u ordinal y otra categórica de tipo dicotómico se estudia con la U de Mann-Whitney. Si esta segunda variable tiene más de dos categorías, se aplica el test de Kruskal-Wallis.

La asociación entre variables categóricas entre sí se analiza mediante el análisis de las tablas de contingencia y el test de la probabilidad exacta de Fisher.

Para analizar la magnitud de la asociación entre las variables consideradas como probables predictoras y la presencia o ausencia de metástasis en ganglio centinela se utiliza la regresión logística no condicional, expresándose los resultados en forma de oportunidad relativa (OR), "odds ratio" en terminología anglosajona, e intervalo de confianza (IC 95%).

Para analizar el poder explicativo de diferentes modelos de regresión logística se emplea el Índice de Nagelkerke, que se interpreta como la proporción de varianza explicada por el modelo. La selección del mejor modelo se realiza mediante un método automático paso a paso ("stepwise").

Todos los análisis y asociaciones se estudian en el conjunto de los melanomas y, también, de forma restringida en el subgrupo de melanomas con Índice de Breslow inferior o igual a 1,0 mm.

Todas las pruebas estadísticas corresponden a pruebas bilaterales, fijándose el nivel de significación estadística en $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ANALISIS DESCRIPTIVO

Se realiza el análisis descriptivo de las diferentes variables incluidas en este estudio en los 50 casos referentes a:

DATOS CLÍNICOS (TABLA 1):

- ❖ Distribución por edad.
- ❖ Distribución por sexo.
- ❖ Localización anatómica de la tumoración cutánea primaria.

CARACTERES HISTOLÓGICOS (método histológico) (TABLA 2):

- ❖ Índice de Breslow (en mm).
- ❖ Nivel de Clark.
- ❖ Fase de crecimiento.
- ❖ Tipo de melanoma.
- ❖ Contaje del número de mitosis (por mm²).
- ❖ Presencia o ausencia de ulceración.
- ❖ Presencia o ausencia de invasión angiolinfática vascular.
- ❖ Grado de inflamación acompañante.
- ❖ Presencia o ausencia de signos de regresión.
- ❖ Presencia o ausencia de neurotropismo.
- ❖ Presencia o ausencia de lesiones satélites.
- ❖ Presencia o ausencia de afectación anexial.
- ❖ Presencia o ausencia de restos de nevus preexistente.
- ❖ Presencia o ausencia de metástasis en ganglio centinela.

RESULTADOS

RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS (método inmunohistoquímico)
(TABLA 4):

- ❖ Índice de proliferación celular (ki67).
- ❖ Índice de p53.
- ❖ p16.
- ❖ bcl2.
- ❖ Melan A.
- ❖ HMB45.

La TABLA 1 presenta la descripción de la población a estudio, observándose que la distribución por sexos ha sido equitativa, de manera que el 50% de la muestra estudiada son hombres y la otra mitad mujeres, proporción bastante similar a la que ocurre cuando la variable edad se distribuye en los dos grupos establecidos, es decir, pacientes con edad menor o igual a 60 años (52%) y mayores de dicha edad (48%). Por otra parte, las localizaciones más frecuentes del melanoma cutáneo primario son tronco (50%) y extremidades (40%), correspondiendo el 10% restante a lesiones de cabeza y cuello.

TABLA 1. Datos clínicos de la población a estudio.

	N (%)
Sexo	
Hombre	25 (50)
Mujer	25 (50)
Edad (en años)*	55,7 (16,9)
≤ 60 años	26 (52)
> 60 años	24 (48)
Localización	
Cabeza y cuello	5 (10)
Tronco	25 (50)
Extremidades	20 (40)

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

*Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

RESULTADOS

En la TABLA 2 se presentan los resultados correspondientes a las variables histológicas estudiadas en la muestra, así como los datos correspondientes al estado del ganglio centinela.

TABLA 2. Características histológicas del melanoma cutáneo (método histológico) y de la valoración del ganglio centinela.

	N (%)		N (%)
Fase de crecimiento		Invasión vascular angiolinfática	
Horizontal	7 (14)	Sí	5 (10)
Vertical	43 (86)	No	45 (90)
Nº de mitosis (por mm ²)		Signos de regresión	
0-4	31 (62)	Sí	21 (42)
≥ 5	19 (38)	No	29 (58)
Ulceración		Afectación anexial	
Sí	9 (18)	Sí	17 (34)
No	41 (82)	No	33 (66)
Índice de Breslow (en mm)		Tipo de melanoma	
≤ 1,0 mm	13 (26)	Extensión superficial	34 (68)
1,01-2.0 mm	15 (30)	Nodular	13 (26)
2,01-4,0 mm	17 (34)	Lentigo maligno	2 (4)
> 4,0 mm	5 (10)	Lentiginoso acro	1 (2)
Neurotropismo		Microsatelitosis	
Sí	1 (2)	Sí	0 (0)
No	49 (98)	No	50 (100)
Grado de inflamación		Nivel de Clark	
Ausente-leve	30 (60)	I	0 (0)
Moderada	16 (32)	II	7 (14)
Marcada	4 (8)	III	37 (74)
		IV	4 (8)
		V	2 (4)
Restos de nevus		Metástasis en ganglio centinela	
Sí	11 (22)	Sí	14 (28)
No	39 (78)	No	36 (72)

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje).

La muestra estudiada (TABLA 2) incluye casos de melanoma cutáneo primario de cualquier índice de Breslow, si bien la mayoría se encuentran entre 1,0 y 4,0 mm (64%) de espesor, siendo destacable la presencia de un 26% de casos de melanoma delgado ($\leq 1,0$ mm). En dos tercios de los melanomas las figuras de mitosis fueron inferiores o iguales a 4 por mm^2 (TABLA 3), donde además se indican los valores de la media, la desviación estándar, el mínimo y el máximo de esta variable y del índice de Breslow.

TABLA 3. Características histológicas del melanoma cutáneo. Valores del índice de Breslow y del número de mitosis.

	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Índice de Breslow (en mm)	2,2	1,6	0,3	7,3
Nº de mitosis (por mm^2)	3,8	3,2	1,0	12,0

La mayor parte de los tumores (TABLA 2) se encuentran en fase de crecimiento vertical (86%), correspondiendo fundamentalmente a los tipos de melanoma de extensión superficial (68%) y de melanoma nodular (26%). En general son pocos los casos que presentan signos de ulceración (18%), de invasión vascular angiolinfática (10%) y de afectación anexial (34%) o neural (2%), no identificándose ningún caso en la categoría I de nivel de Clark ni con presencia de microsatelitosis.

En lo referente a la presencia o no de metástasis de melanoma en la/s muestra/s estudiada/s del ganglio centinela, sólo en el 28% de los casos incluidos en el estudio se detecta la presencia de diseminación tumoral a dicho/s ganglio/s (TABLA 2).

RESULTADOS

TABLA 4. Resultados de las variables del método inmunohistoquímico.

	N (%)	M (DE)	Mínimo	Máximo
ki67 (porcentaje)		20,4 (20,9)	1	78
≤ 20%	34 (68)			
> 20%	16 (32)			
Índice p53		--	--	--
0	15 (30)			
1	24 (48)			
2	11 (22)			
≥ 3	0 (0)			
p16 (porcentaje)		41,7 (35,9)	1	96
≤ 20%	23 (46)			
> 20%	27 (54)			
bcl2 (porcentaje)		61,7 (29,1)	0	99
≤ 50%	16 (32)			
> 50%	34 (68)			
Melan A (porcentaje)		63,2 (25,4)	11	100
≤ 50%	16 (32)			
> 50%	34 (68)			
HMB45 (porcentaje)		46,9 (26,9)	1	99
≤ 50%	29 (58)			
> 50%	21 (42)			

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), así como media (M) y (desviación estándar-DE).

En la TABLA 4 se muestran los datos obtenidos del estudio inmunohistoquímico. En el 68% de los casos el valor de ki67 es inferior o igual al 20%. El bcl2 y el Melan A muestran una inmunopositividad superior al 50% en dos tercios de los casos (68%). No se ha encontrado ningún caso de melanoma con índice de p53 superior o igual a 3, destacando que en el 30% dicho parámetro fue de 0. Por otra parte, el 54% de los casos tienen p16 superior al 20% y el 58% demuestran inmunotinción para HMB45 inferior o igual al 50%.

4.2 ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES

En este apartado se estudia la posible relación existente entre las diferentes variables evaluadas en nuestro estudio (datos clínicos, método histológico y método inmunohistoquímico).

4.2.1 ASOCIACIÓN ENTRE DATOS CLÍNICOS

TABLA 5. Asociación de variables clínicas entre sí.

	Edad (en años)			P	Sexo		P
	M (DE)*	≤60 (N=26) N (%)	>60 (N=24) N (%)		Mujer N (%)	Hombre N (%)	
Sexo				0,064 ^a			
Mujer (N=25)	51,7 (17,1)	17 (65)	8 (33)	0,046 ^b			
Hombre (N=25)	59,8 (16,1)	9 (35)	16 (67)				
Localización				0,087 ^c			
Cabeza y cuello	58,8 (20,4)	2 (12)	3 (8)	0,332 ^b	3 (12)	2 (8)	<0,001 ^b
Tronco	60,2 (14,7)	11 (24)	14 (76)		6 (24)	19 (76)	
Extremidades	49,4 (17,6)	13 (64)	7 (16)		16 (64)	4 (16)	

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

*Las cantidades corresponden a media (M) y (desviación estándar-DE).

P = grado de significación estadística. ^a U de Mann Whitney. ^b Test de probabilidad exacta de Fisher. ^c Test de Kruskal Wallis.

Se observa (TABLA 5) la asociación estadísticamente significativa entre el sexo y la localización del melanoma, de manera que en las mujeres se localiza el melanoma, principalmente, en las extremidades y los hombres, en el tronco. Además destaca que la mayoría de los pacientes con edad inferior o igual a 60 años son mujeres.

4.2.2 ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES HISTOLÓGICAS

Las tablas siguientes (TABLAS 6 - 14) resumen la asociación entre las variables histológicas estudiadas.

TABLA 6. Asociación entre variables continuas u ordinales del método histológico.

	Nº de Mitosis	Nivel de Clark	Grado de inflamación
Índice de Breslow	0,712 (<0,001)	0,451 (0,001)	-0,266 (0,062)
Nº de Mitosis	--	0,286 (0,044)	-0,085 (0,556)
Nivel de Clark	--	--	-0,004 (0,978)

Los resultados corresponden al coeficiente de correlación de Spearman y (grado de significación estadística).

En la TABLA 6 se aprecia que las variables índice de Breslow, nivel de Clark y número de mitosis se asocian de forma estadísticamente significativa entre ellas, de manera que un aumento del índice de Breslow del melanoma se asocia con un mayor número de mitosis y con el nivel de Clark más elevado. Sin embargo, el grado de inflamación no está asociado a ninguna de las tres variables anteriormente mencionadas.

La fase de crecimiento muestra (TABLA 7) asociación estadísticamente significativa con el índice de Breslow, con el nivel de Clark, con el tipo de melanoma y con el número de mitosis, no existiendo asociación con el resto. En la fase de crecimiento vertical el valor medio del índice de Breslow es de 2,4 mm siendo de 1,3 mm en los melanomas en la fase de crecimiento horizontal. El número de mitosis en la fase de crecimiento vertical es de 4,3 por mm² de promedio, mientras que en la fase de crecimiento horizontal es de 1,3 mitosis por mm². La mayor parte (71%) de los melanomas en fase de crecimiento horizontal están en un nivel II de Clark y son de tipo extensión superficial, no presentando ninguno signos de ulceración, de invasión

angiolímfática ni de neurotropismo. El 81% de los melanomas en fase de crecimiento vertical tienen un nivel III de Clark, no estando ninguno incluido en los tipos de melanoma acral ni de lentigo maligno.

RESULTADOS

TABLA 7. Asociación entre fase de crecimiento y resto de variables del método histológico.

	Horizontal (N=7) N (%)	Vertical (N=43) N (%)	P
Índice de Breslow*	1,3 (1,3)	2,4 (1,6)	0,027 ^a
Nivel de Clark			
II	5 (71)	2 (5)	0,022 ^a
III	2 (29)	35 (81)	
IV	0 (0)	4 (9)	
V	0 (0)	2 (5)	
Tipo de Melanoma			
Extensión superficial	4 (57)	30 (70)	0,002 ^b
Nodular	0 (0)	13 (30)	
Lentigo maligno	2 (29)	0 (0)	
Lentiginoso acro	1 (14)	0 (0)	
Nº de Mitosis*	1,3 (0,5)	4,3 (3,3)	0,008 ^a
Ulceración			
Sí	0 (0)	9 (21)	0,322 ^b
No	7 (100)	34 (79)	
Invasión angiolinfática			
Sí	0 (0)	5 (12)	1,000 ^b
No	7 (100)	38 (88)	
Grado de inflamación			
Ausente-leve	5 (71)	25 (58)	0,928 ^a
Moderada	2 (29)	14 (33)	
Marcada	0 (0)	4 (9)	
Signos de regresión			
Sí	3 (43)	18 (42)	0,706 ^b
No	4 (57)	25 (58)	
Neurotropismo			
Sí	0 (0)	1 (2)	1,000 ^b
No	7 (100)	42 (98)	
Afectación Anexial			
Sí	4 (57)	13 (30)	0,102 ^b
No	3 (43)	30 (70)	
Restos de nevus			
Sí	1 (14)	10 (23)	1,000 ^b
No	6 (86)	33 (77)	

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

*Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

P = grado de significación estadística. ^aU de Mann Whitney. ^bTest de probabilidad exacta de Fisher.

El tipo de melanoma presenta asociación positiva y estadísticamente significativa con el índice de Breslow y con el nivel de Clark (TABLA 8). Los casos de melanoma tipo lentigo maligno y lentiginoso acro tienen un valor medio del índice de Breslow de 0,9 mm en el primero y de 0,7 mm en el segundo, no existiendo ningún caso en nuestra serie que tenga ulceración ni invasión vascular. El melanoma tipo nodular tiene un valor medio del índice de Breslow de 3,3 mm, destacando que sólo un caso presentó signos de invasión angiolinfática y que el único caso de nuestro estudio con neurotropismo pertenece a esta categoría. Los melanomas tipo extensión superficial presentan un valor medio del espesor de Breslow de 1,9 mm y en la mitad de los casos se observan signos de regresión.

Además, el tipo de melanoma se asocia (TABLA 8), aunque no de manera estadísticamente significativa, con el número de mitosis y el componente inflamatorio. Los casos de melanoma tipo nodular tienen una media del número de mitosis de 5,6 por mm², muy superior a los melanomas de tipo lentigo maligno y lentiginoso acro cuyo valor medio es de 1,0 mitosis por mm² y a los de tipo extensión superficial con 3,4 mitosis por mm².

La presencia de signos de ulceración (TABLA 9) se asocia de forma estadísticamente significativa con el índice de Breslow y con el número de mitosis, de manera que en melanomas ulcerados el valor medio del espesor de Breslow es de 3,2 mm y el número de mitosis de 7,6 por mm², mientras que en las lesiones sin ulceración el índice de Breslow es de 1,9 mm de media y las mitosis por mm² de 3,0. Con el resto de variables del método histológico no se aprecian asociaciones.

RESULTADOS

TABLA 8. Asociación entre tipo de melanoma y resto de variables del método histológico.

	Extensión Superficial (N=34) N (%)	Nodular (N=13) N (%)	Lentigo maligno (N=2) N (%)	Lentiginoso acro (N=1) N (%)	P
Índice de Breslow*	1,9 (1,4)	3,3 (1,7)	0,9 (0,6)	0,7 (·)	0,005 ^a
Nivel de Clark					
II	4 (12)	1 (8)	2 (100)	1 (100)	0,036 ^a
III	28 (82)	8 (61)	0 (0)	0 (0)	
IV	1 (3)	3 (23)	0 (0)	0 (0)	
V	1 (3)	1 (8)	0 (0)	0 (0)	
Nº de Mitosis*	3,4 (2,9)	5,6 (3,5)	1,0 (0,0)	1,0 (·)	0,056 ^a
Ulceración					
Sí	6 (18)	3 (23)	0 (0)	0 (0)	0,833 ^b
No	28 (82)	10 (77)	2 (100)	1 (100)	
Invasión angiolinfática					
Sí	4 (12)	1 (8)	0 (0)	0 (0)	1,000 ^b
No	30 (88)	12 (92)	2 (100)	1 (100)	
Grado de inflamación					
Ausente-leve	16 (47)	11 (85)	2 (100)	1 (100)	0,063 ^a
Moderada	14 (41)	2 (15)	0 (0)	0 (0)	
Marcada	4 (12)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Signos de regresión					
Sí	17 (50)	3 (23)	1 (50)	0 (0)	0,257 ^b
No	17 (50)	10 (70)	1 (50)	1 (100)	
Neurotropismo					
Sí	0 (0)	1 (8)	0 (0)	0 (0)	1,000 ^b
No	34 (100)	12 (92)	2 (100)	1 (100)	
Afectación anexial					
Sí	11 (32)	3 (23)	2 (100)	1 (100)	0,078 ^b
No	23 (68)	10 (77)	0 (0)	0 (0)	
Restos de nevus					
Sí	9 (27)	1 (8)	1 (50)	0 (0)	0,268 ^b
No	25 (73)	12 (92)	1 (50)	1 (100)	

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

*Las cantidades corresponden a media (M) y desviación estándar (DE).

P = grado de significación estadística. ^a Test de Kruskal Wallis. ^b Test de probabilidad exacta de Fisher.

TABLA 9. Asociación entre presencia / ausencia de ulceración y resto de variables del método histológico.

	Presencia (N=9) N (%)	Ausencia (N=41) N (%)	P
Índice de Breslow*	3,2 (1,8)	1,9 (1,5)	0,026^a
Nivel de Clark			
II	2 (22)	5 (12)	0,637^a
III	6 (67)	31 (76)	
IV	1 (11)	3 (7)	
V	0 (0)	2 (5)	
Nº de Mitosis*	7,6 (3,5)	3,0 (2,6)	<0,001^a
Invasión angiolinfática			
Sí	2 (22)	3 (7)	0,216^b
No	7 (78)	38 (93)	
Grado de inflamación			
Ausente-leve	5 (56)	25 (61)	0,673^a
Moderada	3 (33)	13 (32)	
Marcada	1 (11)	3 (7)	
Signos de regresión			
Sí	3 (33)	18 (44)	0,716^b
No	6 (67)	23 (56)	
Neurotropismo			
Sí	0 (0)	1 (2)	1,000^b
No	9 (100)	40 (98)	
Afectación anexial			
Sí	3 (33)	14 (34)	1,000^b
No	6 (67)	27 (66)	
Restos de nevus			
Sí	1 (11)	10 (24)	0,662^b
No	8 (89)	31 (76)	

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

*Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

P = grado de significación estadística. ^aU de Mann Whitney. ^bTest de probabilidad exacta de Fisher.

RESULTADOS

La invasión de células de melanoma a nivel vascular angiolinfático (TABLA 10) muestra una asociación estadísticamente significativa únicamente con el índice de Breslow, de manera que los melanomas con permeación neoplásica vascular tienen un valor medio del índice de Breslow de 4,0 mm, más del doble del observado en los casos sin invasión vascular.

TABLA 10. Asociación entre presencia / ausencia de invasión vascular angiolinfática y resto de variables del método histológico

	Presencia (N=5) N (%)	Ausencia (N=45) N (%)	P
Índice de Breslow*	4,0 (2,0)	1,9 (1,4)	0,015^a
Nivel de Clark			
II	1 (20)	6 (13)	0,975^a
III	3 (60)	34 (76)	
IV	1 (20)	3 (7)	
V	0 (0)	2 (4)	
Nº de Mitosis*	5,2 (3,6)	3,7 (3,2)	0,296^a
Grado de inflamación			
Ausente-leve	3 (60)	27 (60)	0,975^a
Moderada	2 (40)	14 (31)	
Marcada	0 (0)	4 (9)	
Signos de regresión			
Sí	3 (60)	18 (40)	0,638^b
No	2 (40)	27 (60)	
Neurotropismo			
Sí	1 (20)	0 (0)	0,100^b
No	4 (80)	45 (100)	
Afectación anexial			
Sí	3 (60)	14 (31)	0,321^b
No	2 (40)	31 (69)	
Restos de nevus			
Sí	1 (20)	10 (22)	1,000^b
No	4 (80)	35 (78)	

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

*Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

P = grado de significación estadística. ^a U de Mann Whitney. ^b Test de probabilidad exacta de Fisher.

La presencia o ausencia de signos de regresión (TABLA 11) y de afectación anexial (TABLA 12) no muestran asociación destacable con ninguna de las restantes variables del método histológico.

TABLA 11. Asociación entre presencia / ausencia de signos de regresión y resto de variables del método histológico.

	Presencia (N=21) N (%)	Ausencia (N=29) N (%)	P
Índice de Breslow*	2,3 (1,9)	2,2 (1,3)	0,623 ^a
Nivel de Clark			
II	3 (14)	4 (14)	0,711 ^a
III	16 (76)	21 (72)	
IV	2 (10)	2 (7)	
V	0 (0)	2 (7)	
Nº de Mitosis*	3,1 (3,0)	4,3 (3,3)	0,181 ^a
Grado de inflamación			
Ausente-leve	9 (43)	21 (72)	0,097 ^a
Moderada	9 (43)	7 (24)	
Marcada	3 (14)	1 (4)	
Neurotropismo			
Sí	1 (5)	0 (0)	0,420 ^b
No	20 (95)	29 (100)	
Afectación anexial			
Sí	6 (29)	11 (38)	0,557 ^b
No	15 (71)	18 (62)	
Restos de nevus			
Sí	5 (24)	6 (21)	1,000 ^b
No	16 (76)	23 (79)	

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

*Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

P = grado de significación estadística. ^aU de Mann Whitney. ^bTest de probabilidad exacta de Fisher.

RESULTADOS

TABLA 12. Asociación entre presencia / ausencia de afectación aneural y resto de variables del método histológico.

	Presencia (N=17) N (%)	Ausencia (N=33) N (%)	P
Índice de Breslow*	2,1 (1,4)	2,3 (1,7)	0,774 ^a
Nivel de Clark			
II	3 (18)	4 (12)	0,852 ^a
III	11 (65)	26 (79)	
IV	2 (12)	2 (6)	
V	1 (5)	1 (3)	
Nº de Mitosis*	3,0 (2,3)	4,3 (3,6)	
Grado de inflamación			
Ausente-leve	10 (59)	20 (61)	0,800 ^a
Moderada	6 (35)	10 (30)	
Marcada	1 (6)	3 (9)	
Restos de nevus			
Sí	4 (24)	7 (21)	1,000 ^b
No	13 (76)	26 (79)	

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

*Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

P = grado de significación estadística. ^aU de Mann Whitney. ^bTest de probabilidad exacta de Fisher.

TABLA 13. Asociación entre presencia / ausencia de restos de nevus y resto de variables del método histológico.

	Presencia (N=11) N (%)	Ausencia (N=39) N (%)	P
Índice de Breslow*	2,3 (1,2)	2,2 (1,7)	0,399
Nivel de Clark			
II	2 (18)	5 (13)	0,241
III	9 (82)	28 (72)	
IV	0 (0)	4 (10)	
V	0 (0)	2 (5)	
Nº de Mitosis*	3,3 (2,7)	4,0 (3,4)	
Grado de inflamación			
Ausente-leve	7 (64)	23 (59)	0,494
Moderada	4 (36)	12 (31)	
Marcada	0 (0)	4 (10)	

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

* Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

P = grado de significación estadística. U de Mann Whitney.

El único caso en nuestra serie, con invasión del espacio perineural tiene un índice de Breslow de 7,1 mm, está en un nivel III de Clark, y tiene un valor de 9,0 mitosis por mm², no estando asociada con ninguna otra variable del método histológico.

La mayor parte de los casos de melanoma con afectación de los anejos cutáneos (TABLA 12) están en un nivel III de Clark, no presentan restos de nevus y el componente inflamatorio asociado es leve o ausente. Pero, al igual que la variable correspondiente a la presencia o ausencia de restos de nevus en el seno del melanoma (TABLA 13) tampoco existe asociación estadísticamente significativa con el resto de variables del método histológico.

4.2.3 ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS

La asociación entre las seis variables inmunohistoquímicas testadas en este estudio queda expuesta en la TABLA 14. Las únicas asociaciones directas y estadísticamente significativas son las observadas entre HMB45 con bcl2 (P=0,001) y con Melan A (P=0,028), de manera que un mayor porcentaje de tinción del melanoma cutáneo para HMB45 se acompaña de mayor inmunotinción de la lesión para Melan A y para bcl2.

TABLA 14. Asociación entre variables del método inmunohistoquímico entre sí.

	Índice p53	p16	bcl2	Melan A	HMB45
ki67	0,261 (0,067)	-0,179(0,214)	0,037 (0,797)	0,035 (0,809)	0,212 (0,139)
Índice p53	--	-0,199 (0,166)	0,166 (0,248)	-0,066 (0,650)	-0,069 (0,635)
p16	--	--	0,026 (0,859)	0,210 (0,143)	-0,022 (0,881)
bcl2	--	--	--	0,157 (0,277)	0,451 (0,001)
Melan A	--	--	--	--	0,311 (0,028)

Los resultados corresponden al coeficiente de correlación de Spearman (grado de significación estadística).

4.2.4 ASOCIACIÓN ENTRE DATOS CLÍNICOS, VARIABLES HISTOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS

La edad no muestra asociación apreciable con ninguna de las variables histológicas testadas. El sexo presenta una asociación cercana a la significación estadística únicamente con el índice de Breslow, de manera que el valor medio del espesor tumoral en los hombres es de 2,7 mm, mientras en las mujeres es de 1,7 mm. A pesar de no ser estadísticamente significativo, destaca que la invasión angiolinfática es 4 veces superior en el hombre que en la mujer (TABLA 15).

La localización del melanoma primario se asocia de forma estadísticamente significativa con la afectación anexial, de manera que esta última se observa, sobre todo, en las lesiones localizadas en cabeza y cuello. En dicha localización no hay ningún caso con presencia de ulceración, de invasión angiolinfática ni de regresión (TABLA 16).

La edad y el sexo no se asocian con ninguna de las variables del método inmunohistoquímico incluídas en nuestro estudio (TABLA 17), así como tampoco se aprecia asociación de las mismas con la localización del melanoma cutáneo (TABLA 18).

RESULTADOS

TABLA 15. Asociación entre edad y sexo con las variables del método histológico.

	Edad (años)*	p	Mujer (N=25) N (%)	Hombre (N=25) N (%)	p
Índice de Breslow*		0,201 (0,161) ^c	1,7 (0,9)	2,7 (1,9)	0,067 ^a
Nivel de Clark					
II	61,5 (17,2)	0,091 (0,530) ^c	3 (12)	4 (16)	0,449 ^a
III	52,7 (16,8)		21 (84)	16 (64)	
IV	65,8 (14,4)		0 (0)	4 (16)	
V	71,2 (9,2)		1 (4)	1 (4)	
Fase de crecimiento					
Horizontal	64,6 (11,5)	0,112 ^a	3 (12)	4 (16)	1,000 ^b
Vertical	54,0 (17,4)		22 (88)	21 (84)	
Tipo de Melanoma					
Extensión superficial	53,7 (17,3)	0,305 ^d	19 (76)	15 (60)	0,262 ^b
Nodular	58,4 (17,3)		4 (16)	9 (36)	
Lentigo maligno	65,5 (5,0)		1 (4)	1 (4)	
Lentiginoso acro	69,1 (.)		1 (4)	0 (0)	
Nº de Mitosis*		0,119 (0,409) ^c	3,7 (3,0)	4,0 (3,5)	0,857 ^a
Ulceración					
Sí	50,9 (17,8)	0,272 ^a	5 (20)	4 (16)	1,000 ^b
No	56,8 (16,8)		20 (80)	21 (84)	
Invasión angiolímfática					
Sí	62,0 (16,4)	0,428 ^a	1 (4)	4 (16)	0,349 ^b
No	55,0 (17,1)		24 (96)	21 (84)	
Grado de inflamación					
Ausente-leve	59,3 (15,1)	0,140 ^d	15 (60)	15 (60)	1,000 ^b
Moderada	51,8 (18,7)		8 (32)	8 (32)	
Marcada	44,7 (19,2)		2 (8)	2 (8)	
Signos de regresión					
Sí	54,8 (16,5)	0,687 ^a	8 (32)	13 (52)	0,252 ^b
No	56,4 (17,6)		17 (68)	12 (48)	
Neurotropismo					
Sí	73,9 (.)	0,200 ^a	0 (0)	1 (4)	1,000 ^b
No	55,4 (17,0)		25 (100)	24 (96)	
Afectación Anexial					
Sí	54,5 (17,7)	0,846 ^a	10 (40)	7 (28)	0,551 ^b
No	56,3 (16,8)		15 (60)	18 (72)	
Restos de nevus					
Sí	51,3 (20,0)	0,246 ^a	6 (24)	5 (20)	1,000 ^b
No	57,0 (16,1)		19 (76)	20 (80)	

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

*Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

P = grado de significación estadística. ^aU de Mann Whitney. ^bTest de probabilidad exacta de Fisher. ^cCoefficiente de correlación de Spearman y (grado de significación estadística). ^dTest de Kruskal Wallis.

TABLA 16. Asociación entre localización y las variables del método histológico.

	Cabeza y cuello (N=5) N (%)	Tronco (N=25) N (%)	Extremidades (N=20) N (%)	P
Índice de Breslow*	2,0 (1,5)	2,5 (1,6)	1,8 (1,6)	0,207 ^a
Nivel de Clark				
II	1 (20)	3 (12)	3 (15)	0,422 ^a
III	2 (40)	19 (76)	16 (80)	
IV	0 (0)	3 (12)	1 (5)	
V	2 (40)	0 (0)	0 (0)	
Fase de crecimiento				
Horizontal	2 (40)	2 (8)	3 (15)	0,312 ^b
Vertical	3 (60)	23 (92)	17 (85)	
Tipo de Melanoma				
Extensión superficial	3 (60)	19 (76)	12 (60)	0,351 ^b
Nodular	1 (20)	6 (24)	6 (30)	
Lentigo maligno	1 (20)	0 (0)	1 (5)	
Lentiginoso acro	0 (0)	0 (0)	1 (5)	
Nº de Mitosis*	3,4 (2,5)	4,0 (3,2)	3,8 (3,5)	0,775 ¹
Ulceración				
Sí	0 (0)	6 (24)	3 (15)	0,654 ^b
No	5 (100)	19 (76)	17 (85)	
Invasión angiolinfática				
Sí	0 (0)	4 (16)	1 (5)	0,498 ^b
No	5 (100)	21 (84)	19 (95)	
Grado de inflamación				
Ausente-leve	3 (60)	13 (52)	14 (70)	0,576 ^a
Moderada	2 (40)	10 (40)	4 (20)	
Marcada	0 (0)	2 (8)	2 (10)	
Signos de regresión				
Sí	0 (0)	13 (52)	8 (40)	0,088 ^b
No	5 (100)	12 (48)	12 (60)	
Neurotropismo				
Sí	0 (0)	1 (4)	0 (0)	1,000 ^b
No	5 (100)	24 (96)	20 (100)	
Afectación Anexial				
Sí	4 (80)	9 (36)	4 (20)	0,038 ^b
No	1 (20)	16 (64)	16 (80)	
Restos de nevus				
Sí	1 (20)	5 (20)	5 (25)	0,885 ^b
No	4 (80)	20 (80)	15 (75)	

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

*Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

P = grado de significación estadística. ^a Kruskal Wallis. ^b Test de probabilidad exacta de Fisher.

RESULTADOS

TABLA 17. Asociación entre sexo y edad con las variables del método inmunohistoquímico.

	Edad (años)*	Coef. Spearman (P)	Mujer (N=25) N (%)	Hombre (N=25) N (%)	P
ki67*		0,148 (0,306)	18,8 (19,0)	21,9 (23,1)	0,915
p53					
0	59,2 (13,3)	-0,014 (0,923)	7 (28)	8 (32)	0,475
1	52,1 (17,5)		15 (60)	9 (36)	
2	58,7 (20,0)		3 (12)	8 (32)	
p16*		0,018 (0,900)	46,0 (35,7)	37,4 (36,3)	0,432
bcl2*		0,005 (0,974)	62,3 (29,2)	61,1 (29,6)	0,763
Melan A*		-0,084 (0,560)	68,2 (22,5)	58,3 (27,5)	0,225
HMB 45*		0,081 (0,578)	48,9 (27,5)	44,9 (26,7)	0,634

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

*Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

P = grado de significación estadística, test U de Mann Whitney.

TABLA 18. Asociación entre localización con las variables del método inmunohistoquímico.

	Cabeza y cuello (N=5) N (%)	Tronco (N=25) N (%)	Extremidades (N=20) N (%)	P
ki67*	17,4 (17,1)	25,0 (23,4)	15,4 (18,1)	0,496
p53				
0	2 (40)	9 (36)	4 (20)	0,770
1	2 (40)	10 (40)	12 (60)	
2	1 (20)	6 (24)	4 (20)	
p16*	41,0 (46,7)	34,6 (34,3)	50,8 (35,0)	0,455
bcl2*	68,2 (14,6)	63,1 (29,2)	58,4 (32,3)	0,916
Melan A*	57,4 (26,0)	61,3 (26,6)	67,1 (24,4)	0,621
HMB 45*	40,0 (31,8)	51,4 (25,9)	43,0 (27,4)	0,447

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

*Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

P = grado de significación estadística. Kruskal Wallis.

4.2.5 ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES HISTOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS

El análisis de la asociación entre las variables continuas (índice de Breslow, número de mitosis) y ordinales (nivel de Clark e infiltrado inflamatorio) del método histológico con las técnicas inmunohistoquímicas pone de manifiesto la asociación positiva y estadísticamente significativa de ki67 y de p53 con el índice de Breslow y con el número de mitosis. Además p53 se asocia, también de forma positiva y estadísticamente significativa, con el nivel de Clark. Así, el aumento del índice de Breslow o del índice mitótico del tumor se asocia con el incremento en la proliferación celular evaluada mediante ki67 y del índice de p53 (TABLA 19).

TABLA 19. Asociación entre variables continuas u ordinales del método histológico con el método inmunohistoquímico.

	Ki67	Índice p53	p16	bcl2	Melan A	HMB45
Índice de Breslow	0,541 (-0,001)	0,318 (0,024)	-0,249 (0,081)	-0,009 (0,950)	-0,263 (0,065)	-0,008 (0,956)
Nº de Mitosis	0,655 (-0,001)	0,446 (0,001)	-0,227 (0,113)	0,048 (0,740)	-0,054 (0,708)	0,011 (0,941)
Nivel de Clark	0,194 (0,177)	0,324 (0,022)	-0,252 (0,077)	0,166 (0,248)	-0,148 (0,307)	0,026 (0,858)
Grado de inflamación	-0,122 (0,397)	-0,179 (0,214)	-0,159 (0,270)	0,170 (0,238)	-0,067 (0,641)	-0,059 (0,685)

Los resultados corresponden al coeficiente de correlación de Spearman (grado de significación estadística).

La asociación entre las variables categóricas de tipo nominal del método histológico y las variables continuas del método inmunohistoquímico se muestra en las TABLAS 20, 21 y 22. Se observa la asociación directa y estadísticamente significativa de ki67 con la presencia de ulceración y de invasión vascular y de p53 con la fase de crecimiento y con la presencia de neurotropismo (TABLA 20). El p16 presenta una asociación cercana a la significación estadística con la presencia de ulceración, mientras que el bcl2 no muestra asociación con ninguna otra variable analizada (TABLA 21). El Melan A se asocia de forma positiva y estadísticamente significativa con la

RESULTADOS

variable tipo de melanoma, mientras que el HMB45 no muestra asociación con ninguna otra variable histológica estudiada (TABLA 22).

TABLA 20. Asociación entre ki67 e índice p53 con variables categóricas del método histológico.

	ki67		0 (N=15)	Índice p53 N (%)		P
	M (DE)	P		1 (N=24)	2 (N=11)	
Fase de crecimiento						
Horizontal	8,5 (6,4)	0,123 ^a	5 (33)	2 (8)	0 (0)	0,029 ^a
Vertical	22,6 (22,0)		10 (67)	22 (92)	11 (100)	
Tipo de Melanoma						
Extensión superficial	18,7 (20,5)	0,161 ^b	9 (60)	19 (79)	6 (55)	0,101 ^b
Nodular	27,8 (22,7)		3 (20)	5 (21)	5 (45)	
Lentigo maligno	3 (2,8)		2 (13)	0 (0)	0 (0)	
Lentiginoso acro	13 (-)		1 (7)	0 (0)	0 (0)	
Ulceración						
Sí	47,6 (21,0)	<0,001 ^a	1 (7)	4 (17)	4 (36)	0,096 ^a
No	14,3 (15,6)		14 (93)	20 (83)	7 (64)	
Invasión angiolinfática						
Sí	40,6 (25,0)	0,020 ^a	0 (0)	3 (13)	2 (18)	0,115 ^a
No	18,1 (19,5)		15 (100)	21 (87)	9 (82)	
Signos de regresión						
Sí	19,1 (26,1)	0,082 ^a	7 (47)	11 (46)	3 (27)	0,419 ^a
No	21,2 (16,7)		8 (53)	13 (54)	8 (73)	
Neurotropismo						
Sí	74,0 (-)	0,120 ^a	0 (0)	0 (0)	1 (9)	0,040 ^a
No	19,2 (19,7)		15 (100)	24 (100)	10 (91)	
Afectación anexial						
Sí	15,5 (16,2)	0,330 ^a	6 (40)	7 (29)	4 (36)	0,740 ^a
No	22,8 (22,8)		9 (60)	17 (71)	7 (64)	
Restos de nevus						
Sí	13,7 (11,4)	0,623 ^a	4 (27)	7 (29)	0 (0)	0,156 ^a
No	22,2 (22,7)		11 (73)	17 (71)	11 (100)	

Las cantidades corresponden a media (M) y (desviación estándar-DE), salvo si se indica N-número de observaciones- y (porcentaje).

P = grado de significación estadística. ^a U de Mann Whitney. ^b Test de Kruskal Wallis.

TABLA 21. Asociación entre p16 y bcl2 con variables categóricas del método histológico.

	N	p16		Bcl2	
		M (DE)	P	M (DE)	P
Fase de crecimiento					
Horizontal	7	45,2 (35,2)	0,507 ^a	52,7 (25,9)	0,194 ^a
Vertical	43	41,0 (36,4)		62,6 (29,8)	
Tipo de Melanoma					
Extensión superficial	34	39,9 (34,2)	0,531 ^b	62,9 (29,2)	0,728 ^b
Nodular	13	40,5 (40,6)		56,5 (32,2)	
Lentigo maligno	2	59,5 (47,3)		64,0 (11,3)	
Lentiginoso acro	1	82,0 (·)		82,0 (·)	
Ulceración					
Sí	9	22,0 (33,0)	0,061 ^a	64,8 (24,4)	0,823 ^a
No	41	46,0 (35,3)		61,0 (30,2)	
Invasión angiolinfática					
Sí	5	24,8 (39,3)	0,488 ^a	61,0 (32,8)	0,950 ^a
No	45	43,5 (35,4)		61,7 (29,1)	
Signos de regresión					
Sí	21	40,6 (34,5)	0,875 ^a	65,7 (30,8)	0,160 ^a
No	29	42,4 (37,4)		58,7 (28,0)	
Neurotropismo					
Sí	1	95,0 (·)	0,080 ^a	87,0 (·)	0,360 ^a
No	49	40,6 (35,4)		61,1 (29,2)	
Afectación anexial					
Sí	17	37,0 (36,8)	0,682 ^a	70,8 (18,4)	0,301 ^a
No	33	44,1 (35,7)		57,0 (32,5)	
Restos de nevus					
Sí	11	33,1 (31,6)	0,582 ^a	67,4 (21,2)	0,824 ^a
No	39	44,1 (37,0)		60,0 (31,0)	

Las cantidades corresponden a media (M) y (desviación estándar-DE).
P = grado de significación estadística. ^aU de Mann Whitney. ^bTest de Kruskal Wallis.

RESULTADOS

TABLA 22. Asociación entre Melan A y HMB45 con variables categóricas del método histológico.

	N	Melan A		HMB45	
		M (DE)	P	M (DE)	P
Fase de crecimiento					
Horizontal	7	64,7 (20,6)	0,765 ^a	45,2 (29,0)	0,668 ^a
Vertical	43	62,9 (26,3)		47,2 (26,8)	
Tipo de melanoma					
Extensión superficial	34	68,9 (23,9)	0,038 ^b	48,4 (24,2)	0,355 ^b
Nodular	13	44,6 (22,8)		42,7 (33,4)	
Lentigo maligno	2	79,0 (2,8)		29,5 (19,0)	
Lentiginoso acro	1	79,0 (·)		83,0 (·)	
Ulceración					
Sí	9	65,0 (25,5)	0,823 ^a	44,0 (27,7)	0,843 ^a
No	41	62,8 (25,6)		47,5 (27,0)	
Invasión angiolinfática					
Sí	5	47,2 (21,8)	0,081 ^a	42,4 (33,0)	0,730 ^a
No	45	65,0 (25,3)		47,4 (26,5)	
Signos de regresión					
Sí	21	64,8 (27,2)	0,672 ^a	42,1 (25,6)	0,380 ^a
No	29	62,1 (24,3)		50,3 (27,7)	
Neurotropismo					
Sí	1	68,0 (·)	0,920 ^a	74,0 (·)	0,360 ^a
No	49	63,1 (25,6)		46,3 (26,8)	
Afectación anexial					
Sí	17	62,1 (24,9)	0,652 ^a	51,4 (29,5)	0,418 ^a
No	33	63,7 (25,9)		44,5 (25,5)	
Restos de nevus					
Sí	11	68,8 (21,7)	0,590 ^a	58,6 (29,0)	0,117 ^a
No	39	61,6 (26,3)		43,5 (25,6)	

Las cantidades corresponden a media (M) y (desviación estándar-DE).

P = grado de significación estadística. ^a U de Mann Whitney. ^b Test de Kruskal Wallis.

4.2.6 ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES CLÍNICAS, HISTOLÓGICAS E INMUNOHISTOQUÍMICAS Y GANGLIO CENTINELA

A pesar de que ninguna de las variables clínicas se asocia de forma estadísticamente significativa a la positividad metastásica del ganglio centinela los melanomas localizados en tronco multiplican por 1,8 su probabilidad de diseminación ganglionar con relación a los de cabeza y cuello (TABLA 23).

Las únicas variables del método histológico que tienen cierta capacidad predictora de presencia de metástasis de melanoma en ganglio centinela de forma estadísticamente significativa en nuestro estudio son el índice de Breslow y el número de mitosis. Destacar que existe un porcentaje de casos con Índice de Breslow inferior o igual a 1,0 mm que presentan metástasis de melanoma en ganglio centinela. Comparando con estos melanomas delgados, los melanomas con índice de Breslow mayor de 4 mm tienen un riesgo dos veces superior de presentar metástasis.

Otras variables, si bien sin significación estadística, se asocian a un aumento del riesgo de metástasis en ganglio centinela. Así, melanomas cutáneos con nivel de Clark IV y V multiplican por 2,5 su probabilidad de diseminación ganglionar en comparación con los de nivel II; el melanoma de tipo nodular la multiplica por 1,7 si se compara con el de extensión superficial; la presencia de ulceración multiplica la probabilidad, en comparación con su ausencia, por 2,5; la presencia de invasión vascular angiolinfática por 4,6 (TABLA 24).

Por otra parte, la presencia de signos de regresión y de marcada inflamación multiplican por 2,4 y por 2,7 respectivamente, la probabilidad de afectación metastásica en ganglio centinela en comparación con la ausencia de signos de regresión o con la presencia de inflamación de intensidad leve (TABLA 25).

RESULTADOS

TABLA 23. Relación de variables clínicas con la presencia de metástasis en ganglio centinela.

	Ausencia (N=36) N(%)	Presencia (N=14) N(%)	OR (IC 95%)	P
Sexo				
Mujer	19 (53)	6 (43)	1,0	0,754 ^b
Hombre	17 (47)	8 (57)	1,5 (0,4-5,2)	
Edad (en años)*				
	57,3 (16,7)	51,8 (17,5)	1,0 (0,9-1,0)	0,280 ^a
> 60 años	18 (50)	6 (43)	1,0	0,757 ^b
≤ 60 años	18 (50)	8 (57)	1,3 (0,4-4,6)	
Localización				
Cabeza y cuello	4 (11)	1 (7)	1,0	0,901 ^b
Tronco	17 (47)	8 (57)	1,8 (0,2-19,6)	
Extremidades	15 (42)	5 (36)	1,3 (0,1-14,9)	

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

* Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

Valor OR (Odds ratio) = 1,0 indica la categoría de referencia.

P = grado de significación estadística. ^aU de Mann Whitney. ^bTest de probabilidad exacta de Fisher.

TABLA 24. Relación de variables histológicas con la presencia de metástasis en ganglio centinela (primera parte).

	Ausencia (N=36) N(%)	Presencia (N=14) N(%)	OR (IC 95%)	P
Índice de Breslow *	1,8 (1,2)	3,2 (2,1)	1,8 (1,1-2,8)	0,019^a
≤ 1 mm	11 (31)	2 (14)	1,0	
> 1-2 mm	12 (33)	3 (21)	1,3 (0,2-9,8)	
> 2-4 mm	12 (33)	5 (36)	2,2 (0,4-14,3)	
> 4 mm	1 (3)	4 (29)	22,0 (1,5-314,2)	0,028^a
Nivel de Clark				
II	5 (14)	2 (14)	1,0	
III	28 (78)	9 (65)	0,8 (0,1-4,9)	
IV	2 (6)	2 (14)	2,5 (0,2-32,2)	
V	1 (2)	1 (7)	2,5 (0,1-62,6)	0,440^a
Fase de crecimiento				
Horizontal	6 (17)	1 (7)	1,0	
Vertical	30 (83)	13 (93)	1,2 (0,2-6,8)	1,000^b
Tipo de Melanoma				
Extensión				
superficial	25 (69)	9 (64)	1,0	
Nodular	8 (22)	5 (36)	1,7 (4,4-6,7)	
Lentigo maligno	2 (6)	0 (0)	0,0 (-)	
Lentiginoso acro	1 (3)	0 (0)	0,0 (-)	0,653^c
Nº de Mitosis *	3,4 (3,2)	4,9 (3,0)	1,2 (1,0-1,4)	0,033^a
0-4 /mm ²	24 (67)	7 (50)	1,0	
≥ 5 /mm ²	12 (33)	7 (50)	2,0 (0,6-7,0)	0,339^b
Ulceración				
No	31 (86)	10 (71)	1,0	
Sí	5 (14)	4 (29)	2,5 (0,6-11,0)	0,245^b
Invasión angiolinfática				
No	34 (94)	11 (79)	1,0	
Sí	2 (6)	3 (21)	4,6 (0,7-31,4)	0,126^b

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

* Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

Valor OR (Odds ratio) = 1,0 indica la categoría de referencia.

P = grado de significación estadística. ^a U de Mann Whitney. ^b Test de probabilidad exacta de Fisher.

RESULTADOS

TABLA 25. Relación de variables histológicas con la presencia de metástasis en ganglio centinela (segunda parte).

	Ausencia (N=36) N(%)	Presencia (N=14) N(%)	OR (IC 95%)	P
Grado de inflamación				
Ausente-leve	22 (61)	8 (57)	1,0	
Moderada	12 (33)	4 (29)	0,9 (0,2-3,6)	
Marcada	2 (6)	2 (14)	2,7 (0,3-22,9)	0,654 ^a
Signos de regresión				
No	23 (64)	6 (43)	1,0	
Sí	13 (36)	8 (57)	2,4 (0,7-8,3)	0,213 ^b
Neurotropismo				
No	36 (100)	13 (93)	1,0	
Sí	0 (0)	1 (7)	ND	0,280 ^b
Afectación anexial				
No	24 (67)	9 (64)	1,0	
Sí	12 (33)	5 (36)	1,1 (0,3-4,0)	1,000 ^b
Restos nevus				
No	28 (78)	11 (79)	1,0	
Sí	8 (22)	3 (21)	1,0 (0,2-4,3)	1,000 ^b

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

* Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar). ND: no determinado.

Valor OR (Odds ratio) = 1,0 indica la categoría de referencia.

P = grado de significación estadística. ^a U de Mann Whitney. ^b Test de probabilidad exacta de Fisher.

TABLA 26. Relación de variables inmunohistoquímicas con la presencia de metástasis en ganglio centinela.

	Ausencia (N=36) N (%)	Presencia (N=14) N (%)	OR (IC 95%)	P
ki67*	15,6 (16,1)	32,6 (27,0)	1,0 (1,0-1,1)	0,022^a
≤ 20 %	28 (78)	6 (43)	1,0	
> 20 %	8 (22)	8 (57)	4,6 (1,2-17,4)	0,040^b
p53				
0	10 (28)	5 (36)	1,0	
1	18 (50)	6 (43)	0,7 (0,2-2,7)	
2	8 (22)	3 (21)	0,8 (0,1-4,1)	0,917^a
p16*	44,8 (35,1)	33,6 (37,9)	1,0 (0,9-1,0)	0,436^a
> 20 %	22 (61)	5 (36)	1,0	
≤ 20 %	14 (39)	9 (64)	2,8 (0,8-10,1)	0,126^b
bcl2*	61,6 (30,0)	61,8 (27,8)	1,0 (0,9-1,0)	0,746^a
≤ 50 %	12 (33)	4 (29)	1,0	
> 50 %	24 (67)	10 (71)	1,2 (0,3-4,8)	1,000^b
Melan A*	66,0 (24,9)	55,9 (26,0)	1,0 (0,9-1,0)	0,252^a
> 50 %	27 (75)	7 (50)	1,0	
≤ 50 %	9 (25)	7 (50)	3,0 (0,8-10,9)	0,105^b
HMB45*	44,0 (26,3)	54,2 (27,9)	1,0 (0,9-1,0)	0,300^a
≤ 50 %	22 (61)	7 (50)	1,0	
> 50 %	14 (39)	7 (50)	1,5 (0,5-5,4)	0,534^b

Las cifras indican número -N- de observaciones y (porcentaje), salvo indicación de lo contrario.

* Las cantidades corresponden a media y (desviación estándar).

Valor OR (Odds ratio) = 1,0 indica la categoría de referencia.

P = grado de significación estadística. ^a U de Mann Whitney. ^b Test de probabilidad exacta de Fisher.

La única variable del método inmunohistoquímico que se asocia con la presencia de metástasis de melanoma en ganglio centinela de forma estadísticamente significativa en nuestro estudio es el porcentaje de ki67. Un valor de ki67 superior al 20% incrementa en cuatro veces el riesgo de metástasis en ganglio centinela (OR: 4,6; IC95%: 1,2-17,4).

La inmunotinción con bcl2 o con HMB45 superior al 50% de las células multiplican la probabilidad de metástasis ganglionar, en comparación con los casos con valores inferiores a dicho porcentaje, por 1,2 y 1,5. Valores de p16 inferiores al 20% multiplican dicha probabilidad por 2,8 mientras porcentajes de Melan A de hasta el 50% lo multiplican por 3,0 (TABLA 26).

RESULTADOS

Hemos considerado la introducción selectiva de las variables en diferentes modelos de regresión logística para identificar el mejor modelo explicativo (TABLA 27).

TABLA 27. Poder explicativo de diferentes modelos de regresión logística.

MODELO	ÍNDICE DE NAGELKERKE
<input type="checkbox"/> Edad-sexo	0,05
<input type="checkbox"/> Edad-sexo-índice Breslow	0,28
<input type="checkbox"/> Edad-sexo-método histológico	0,49
<input type="checkbox"/> Edad-sexo-ki67 (continuas)	0,25
<input type="checkbox"/> Edad-sexo-método inmunohistoquímico	0,45
<input type="checkbox"/> Edad-sexo-índice Breslow-ki67	0,32

Un modelo ajustado por edad y sexo con todas las variables del método histológico explica el 49% de la variabilidad encontrada, mientras que con todas las variables del método inmunohistoquímico explica el 45%, teniendo en cuenta que en ambos modelos la mayoría de las variables no son estadísticamente significativas (TABLA 27).

La mejor variable del método histológico es el índice de Breslow que explica el 23% de la variabilidad. En un modelo ajustado por edad y sexo presenta una OR de 2,0 con IC95% de 1,2 a 3,4 ($P=0,010$), es decir, por cada milímetro de aumento del espesor de Breslow el riesgo se duplica. Pero, analizado en forma categórica se observa (TABLA 28) que un índice de Breslow superior a 4,0 mm se asocia a un riesgo 41 veces superior que en los melanomas con Breslow inferior o igual a 1,0mm, es decir, el doble del valor sin ajustar.

TABLA 28. Modelo de índice Breslow ajustado por edad y sexo.

	OR (IC 95%)
≤ 1 mm	1,0
> 1- 2 mm	1,6 (0,2-12,6)
> 2- 4 mm	2,5 (0,4-16,4)
> 4 mm	41,0 (2,2-774,0)

Valor OR (Odd ratio) = 1,0 indica la categoría de referencia.

De las variables incluídas en el método inmunohistoquímico en un modelo ajustado por edad y sexo, ki67 explica, de forma independiente y estadísticamente significativa, el 20% de la variabilidad, con una OR cuando se trata de forma continua, de 1,1 con IC 95% de 1,0 a 1,1 (P=0,014).

La determinación del mejor modelo predictivo por regresión logística paso a paso identifica al índice de Breslow como único factor independiente del resto y estadísticamente significativo.

Un modelo restringido a melanomas con índice de Breslow inferior o igual a 1,0 mm no evidencia ninguna otra variable asociada a ganglio centinela positivo.

5 DISCUSIÓN

A lo largo de los años han sido múltiples los estudios que han evaluado diferentes características del melanoma cutáneo para conocer su implicación en la evolución de la enfermedad [56, 71, 86, 109, 150, 152, 153, 159-161, 167-200].

Ya que la biopsia del ganglio centinela ha representado uno de los avances más significativos en el manejo del melanoma cutáneo de la última década [47, 80, 201], en esta tesis se han recogido las diferentes variables que se han ido identificando en la literatura como predictivas de la supervivencia y de la afectación metastásica de los ganglios linfáticos regionales de esta neoplasia, en un intento de conocer su capacidad de predecir únicamente la afectación metastásica en el ganglio centinela.

En la actualidad, son pocos los trabajos publicados [93, 166, 202, 203] que han evaluado específicamente factores predictivos de metástasis de melanoma cutáneo en ganglio centinela. Los resultados obtenidos hasta el momento han sido contradictorios [93, 166, 202-205], probablemente debido a que los modelos predictivos aplicados combinan factores diferentes (es decir, no hay dos modelos que tengan idéntico panel de variables a estudio) o a que se han utilizado diferentes métodos estadísticos. Por eso, el presente estudio intenta comprobar si alguna de las variables citadas en la literatura o la inclusión de información inmunohistoquímica, de forma individual o agrupada constituyendo un modelo, tiene o no la capacidad de predecir la presencia de células neoplásicas de melanoma cutáneo en la biopsia de ganglio centinela, independientemente de la evolución posterior del paciente.

Pero, una limitación de este estudio es el reducido tamaño muestral. Esto impide que alguna asociación detectada no haya alcanzado la significación estadística. Por tanto, el descartar que alguna de estas asociaciones, con cierta plausibilidad biológica, pudiera parcialmente contribuir a la predicción de la metástasis en ganglio centinela requiere de la replicación de este estudio con mayor número de casos. Por otra parte, algunos resultados estadísticos han de interpretarse con cautela por el hecho de haberse realizado múltiples análisis, lo que incrementa el riesgo de detectar asociaciones espúreas.

DISCUSIÓN

En el 28% de los pacientes estudiados en este trabajo se ha detectado la presencia de metástasis de melanoma en la biopsia de ganglio centinela. Este porcentaje, ligeramente superior al encontrado en otros estudios (15-22%) [79, 82, 86, 87, 93, 204, 206-208], puede ser debido a que en el presente estudio no se ha realizado una selección previa de los casos en función del espesor de Breslow que, como se comentará, es la principal variable implicada en el resultado del estado del GC.

Las únicas variables que han demostrado capacidad predictora de presencia de metástasis de melanoma en ganglio centinela de forma independiente y estadísticamente significativa han sido el índice de Breslow, el número de mitosis y el porcentaje de ki67.

La asociación entre el incremento de índice de Breslow y la mayor probabilidad de ganglio centinela positivo suele ser esperada y, generalmente, observada. En el presente trabajo, el índice de Breslow ha sido la principal variable asociada al resultado de la biopsia de ganglio centinela, de manera estadísticamente significativa ($P=0,019$). Este resultado coincide con los referidos por la mayoría de autores [55, 91, 93, 94, 166, 174, 202-204, 207, 209-212], apoyando la relevancia de la evaluación histológica minuciosa del espécimen en su totalidad para medir con precisión y exactitud la profundidad de la invasión del melanoma.

En melanomas con mayor espesor de Breslow hay más posibilidades de encontrar células neoplásicas metastásicas en la biopsia de ganglio centinela. En este estudio el 32,4% de los pacientes con melanoma de más de 1,0 mm de espesor de Breslow muestran metástasis en el estudio del ganglio centinela, porcentaje ligeramente superior a otras publicaciones [82, 202, 213] cuyas cifras se encuentran alrededor del 20-25%.

Los melanomas delgados ($\leq 1,0$ mm), pese a la creencia general, no están exentos de metastatizar en el ganglio centinela, hecho que se ha observado en el 15% de los casos incluidos en esta serie. En la literatura los resultados de este grupo de melanomas han sido contradictorios. Si bien algunos trabajos [204, 214] no han detectado ningún caso de melanoma delgado con micrometástasis en ganglio centinela, hay múltiples referencias

[80, 91, 93, 204, 207, 215-223] que han demostrado un porcentaje de metástasis en ganglio centinela que oscila entre el 3 y el 8%.

Estas cifras nada irrelevantes han servido de base a algunos investigadores [16, 223, 224] para argumentar que los melanomas delgados (índice de Breslow inferior o igual a 1,0 mm) no han de constituir una forma diferente de melanoma en cuanto a su manejo. Así, en este subgrupo se han identificado otros parámetros predictivos del estado del GC [47, 70], como el incremento del espesor de Breslow [216], el aumento en el nivel de Clark [216], la presencia de ulceración [216, 221], el elevado índice mitótico [221, 225] y la fase de crecimiento vertical [221]. El presente estudio, al igual que otros trabajos [226], no ha demostrado ningún factor predictivo del estado del ganglio centinela en melanomas delgados, probablemente debido a la infrarepresentación de este tipo de melanomas.

Por otra parte, y dado que en los melanomas con índice de Breslow superior a 4,0 mm no siempre se han detectado metástasis en el ganglio centinela, la BGC en este subgrupo no sólo permitiría identificar a los individuos que presenten metástasis submicroscópicas para un tratamiento completo (linfadenectomía regional y terapéutica adyuvante con interferón de alta dosis), sino también obviar la morbilidad de la disección regional de ganglios linfáticos en los que no tienen metástasis ganglionares, evitando así el sobretamiento.

Si bien en la mayoría de los trabajos publicados la línea divisoria para la predicción de metástasis en ganglio centinela en melanoma cutáneo se fija, siguiendo el sistema de estadiaje de la AJCC, en 1,0 mm, algunos autores buscan otros puntos de corte capaces de predecir con mayor exactitud la presencia de células tumorales en ganglio centinela.

Así, el grupo de Morton [85], en una reciente revisión de la exactitud de ganglio centinela, concluye que la positividad del ganglio centinela sólo se asocia a lesiones con índice de Breslow de más de 0,9 mm de espesor, no detectando metástasis en pacientes con melanomas inferiores a dicho espesor. Otros [93] identifican como punto de corte de mayor decisión significativa para predecir el resultado de la biopsia de ganglio centinela el valor de Breslow de 1,25 mm. Los resultados obtenidos en esta tesis han permitido establecer que

DISCUSIÓN

no existe un valor divisorio potencialmente útil en la predicción de metástasis en ganglio centinela, dado que se ha recogido hasta un caso con metástasis en GC con índice de Breslow de 0,5 mm.

La segunda variable histológica asociada, en este estudio, de forma estadísticamente significativa ($P=0,033$) con la presencia de metástasis de melanoma en ganglio centinela es el número de mitosis. Esta asociación ya referida por algunos autores [93, 207, 221, 225, 227], no ha de resultar sorprendente, ya que el índice mitótico ha sido demostrado como uno de los factores pronósticos negativos más importantes del melanoma cutáneo [150].

Por otra parte, la demostración en este trabajo de su asociación con otras variables asimismo con implicación pronóstica negativa, como es con el nivel de Clark ($P=0,044$) [225], con la fase de crecimiento vertical ($P=0,008$), con la presencia de ulceración ($P<0,001$) [228], con el porcentaje de ki67 [229] y con el índice de p53 ($P=0,001$) [186, 229-231], contribuirían a entender el peor comportamiento de los melanomas con mayor índice mitótico.

Especial atención merece la demostración de la asociación positiva y estadísticamente significativa del índice mitótico con el espesor de Breslow ($P<0,001$), de manera que, probablemente, la implicación del número de mitosis en la predicción del estado del ganglio centinela sea reflejo de su asociación con el espesor tumoral y que sea este último el que realmente desempeñe un papel primario y directo en la capacidad predictiva [206, 225]. En esta línea, algunos autores demuestran que cuando el número de mitosis se combina con el espesor de Breslow y la edad [206, 227] o con el espesor de Breslow y la presencia de ulceración [93] la capacidad de predicción de metástasis de ganglio centinela mejora de forma significativa. En general se considera que el índice mitótico es un predictor del resultado de la BGC debido a su asociación con la variable espesor de Breslow. En este trabajo la combinación del número de mitosis con ésta u otras variables no ha conseguido predecir mejor los resultados de la BGC.

Actualmente, la evaluación de la expresión de ki67 como marcador pronóstico [232, 233] en melanomas delgados parece abrir un nuevo campo de investigación. En el presente estudio, al igual que otros autores [234], ki67 ha

demostrado una asociación estadísticamente significativa ($P=0,022$) con la presencia de metástasis en ganglio centinela, de manera que cualquier aumento del porcentaje de dicha tinción inmunohistoquímica se asocia a un aumento en la probabilidad de que la biopsia de ganglio centinela sea positiva.

Además, cuando el porcentaje de positividad de ki67 es superior al 20% el melanoma presenta un riesgo superior de BGC positiva de forma estadísticamente significativa ($P=0,040$), con una OR de 4,6 en relación a la categoría de referencia de ki67 inferior o igual al 20%. Este resultado coincide con el expresado por otros autores [235] que demuestran que la expresión de ki67 superior al 20% es uno de los factores predisponentes de metástasis de melanoma en ganglio centinela.

Esta asociación entre el aumento de la expresión de ki67 y la presencia de metástasis en ganglio centinela puede explicarse por la asociación encontrada entre ki67 y otros parámetros histológicos publicados por otros autores como son la presencia de ulceración ($P<0,001$) [235], la presencia de invasión vascular ($P=0,020$) y, especialmente, el índice de Breslow ($P<0,001$) [229, 230, 232, 234-238]. Es el aumento de la proliferación celular, manifiesto por el porcentaje de células ki67 positivas, el causante del incremento del espesor tumoral, medido con el índice de Breslow, y éste a su vez el que influya directamente en la aparición de metástasis en ganglio centinela.

Aunque ninguna otra variable analizada en este estudio ha demostrado tener una relevancia sustancial para predecir el estado del ganglio centinela, el análisis de algunos parámetros ha permitido observar cierta asociación con la positividad de la biopsia de ganglio centinela, aunque no de manera estadísticamente significativa.

Así, y en referencia a las variables clínicas, se observa una discreta mayor tendencia de positividad de la biopsia de ganglio centinela en los pacientes menores de 60 años ($OR=1,3$), en los de sexo masculino ($OR=1,5$) y en los melanomas localizados en tronco ($OR=1,8$), en relación a los pacientes mayores, a las mujeres y a los otros dos grupos anatómicos (cabeza y cuello y extremidades).

DISCUSIÓN

El hecho de que los pacientes varones o los que presentan el melanoma en localización troncal sean más propensos a presentar metástasis en GC pudiera explicarse por el hecho de que ambos grupos se han asociado en la literatura con factores de mal pronóstico como son con un mayor espesor de Breslow [206, 239-242], con elevado número de mitosis [206] y con la presencia de signos de regresión y de ulceración [153, 239].

Además, la asociación estadísticamente significativa entre las variables sexo y localización anatómica del melanoma ($P < 0,001$) ya referida en otros trabajos [99, 150, 174, 179, 243-245], de forma que en las mujeres se localiza, principalmente, en las extremidades y en los hombres, en el tronco, potenciarían dicha tendencia a metastatizar junto con el hecho de que en el sexo masculino, el melanoma tiene en el momento del diagnóstico un valor medio de espesor de Breslow mayor (2,7 mm) que en el sexo femenino (1,7 mm) y, que en el 80% de los casos en los que se identifican signos de invasión angiolímfática el paciente es varón.

Sin embargo, es contradictoria la observación de la mayor incidencia de metástasis en ganglio centinela en pacientes de edad inferior a 50-60 años, dado que es la edad avanzada la que se considera factor pronóstico negativo de mala evolución de la enfermedad y de menor supervivencia [47]. El significado de este resultado, constatado asimismo por otros autores [202, 206, 209, 239], puede deberse a una disminución de la sensibilidad de la técnica de BGC en pacientes de edad avanzada (aumento de falsos negativos) o bien un comportamiento biológico diferente de los melanomas en este grupo de individuos (tendencia a la diseminación hematógica).

Algunas variables histológicas han mostrado cierta asociación con un mayor riesgo de positividad en la biopsia de ganglio centinela, aunque sin alcanzar la significación estadística. Entre ellas, el nivel elevado de Clark, la presencia de ulceración o de invasión angiolímfática han sido consideradas de forma repetida en la literatura biomédica como variables de mal pronóstico para la supervivencia y recurrencia de estos pacientes.

El hecho de que el melanoma se encuentre en nivel de Clark superior o igual a IV aumenta, en este estudio, la probabilidad de ganglio centinela

positivo (OR=2,5), en referencia a las otras categorías. Este resultado va en consonancia con la mayoría de publicaciones [55, 93, 202, 212] que demuestran una asociación directa e independiente del nivel de Clark, cuando éste es superior a nivel III, con la capacidad de predicción de metástasis en ganglio centinela. Las asociaciones positivas y estadísticamente significativas del nivel de Clark con el índice de Breslow (P=0,001) [241], con el número de mitosis [225], con la fase de crecimiento vertical (P=0,022), con el tipo melanoma (P=0,036) [109] - ya que los melanomas de tipo lentigo maligno y lentiginoso acro tienen como máximo un nivel de Clark de II, mientras la mayoría de los melanomas nodulares y de extensión superficial se encuentran en niveles III ó superiores - y con el incremento del índice de p53 (P=0,022) [186, 229, 230] contribuirían a explicar la mayor tendencia a metástasis de melanoma en GC al incrementarse el nivel de Clark. Otras asociaciones referenciadas en la literatura biomédica (no constatadas en este estudio) como son la presencia de ulceración [109, 153], la presencia de invasión vascular [109], el grado de inflamación [109] y el porcentaje de ki67 [229, 232] ayudarían, asimismo, a argumentar dicha tendencia.

En cuanto al tipo de melanoma, este estudio ha puesto de manifiesto una mayor probabilidad, no estadísticamente significativa, de metástasis en ganglio centinela en el melanoma nodular con respecto a los de extensión superficial, no observándose metástasis ganglionar en los casos de tipo lentigo maligno y de tipo lentiginoso acro de esta serie. Dicha tendencia pudiera ser explicada por la asociación positiva demostrada del tipo de melanoma con el índice de Breslow (P=0,005) [109], con el nivel de Clark (P=0,036) y con la fase de crecimiento (P=0,002). Por otra parte, algunos autores han demostrado su asociación con la presencia de ulceración [153] y con el mayor índice de p53 [188], que son más frecuentes en el melanoma nodular; asociación no corroborada en este estudio. La asociación positiva y estadísticamente significativa del tipo de melanoma con el porcentaje de Melan A (P=0,038) (no referida en la literatura) - apreciándose mayor inmunotinción en los melanomas de tipo lentiginoso acro y lentigo maligno que en los de extensión superficial y nodular-, sería debida a la mejor diferenciación de los dos primeros.

DISCUSIÓN

Aunque la presencia de ulceración no se ha asociado en los casos incluidos en esta tesis de forma estadísticamente significativa con el estado de la BGC, su asociación sí estadísticamente significativa, al igual que otros autores han publicado, con el índice de Breslow ($P=0,026$) [50, 99, 109, 150, 153, 241], con el número de mitosis ($P<0,001$) [228, 246] y con el valor de ki67 ($P<0,001$) [235], es decir, con las variables más importantes en la capacidad predictiva de metástasis de ganglio centinela demostradas en este trabajo hace suponer que en un estudio con mayor tamaño muestral sí pueda alcanzar la asociación estadísticamente significativa con la presencia de metástasis en ganglio centinela, como han referido otros autores [91, 93, 202, 204, 206, 207, 209, 210, 212, 214, 221]. Incluso, algunos autores demuestran que esta variable es un importante factor predictivo de metástasis en ganglio centinela en melanomas de espesor de Breslow inferior o igual a 1,0 mm [212, 221]. También, probablemente debido a la baja potencia estadística, no se ha podido demostrar, como otros autores han publicado, la asociación de la presencia de ulceración con otros factores negativos como el sexo masculino [99], con el mayor nivel de Clark [99, 109, 153], con el infiltrado inflamatorio peritumoral de menor intensidad [99, 153], con el tipo de melanoma nodular [153], con el incremento de la edad [239], con la presencia de invasión vascular [109] y con el mayor índice de p53 [186].

En teoría y en base a cuestiones fisiopatológicas, cabe suponer que la presencia de invasión vascular angiolinfática por cualquier neoplasia sería indicativa de mayor probabilidad de metástasis ganglionar de la misma. De esta manera, algunos autores [202, 207, 209, 247] han demostrado la asociación estadísticamente significativa de la invasión angiolinfática (presente en el 10% de los casos incluidos en este estudio) con la presencia de metástasis ganglionares. En el presente estudio, no todos los casos de melanoma en los que se identificó invasión vascular angiolinfática (5) tuvieron metástasis en biopsia de ganglio centinela, si bien es cierto que la probabilidad de que el resultado del ganglio centinela sea positivo es muy superior en los casos en los que se detecta invasión angiolinfática en referencia a aquellos en los que no se identificó dicha variable ($OR=4,6$). La presencia de invasión vascular angiolinfática se encuentra asociada con el porcentaje de ki67 ($P=0,020$) y con

el índice de Breslow ($P=0,015$) [109] que, como ya se ha comentado, son dos de las tres variables que han demostrado mayor capacidad predictiva del estado del GC. Una mayor profundidad tumoral tiene más posibilidades de afectar a un mayor número de estructuras vasculares y aumentar las posibilidades de detección de invasión angiolinfática, invasión necesaria aunque no suficiente para la presentación de metástasis.

Por lo que se conoce, la implicación del infiltrado linfoplasmocitario en la probabilidad de metástasis en ganglio centinela ha sido muy poco investigada [204, 207] y con resultados poco esperanzadores para que sea considerado una variable predictiva relevante en la afectación del ganglio centinela. En el presente trabajo, los datos indican que un grado marcado de inflamación se asocia al aumento de la probabilidad de metástasis en ganglio centinela ($OR=2,4$) en relación a las otras 2 categorías, aunque no de forma estadísticamente significativa. Este resultado, en contra de lo esperado, sugeriría que a mayor capacidad del sistema inmunitario (intensa reacción inflamatoria) para combatir la neoplasia, peor pronóstico. Por otra parte y dado que también se ha documentado su asociación con el espesor de Breslow [245], con el nivel de Clark [109], y con la presencia de invasión vascular [109], tal vez convendría reiterar los estudios en los que se incluya dicha variable para su reevaluación.

La presencia de signos de regresión se ha contemplado como indicador de mal pronóstico en pacientes con melanoma cutáneo. Sin embargo, en el estudio de su asociación con el estado de la BGC los resultados no son homogéneos. Así, mientras algunos autores [248, 249] han reportado que la presencia de signos de regresión en melanomas con espesor de Breslow inferior o igual a 1,0 mm es un predictor significativo de positividad de ganglio centinela, otros no han demostrado asociación entre la presencia de signos de regresión del melanoma primario y la afectación del ganglio centinela por la enfermedad [204, 207, 250].

En esta tesis, se aprecia una cierta tendencia a mostrar metástasis en ganglio centinela en casos de melanoma con signos de regresión en relación a los que no los tienen ($OR=2,4$), aunque no de forma estadísticamente

DISCUSIÓN

significativa. Además, la falta de uniformidad de resultados de esta variable queda asimismo reflejada en su asociación sincrónica con factores de mal pronóstico como es la localización en tronco, o de buen pronóstico como el menor índice de Breslow, o la ausencia de ulceración [210].

Aunque este estudio no ha podido dejar constancia de la influencia de la fase de crecimiento en la modificación de la probabilidad de tener metástasis en ganglio centinela, la demostración de la asociación positiva de la fase de crecimiento vertical con variables como el incremento del índice de Breslow ($P=0,027$) [221], el mayor nivel de Clark ($P=0,022$), el tipo de melanoma ($P=0,002$) - ya que todos los casos de melanoma nodular tienen fase de crecimiento vertical mientras todos los casos de tipo lentiginoso acro y lentigo maligno están en fase de crecimiento horizontal-, y el número de mitosis ($P=0,008$) - de manera que los melanomas en fase de crecimiento vertical tienen una media de mitosis de $4,3/\text{mm}^2$ y los de crecimiento horizontal de $1,3/\text{mm}^2$ - apoyaría la suposición de que la fase de crecimiento vertical sea un factor de riesgo importante para metástasis en ganglio centinela.

Así, la fase de crecimiento vertical se ha propuesto como un factor de riesgo para BGC positiva, sobre todo, en pacientes con melanomas delgados (≤ 1.0 mm) [213, 221, 222], asociándose incluso de forma estadísticamente significativa [202]. Dicho de otra manera y como evidencian otros autores [42, 251], que estos melanomas delgados cuando están en fase de crecimiento radial no presentan capacidad de metastatizar.

La influencia de las otras tres variables histológicas restantes (presencia de neurotropismo, de restos névicos y de afectación anexial) en la probabilidad de metástasis en ganglio centinela no ha quedado demostrada en este estudio, si bien es cierto que, de manera hipotética no existe una teoría razonable de su posible asociación con el estado de los ganglios linfáticos.

Referente a la valoración de las variables inmunohistoquímicas, a pesar de conocerse que en numerosos tumores la sobreexpresión de p53 (por mutación del gen p53) indica un bloqueo de la supresión tumoral y, por tanto, una mayor proliferación neoplásica, en la actualidad continúa siendo objeto de

debate si la expresión de la proteína p53 en los melanomas contribuye a un peor pronóstico y a favorecer la diseminación metastásica [187].

En general, en la literatura [161, 188, 252], la expresión de p53 en casos de melanoma muestra cifras muy variables, entre el 41 y el 84% (el 70% de los casos estudiados en esta tesis), con resultados de inmunopositividad fuerte de p53 en una minoría de melanomas cutáneos primarios (12%-21%) [183, 193, 253-255], el 22% de los casos en este estudio.

Este trabajo no ha demostrado que exista asociación entre el índice de p53 y la presencia o no de metástasis en ganglio centinela. Sin embargo, sí se ha observado la asociación positiva y estadísticamente significativa del aumento del índice de p53 con el incremento del espesor de Breslow ($P=0,024$) [186, 187, 229, 231, 236, 256, 257], con el mayor número de mitosis [186, 229-231], con los niveles de Clark más elevados [186, 229, 230] y con la fase de crecimiento vertical, aunque no con otras variables como con el tipo de melanoma nodular [188] y con la presencia de ulceración [186].

La controversia surge cuando otros autores, por el contrario, no demuestran asociación del índice de p53 con el índice de Breslow [190], con el número de mitosis [258], ni con la expresión de ki67 [110]. Tampoco se ha encontrado [191] asociación entre la sobreexpresión de p53 y el riesgo de metástasis en el subgrupo de melanomas delgados. Es decir, resulta difícil concluir el papel negativo de la expresión de p53 en el curso evolutivo del melanoma cutáneo. Probablemente la utilización de metodologías diversas de valoración de esta variable (porcentaje, grado de intensidad de la tinción, índice o histoscore, etc.) hace que los resultados difícilmente sean comparables y reproducibles.

Los resultados de este estudio indican que existe una mayor tendencia a presentar de metástasis en ganglio centinela en pacientes con melanomas con porcentaje de p16 inferior o igual al 20% ($OR=2,8$) con respecto al grupo de referencia (p16 >20%). Sin embargo, en la literatura no hay trabajos en los que se investigue dicha asociación, línea que pudiera ser interesante ampliar en trabajos posteriores.

DISCUSIÓN

Dado que la disminución de la expresión inmunohistoquímica de p16 aparentemente conlleva un aumento de la proliferación tumoral, parece lógico pensar que una menor tinción para p16 en las células del melanoma se asociaría con la aparición de otros factores negativos. Así, algunos autores demuestran la asociación negativa de p16 con el espesor de Breslow [259] (concluyendo que el punto de transición de espesor histopatológico más relevante a partir del cual decrece la expresión de p16 es 0,8 mm) o bien con el espesor de Breslow y el índice mitótico [200]. Otros asocian la ausencia de tinción tumoral de p16 con la presencia de ulceración, de invasión vascular [159, 161, 198], de mayor nivel de Clark [160] o de mayor porcentaje de ki67 [160, 161]. Su asociación con p53 es controvertida; mientras unos no encuentran correlación [161], otros sugieren una relación inversa entre la expresión alterada de p53 y de p16 [193].

La expresión de bcl2 en lesiones melanocíticas es controvertida y de difícil interpretación. El bcl2 inhibe la muerte celular programada (apoptosis) y prolonga la supervivencia celular, permitiendo que se incremente el riesgo de exposición celular a otras agresiones que conlleven la transformación maligna y, de esta manera, desempeñando un importante papel en el desarrollo del melanoma maligno.

Varios estudios publicados analizan la expresión de bcl2 en los melanomas cutáneos, con unas cifras de positividad que varían entre el 48 y el 67% de los casos [260-262]; en este estudio, dos tercios de los melanomas han mostrado inmunopositividad de bcl2 superior al 50%.

Sin embargo, Selzer y colaboradores [263] observan una expresión de bcl2 similar en melanocitos humanos normales que en células de melanoma, mientras otros autores [264-266] demuestran incluso una menor expresión de la proteína bcl2 en los melanomas primarios con respecto a los melanocitos normales y a las lesiones melanocíticas benignas [267]. Otros grupos [262, 265, 268-270] en base a la observación de la disminución de reactividad de bcl2 en los melanomas metastásicos, sugieren que en la supervivencia y en el crecimiento de las células del melanoma estén implicados otros mecanismos, distintos de bcl2.

Todo ello parece indicar que bcl2 no debiera ser considerado como un marcador de agresividad y, por tanto, que difícilmente pudiera estar asociado a una mayor probabilidad de desarrollo metástasis en ganglio centinela. De todas maneras, el que otros autores encuentren su asociación directa con el espesor de Breslow en melanomas nodulares [261, 271] y con los valores de ki67 [272] podría contribuir a pensar que bcl2 desempeña algún papel en el sobrecrecimiento y diseminación del melanoma cutáneo.

Dado que Melan A es un marcador de diferenciación melanocítica, la reducción de su expresión inmunohistoquímica implicaría una desdiferenciación del tumor. En base a ello, autores como Heenen y colaboradores [142] consideran que la disminución de expresión de Melan A por parte de las células del melanoma es un factor de mal pronóstico. Aunque en la literatura Melan A no se ha correlacionado con la capacidad de metastatizar en ganglio centinela, en este estudio se aprecia una mayor tendencia (OR=3,0) a presentar ganglio centinela positivo en el grupo de melanomas con inmunopositividad de Melan A menor o igual al 50%. En parte podría explicarse, por lo que refieren algunos autores que demuestran la asociación entre la pérdida de la expresión de Melan A y el aumento de espesor de Breslow [273] que, como ya se ha comentado previamente, es la principal variable pronóstica de metástasis de ganglio centinela, asociación no demostrada en este estudio.

En contrapartida a lo esperado y sin explicación aparente, ya que HMB45 es también un marcador de diferenciación melanocítica, los melanomas con positividad de HMB45 superior al 50% demuestran tener mayor tendencia (OR=1,5) a presentar metástasis en ganglio centinela en esta serie, en relación al otro grupo ($\leq 50\%$), datos no referidos en la literatura.

Además, la asociación directa y estadísticamente significativa de HMB45 con Melan A ($P=0,028$) - de manera que el aumento en la inmunotinción de uno conlleva un incremento en la tinción inmunohistoquímica para el otro - haría más incongruente el anterior resultado. Referente a la asociación directa y estadísticamente significativa de HMB45 con el porcentaje de bcl2 ($P=0,001$), no se puede sugerir ninguna explicación razonable

6 CONCLUSIONES

1. El índice de Breslow del melanoma primario cutáneo es el predictor más útil y significativo del resultado de la biopsia de ganglio centinela.
2. De las técnicas inmunohistoquímicas utilizadas con asiduidad en patología quirúrgica cuando se aplican al melanoma primario cutáneo, sólo ki67 tiene capacidad de predecir la existencia de metástasis en ganglio centinela en esta neoplasia, tanto si se recoge de forma continua o en dos categorías con punto de corte en el 20%.
3. La realización de tinciones inmunohistoquímicas en el melanoma primario cutáneo combinado con el estudio de sus características histológicas (método histológico) y de los datos clínicos del paciente no ayuda a mejorar la capacidad de predicción de metástasis en ganglio centinela.
4. La capacidad predictora de un modelo matemático que incluya ki67 y el índice de Breslow no es superior a uno que incluya exclusivamente el espesor tumoral. La asociación de ki67 de forma directa y estadísticamente significativa con el índice de Breslow es el mecanismo por el que ésta variable inmunohistoquímica tiene la capacidad de predecir el estado del ganglio centinela en el melanoma cutáneo.
5. Por todo lo anterior, es innecesario realizar las tinciones inmunohistoquímicas analizadas en este estudio en vistas a la predicción de la positividad de ganglio centinela.
6. La capacidad de predecir el estado del ganglio centinela del índice mitótico depende de su asociación con el índice de Breslow.
7. Ninguna variable clínica, histológica ni inmunohistoquímica, valorada en el subgrupo de melanomas delgados ayuda a predecir la presencia de metástasis de melanoma en GC.

CONCLUSIONES

8. No existe un punto de corte del índice de Breslow para predecir con certeza el resultado de la BGC. Melanomas cutáneos de diferente espesor de Breslow pueden o no estar asociados con GC positivo. Los pacientes con melanoma delgado con positividad del ganglio centinela son tributarios de linfadenectomía con el fin de mejorar su pronóstico. Por otra parte, en los pacientes con melanoma grueso y negatividad del GC se puede evitar la linfadenectomía regional, disminuyendo la morbilidad.
9. Las únicas asociaciones encontradas entre las variables del método inmunohistoquímico relacionan a bcl2 y a Melan A con HMB45 de forma significativa y directa.
10. ki67 presenta asociación positiva con el índice mitótico, con la presencia de ulceración y de invasión vascular angiolinfática.
11. p53 muestra asociación directa con el índice de Breslow, con el índice de mitosis, con el nivel de Clark y con la fase de crecimiento.
12. Melan A presenta asociación con el tipo de melanoma.
13. p16, bcl2 y HMB45 no demuestran asociación con ninguna otra variable analizada.
14. Algunas variables clínicas (sexo masculino, edad inferior a 60 años, localización del tumor primario en tronco), histológicas (nivel de Clark superior o igual a IV, melanoma de tipo nodular, presencia de ulceración, de invasión vascular angiolinfática, de marcada inflamación y de signos de regresión) e inmunohistoquímicas (porcentajes de p16 inferior o igual al 20%, de Melan A inferior o igual al 50% y de HMB45 superior al 50%) han mostrado un aumento del riesgo de metástasis en ganglio centinela, pero no de forma estadísticamente significativa, posiblemente debido al pequeño tamaño de la muestra.

15. Otras variables, como la presencia de restos de nevus, de afectación anexial, el grado de inflamación, el índice de p53 y el porcentaje de bcl2 no han demostrado valor predictivo del estado del ganglio centinela.
16. Hoy por hoy, la realización de la biopsia del ganglio centinela en pacientes con melanoma cutáneo sigue siendo necesaria en el manejo de rutina de estos pacientes.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. Eedy, D.J., *Historical Posters: Summaries of Posters*. British Journal of Dermatology, 2003. **149 (s64)**: p. 57-58.
2. Handley, W., *The pathology of melanotic growths in relation to their operative treatment. Lecture II*. Lancet, 1907. **1**: p. 996-1003.
3. Lynch, H.T., B.C. Fritchot, 3rd, and J.F. Lynch, *Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome*. J Med Genet, 1978. **15(5)**: p. 352-6.
4. Clark, W.H., Jr., et al., *Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. 'The B-K mole syndrome'*. Arch Dermatol, 1978. **114(5)**: p. 732-8.
5. Bevona, C. and A.J. Sober, *Melanoma incidence trends*. Dermatol Clin, 2002. **20(4)**: p. 589-95, vii.
6. Walsh, P., P. Gibbs, and R. Gonzalez, *Newer strategies for effective evaluation of primary melanoma and treatment of stage III and IV disease*. J Am Acad Dermatol, 2000. **42(3)**: p. 480-9.
7. Diepgen, T.L. and V. Mahler, *The epidemiology of skin cancer*. Br J Dermatol, 2002. **146(Suppl 61)**: p. 1-6.
8. Garbe, C., G.R. McLeod, and P.G. Buettner, *Time trends of cutaneous melanoma in Queensland, Australia and Central Europe*. Cancer, 2000. **89(6)**: p. 1269-78.
9. Bulliard, J.L., B. Cox, and J.M. Elwood, *Latitude gradients in melanoma incidence and mortality in the non-Maori population of New Zealand*. Cancer Causes Control, 1994. **5(3)**: p. 234-40.
10. Cress, R.D., E.A. Holly, and D.K. Ahn, *Cutaneous melanoma in women. V. Characteristics of those who tan and those who burn when exposed to summer sun*. Epidemiology, 1995. **6(5)**: p. 538-43.
11. English, D.R., et al., *Demographic characteristics, pigmentary and cutaneous risk factors for squamous cell carcinoma of the skin: a case-control study*. Int J Cancer, 1998. **76(5)**: p. 628-34.

BIBLIOGRAFÍA

12. Marks, R., *Epidemiology of melanoma*. Clin Exp Dermatol, 2000. **25**(6): p. 459-63.
13. Geller, A.C., et al., *Melanoma incidence and mortality among US whites, 1969-1999*. Jama, 2002. **288**(14): p. 1719-20.
14. Weinstock, M.A., *Early detection of melanoma*. Jama, 2000. **284**(7): p. 886-9.
15. Rogers, G.S. and S.M. Braun, *Prognostic factors*. Dermatol Clin, 2002. **20**(4): p. 647-58, viii-ix.
16. Balch, C.M., et al., *Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma*. J Clin Oncol, 2001. **19**(16): p. 3635-48.
17. Coit, D.G., A. Rogatko, and M.F. Brennan, *Prognostic factors in patients with melanoma metastatic to axillary or inguinal lymph nodes. A multivariate analysis*. Ann Surg, 1991. **214**(5): p. 627-36.
18. Riley, P.A., *Melanogenesis and melanoma*. Pigment Cell Res, 2003. **16**(5): p. 548-52.
19. Robertson, G., A. Coleman, and T.G. Lugo, *A malignant melanoma tumor suppressor on human chromosome 11*. Cancer Res, 1996. **56**(19): p. 4487-92.
20. Su, Y.A. and J.M. Trent, *Genetics of Cutaneous Malignant Melanoma*. Cancer Control, 1995. **2**(5): p. 392-397.
21. Fountain, J.W., et al., *Genetics of melanoma*. Cancer Surv, 1990. **9**(4): p. 645-71.
22. Flores, J.F., et al., *Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma*. Cancer Res, 1996. **56**(21): p. 5023-32.
23. Holland, E.A., et al., *Loss of heterozygosity and homozygous deletions on 9p21-22 in melanoma*. Oncogene, 1994. **9**(5): p. 1361-5.
24. Gilchrest, B.A., et al., *The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation*. N Engl J Med, 1999. **340**(17): p. 1341-8.

25. Piepkorn, M., *Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors*. J Am Acad Dermatol, 2000. **42**(5 Pt 1): p. 705-22; quiz 723-6.
26. Goldstein, A.M. and M.A. Tucker, *Genetic epidemiology of cutaneous melanoma: a global perspective*. Arch Dermatol, 2001. **137**(11): p. 1493-6.
27. Whiteman, D.C., C.A. Whiteman, and A.C. Green, *Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies*. Cancer Causes Control, 2001. **12**(1): p. 69-82.
28. Jiang, W., et al., *p53 protects against skin cancer induction by UV-B radiation*. Oncogene, 1999. **18**(29): p. 4247-53.
29. Bressac-de-Paillerets, B., et al., *Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma*. Biochimie, 2002. **84**(1): p. 67-74.
30. Koh, H.K., B.E. Kligler, and R.A. Lew, *Sunlight and cutaneous malignant melanoma: evidence for and against causation*. Photochem Photobiol, 1990. **51**(6): p. 765-79.
31. Holman, C.D., B.K. Armstrong, and P.J. Heenan, *Relationship of cutaneous malignant melanoma to individual sunlight-exposure habits*. J Natl Cancer Inst, 1986. **76**(3): p. 403-14.
32. Naldi, L., et al., *Pigmentary traits, modalities of sun reaction, history of sunburns, and melanocytic nevi as risk factors for cutaneous malignant melanoma in the Italian population: results of a collaborative case-control study*. Cancer, 2000. **88**(12): p. 2703-10.
33. Sandford KK, P.R., Price FM, *Radiation-induced chromatid breaks and DNA repair in blood lymphocytes of Patients with dysplastic nevi and/or cutaneous melanoma*. J Invest dermatol, 1997. **109**: p. 546-549.
34. Young P, P.D., Jackman L, Mooloy D, Green A., *A study of infertility treatment and melanoma*. Ann Dermatol Venereol., 2002. **129**(10 Pt 1): p. 1211.
35. Siple JF, S.D., Wanlass WA, Rosenblatt BK., *Levodopa therapy and the risk of malignant melanoma*. Ann Pharmacother, 2000. **34**(3): p. 382-5.

BIBLIOGRAFÍA

36. Mancini, A., *Skin*. Pediatrics, 2004. **113(4 Suppl)**: p. 1114-9.
37. Driscoll MS, G.-J.C., Grant- Kels JM, *Does pregnancy influence the prognosis of malignant melanoma?* J Am Acad Dermatol., 1993. **29(4)**: p. 619-30.
38. Clark WH, J., *A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biologic behavior*, in *Advances in biology of the skin*, P. Press, Editor. 1967: New York. p. 621-647.
39. McGovern, V.J., et al., *The classification of malignant melanoma and its histologic reporting*. Cancer, 1973. **32(6)**: p. 1446-57.
40. Reed, R., *The classification of malignant melanoma and its relationship with prognosis*. Pathology, 1970. **2**: p. 85-98.
41. Clark, W.H., Jr., et al., *The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin*. Cancer Res, 1969. **29(3)**: p. 705-27.
42. Guerry, D.t., et al., *Lessons from tumor progression: the invasive radial growth phase of melanoma is common, incapable of metastasis, and indolent*. J Invest Dermatol, 1993. **100(3)**: p. 342S-345S.
43. Clark, W.H., Jr., et al., *Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression*. J Natl Cancer Inst, 1989. **81(24)**: p. 1893-904.
44. Slominski, A., J. Ross, and M.C. Mihm, *Cutaneous melanoma: pathology, relevant prognostic indicators and progression*. Br Med Bull, 1995. **51(3)**: p. 548-69.
45. Rossi, C.R., et al., *Management of cutaneous melanoma M0: state of the art and trends*. Eur J Cancer, 1997. **33(14)**: p. 2302-12.
46. Johnson, T.M., et al., *Current therapy for cutaneous melanoma*. J Am Acad Dermatol, 1995. **32(5 Pt 1)**: p. 689-707; quiz 708-9.
47. Balch, C.M., et al., *Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system*. J Clin Oncol, 2001. **19(16)**: p. 3622-34.

48. Balch, C., *Cutaneous Melanoma*, in *AJCC Cancer Staging Manual*, P.D. Greene FL, Fleming ID, Editor. 2002, Springer Verlag: New York. p. 209-217.
49. Balch, C.M., et al., *The new melanoma staging system*. *Semin Cutan Med Surg*, 2003. **22**(1): p. 42-54.
50. Balch, C.M., et al., *New TNM melanoma staging system: linking biology and natural history to clinical outcomes*. *Semin Surg Oncol*, 2003. **21**(1): p. 43-52.
51. Breslow, A., *Problems in the measurement of tumor thickness and level of invasion in cutaneous melanoma*. *Hum Pathol*, 1977. **8**(1): p. 1-2.
52. Breslow, A., *Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma*. *Ann Surg*, 1970. **172**(5): p. 902-8.
53. Balch, C.M., et al., *A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma*. *Cancer*, 2000. **88**(6): p. 1484-91.
54. Marghoob, A.A., et al., *Breslow thickness and clark level in melanoma: support for including level in pathology reports and in American Joint Committee on Cancer Staging*. *Cancer*, 2000. **88**(3): p. 589-95.
55. Morton, D.L., et al., *Multivariate analysis of the relationship between survival and the microstage of primary melanoma by Clark level and Breslow thickness*. *Cancer*, 1993. **71**(11): p. 3737-43.
56. Buzaid, A.C., et al., *Critical analysis of the current American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma and proposal of a new staging system*. *J Clin Oncol*, 1997. **15**(3): p. 1039-51.
57. Buzaid, A.C., et al., *Prognostic value of size of lymph node metastases in patients with cutaneous melanoma*. *J Clin Oncol*, 1995. **13**(9): p. 2361-8.
58. Cascinelli, N., et al., *Regional non-nodal metastases of cutaneous melanoma*. *Eur J Surg Oncol*, 1986. **12**(2): p. 175-80.
59. Harrist, T.J., et al., *"Microscopic satellites" are more highly associated with regional lymph node metastases than is primary melanoma thickness*. *Cancer*, 1984. **53**(10): p. 2183-7.

BIBLIOGRAFÍA

60. Deichmann, M., et al., *S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma*. J Clin Oncol, 1999. **17**(6): p. 1891-6.
61. Sirott, M.N., et al., *Prognostic factors in patients with metastatic malignant melanoma. A multivariate analysis*. Cancer, 1993. **72**(10): p. 3091-8.
62. Barth, A., L.A. Wanek, and D.L. Morton, *Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases*. J Am Coll Surg, 1995. **181**(3): p. 193-201.
63. Sabel, M.S., et al., *Evolution of sentinel lymph node biopsy for melanoma at a National Cancer Institute-designated cancer center*. Surgery, 2000. **128**(4): p. 556-63.
64. Merkel, S., et al., *Testing a new staging system for cutaneous melanoma proposed by the American Joint Committee on Cancer*. Eur J Cancer, 2002. **38**(4): p. 517-26.
65. Retsas, S., et al., *Prognostic factors of cutaneous melanoma and a new staging system proposed by the American Joint Committee on Cancer (AJCC): validation in a cohort of 1284 patients*. Eur J Cancer, 2002. **38**(4): p. 511-6.
66. Averbook, B.J., et al., *A long-term analysis of 1018 patients with melanoma by classic Cox regression and tree-structured survival analysis at a major referral center: Implications on the future of cancer staging*. Surgery, 2002. **132**(4): p. 589-602; discussion 602-4.
67. Ruiter, D.J., et al., *Pathologic staging of melanoma*. Semin Oncol, 2002. **29**(4): p. 370-81.
68. Ruiter, D.J., et al., *The AJCC staging proposal for cutaneous melanoma: comments by the EORTC Melanoma Group*. Ann Oncol, 2001. **12**(1): p. 9-11.
69. Massi, D., et al., *Thick cutaneous malignant melanoma: a reappraisal of prognostic factors*. Melanoma Res, 2000. **10**(2): p. 153-64.

70. Massi, D., et al., *Thin cutaneous malignant melanomas ($\leq 1.5\text{ mm}$): identification of risk factors indicative of progression.* Cancer, 1999. **85**(5): p. 1067-76.
71. Azzola, M.F., et al., *Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center.* Cancer, 2003. **97**(6): p. 1488-98.
72. *NIH Consensus conference. Diagnosis and treatment of early melanoma.* Jama, 1992. **268**(10): p. 1314-9.
73. Carli, P., et al., *Preoperative assessment of melanoma thickness by ABCD score of dermatoscopy.* J Am Acad Dermatol., 2000. **43**(3): p. 459-66.
74. Veronesi, U., et al., *Thin stage I primary cutaneous malignant melanoma. Comparison of excision with margins of 1 or 3 cm.* N Engl J Med, 1988. **318**(18): p. 1159-62.
75. Balch, C.M., et al., *Efficacy of 2-cm surgical margins for intermediate-thickness melanomas (1 to 4 mm). Results of a multi-institutional randomized surgical trial.* Ann Surg, 1993. **218**(3): p. 262-7; discussion 267-9.
76. Casanova Seuma, J.M. and M. Ribera Pibernat, *[Melanoma]*. Aten Primaria, 2004. **33**(6): p. 335-46.
77. Elder, D.E., *Skin cancer. Melanoma and other specific nonmelanoma skin cancers.* Cancer, 1995. **75**(1 Suppl): p. 245-56.
78. Cascinelli, N., et al., *Immediate or delayed dissection of regional nodes in patients with melanoma of the trunk: a randomised trial. WHO Melanoma Programme.* Lancet, 1998. **351**(9105): p. 793-6.
79. Krag, D.N., et al., *Minimal-access surgery for staging of malignant melanoma.* Arch Surg, 1995. **130**(6): p. 654-8; discussion 659-60.
80. Gershenwald, J.E., et al., *Multi-institutional melanoma lymphatic mapping experience: the prognostic value of sentinel lymph node status in 612 stage I or II melanoma patients.* J Clin Oncol, 1999. **17**(3): p. 976-83.

BIBLIOGRAFÍA

81. Gould, E.A., et al., *Observations on a "sentinel node" in cancer of the parotid*. *Cancer*, 1960. **13**: p. 77-8.
82. Morton, D.L., et al., *Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma*. *Arch Surg*, 1992. **127**(4): p. 392-9.
83. Giuliano, A.E., et al., *Lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for breast cancer*. *Ann Surg*, 1994. **220**(3): p. 391-8; discussion 398-401.
84. Cochran, A.J., D.R. Wen, and D.L. Morton, *Occult tumor cells in the lymph nodes of patients with pathological stage I malignant melanoma. An immunohistological study*. *Am J Surg Pathol*, 1988. **12**(8): p. 612-8.
85. Morton, D.L., et al., *Validation of the accuracy of intraoperative lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy for early-stage melanoma: a multicenter trial. Multicenter Selective Lymphadenectomy Trial Group*. *Ann Surg*, 1999. **230**(4): p. 453-63; discussion 463-5.
86. Albertini, J.J., et al., *Intraoperative radio-lympho-scintigraphy improves sentinel lymph node identification for patients with melanoma*. *Ann Surg*, 1996. **223**(2): p. 217-24.
87. Morton, D.L., et al., *Intraoperative lymphatic mapping and selective cervical lymphadenectomy for early-stage melanomas of the head and neck*. *J Clin Oncol*, 1993. **11**(9): p. 1751-6.
88. Hauschild, A. and E. Christophers, *Sentinel node biopsy in melanoma*. *Virchows Arch*, 2001. **438**(2): p. 99-106.
89. Joseph, E., et al., *Results of complete lymph node dissection in 83 melanoma patients with positive sentinel nodes*. *Ann Surg Oncol*, 1998. **5**(2): p. 119-25.
90. Wagner, J.D., et al., *Lymph node tumor volumes in patients undergoing sentinel lymph node biopsy for cutaneous melanoma*. *Ann Surg Oncol*, 1999. **6**(4): p. 398-404.
91. Cascinelli, N., et al., *Sentinel lymph node biopsy in cutaneous melanoma: the WHO Melanoma Program experience*. *Ann Surg Oncol*, 2000. **7**(6): p. 469-74.

92. Thompson, J.F., et al., *Sentinel lymph node status as an indicator of the presence of metastatic melanoma in regional lymph nodes*. *Melanoma Res.*, 1995. **5**(4): p. 255-60.
93. Wagner, J.D., et al., *Predicting sentinel and residual lymph node basin disease after sentinel lymph node biopsy for melanoma*. *Cancer*, 2000. **89**(2): p. 453-62.
94. Haddad, F.F., et al., *The progression of melanoma nodal metastasis is dependent on tumor thickness of the primary lesion*. *Ann Surg Oncol.*, 1999. **6**(2): p. 144-9.
95. Gershenwald, J.E., et al., *Patterns of recurrence following a negative sentinel lymph node biopsy in 243 patients with stage I or II melanoma*. *J Clin Oncol*, 1998. **16**(6): p. 2253-60.
96. Starz, H., et al., *A micromorphometry-based concept for routine classification of sentinel lymph node metastases and its clinical relevance for patients with melanoma*. *Cancer*, 2001. **91**(11): p. 2110-21.
97. Cook, M.G., et al., *The development of optimal pathological assessment of sentinel lymph nodes for melanoma*. *J Pathol*, 2003. **200**(3): p. 314-9.
98. Brobeil, A., et al., *Cost analysis of sentinel lymph node biopsy as an alternative to elective lymph node dissection in patients with malignant melanoma*. *Surg Oncol Clin N Am*, 1999. **8**(3): p. 435-45, viii.
99. Balch, C.M., *Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide*. *Semin Surg Oncol*, 1992. **8**(6): p. 400-14.
100. Gupta, T.K., *Results of treatment of 269 patients with primary cutaneous melanoma: a five-year prospective study*. *Ann Surg*, 1977. **186**(2): p. 201-9.
101. Balch, C.M., et al., *A multifactorial analysis of melanoma: III. Prognostic factors in melanoma patients with lymph node metastases (stage II)*. *Ann Surg*, 1981. **193**(3): p. 377-88.
102. Sim, F.H., et al., *Lymphadenectomy in the management of stage I malignant melanoma: a prospective randomized study*. *Mayo Clin Proc*, 1986. **61**(9): p. 697-705.

BIBLIOGRAFÍA

103. Balch, C.M., et al., *Efficacy of an elective regional lymph node dissection of 1 to 4 mm thick melanomas for patients 60 years of age and younger*. *Ann Surg*, 1996. **224**(3): p. 255-63; discussion 263-6.
104. Ellis, R.E., J.Y. Yuan, and H.R. Horvitz, *Mechanisms and functions of cell death*. *Annu Rev Cell Biol*, 1991. **7**: p. 663-98.
105. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. *Br J Cancer*, 1972. **26**(4): p. 239-57.
106. Carson, D.A. and J.M. Ribeiro, *Apoptosis and disease*. *Lancet*, 1993. **341**(8855): p. 1251-4.
107. Raff, M.C., *Social controls on cell survival and cell death*. *Nature*, 1992. **356**(6368): p. 397-400.
108. Ellis, R.E., D.M. Jacobson, and H.R. Horvitz, *Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans**. *Genetics*, 1991. **129**(1): p. 79-94.
109. Niezabitowski, A., et al., *Prognostic evaluation of cutaneous malignant melanoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study*. *J Surg Oncol*, 1999. **70**(3): p. 150-60.
110. Vogt, T., et al., *p53-protein and Ki-67-antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin*. *Histopathology*, 1997. **30**(1): p. 57-63.
111. DeLeo, A.B., et al., *Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(5): p. 2420-4.
112. Lane, D.P. and S. Benchimol, *p53: oncogene or anti-oncogene?* *Genes Dev*, 1990. **4**(1): p. 1-8.
113. Soussi, T., K. Dehouche, and C. Beroud, *p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis*. *Hum Mutat*, 2000. **15**(1): p. 105-13.
114. Soussi, T. and C. Beroud, *Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome*. *Nat Rev Cancer*, 2001. **1**(3): p. 233-40.

115. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. **88**(3): p. 323-31.
116. Harris, C.C., *p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment*. Science, 1993. **262**(5142): p. 1980-1.
117. Roemer, K., *Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators*. Biol Chem, 1999. **380**(7-8): p. 879-87.
118. Ko, L.J. and C. Prives, *p53: puzzle and paradigm*. Genes Dev, 1996. **10**(9): p. 1054-72.
119. Hussain, S.P. and C.C. Harris, *Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes*. Cancer Res, 1998. **58**(18): p. 4023-37.
120. Sionov, R.V. and Y. Haupt, *The cellular response to p53: the decision between life and death*. Oncogene, 1999. **18**(45): p. 6145-57.
121. Oren, M., *Relationship of p53 to the control of apoptotic cell death*. Semin Cancer Biol, 1994. **5**(3): p. 221-7.
122. Rotter, V., et al., *Does wild-type p53 play a role in normal cell differentiation?* Semin Cancer Biol, 1994. **5**(3): p. 229-36.
123. Kastan, M.B., et al., *Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage*. Cancer Res, 1991. **51**(23 Pt 1): p. 6304-11.
124. Kastan, M.B., et al., *A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia*. Cell, 1992. **71**(4): p. 587-97.
125. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**(6381): p. 15-6.
126. Halachmi, S. and B.A. Gilchrest, *Update on genetic events in the pathogenesis of melanoma*. Curr Opin Oncol, 2001. **13**(2): p. 129-36.
127. Zerp, S.F., et al., *p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis*. Br J Cancer, 1999. **79**(5-6): p. 921-6.

BIBLIOGRAFÍA

128. Whiteman, D.C., P.G. Parsons, and A.C. Green, *p53 expression and risk factors for cutaneous melanoma: a case-control study*. Int J Cancer, 1998. **77**(6): p. 843-8.
129. Kim, M.Y., et al., *Mutations of the p53 and PTCH gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias*. J Dermatol Sci, 2002. **29**(1): p. 1-9.
130. Cleaver, J.E. and E. Crowley, *UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis*. Front Biosci, 2002. **7**: p. d1024-43.
131. Spatz, A., et al., *Interobserver reproducibility of ulceration assessment in primary cutaneous melanomas*. Eur J Cancer, 2003. **39**(13): p. 1861-5.
132. Dracopoli, N.C. and J.W. Fountain, *CDKN2 mutations in melanoma*. Cancer Surv, 1996. **26**: p. 115-32.
133. Bartkova, J., et al., *The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis*. Cancer Res, 1996. **56**(23): p. 5475-83.
134. Rocco, J.W. and D. Sidransky, *p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression*. Exp Cell Res, 2001. **264**(1): p. 42-55.
135. Liggett, W.H., Jr. and D. Sidransky, *Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer*. J Clin Oncol, 1998. **16**(3): p. 1197-206.
136. Farrow SN, B.R., *New members of the Bcl-2 family and their protein patterns*. Curr Opin Genet Dev, 1996: p. 45-49.
137. Pezzella F, T.A., Cordell JL, Pulford KA ., *Expression of the bcl-2 oncogene protein is not specific for the 14;18 chromosomal translocation*. Am J Pathol, 1990. **137**(2): p. 225-232.
138. Kawakami, Y., et al., *Production of recombinant MART-1 proteins and specific antiMART-1 polyclonal and monoclonal antibodies: use in the characterization of the human melanoma antigen MART-1*. J Immunol Methods, 1997. **202**(1): p. 13-25.
139. Coulie PG, B.V., Van Peal A, et al., *A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas*. J Exp Med, 1994. **180**: p. 35.

140. Kawakami, Y., Eliyahu S, Sakaguchi K, et al., *Identification of the immunodominant peptides of the Mart-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2 restricted tumor infiltrating lymphocytes*. J Exp Med, 1994. **180**: p. 347.
141. Jungbluth AA, B.K., Gerald WL, Stockert E, Coplan KA, Iversen K, et al., *An anti-Melan-A monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues*. Am J Surg Pathol, 1998. **22**: p. 595-602.
142. Heenen, M. and M. Laporte, *[Molecular markers associated to prognosis of melanoma]*. Ann Dermatol Venereol, 2003. **130**(11): p. 1025-31.
143. Ordonez NG, J.X., Hickey RC., *Comparison of HMB-45 monoclonal antibody and S-100 protein in the immunohistochemical diagnosis of melanoma*. Am J Clin Pathol, 1988. **90**(4): p. 385-90.
144. Kapur RP, B.S., Skelly M, Gown AM., *Anti-melanoma monoclonal antibody HMB45 identifies an oncofetal glycoconjugate associated with immature melanosomes*. J Histochem Cytochem., 1992. **40**(2): p. 207-12.
145. Bacchi CE, B.F., Pea M, Martignoni G, Gown AM., *HMB-45. A review*. Appl Immunohistochem, 1996. **4**: p. 73-85.
146. Fernando, S.S., S. Johnson, and J. Bate, *Immunohistochemical analysis of cutaneous malignant melanoma: comparison of S-100 protein, HMB-45 monoclonal antibody and NKI/C3 monoclonal antibody*. Pathology, 1994. **26**(1): p. 16-9.
147. Mirecka, J., M. Korabiowska, and A. Schauer, *Comparative distribution of S-100 protein and antigen HMB-45 in various types of melanomas and naevi*. Pol J Pathol, 1995. **46**(3): p. 167-72.
148. Veronesi, U. and N. Cascinelli, *Narrow excision (1-cm margin). A safe procedure for thin cutaneous melanoma*. Arch Surg, 1991. **126**(4): p. 438-41.

BIBLIOGRAFÍA

149. McGovern, V.J., et al., *The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: a revision of the 1972 Sydney classification*. Pathology, 1986. **18**(1): p. 12-21.
150. Balch, C.M., et al., *A multifactorial analysis of melanoma. II. Prognostic factors in patients with stage I (localized) melanoma*. Surgery, 1979. **86**(2): p. 343-51.
151. McGovern, V.J., et al., *Ulceration and prognosis in cutaneous malignant melanoma*. Histopathology, 1982. **6**(4): p. 399-407.
152. Balch, C.M., et al., *A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods*. Ann Surg, 1978. **188**(6): p. 732-42.
153. Balch, C.M., et al., *The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma*. Cancer, 1980. **45**(12): p. 3012-7.
154. Ramsay, J.A., et al., *MIB-1 proliferative activity is a significant prognostic factor in primary thick cutaneous melanomas*. J Invest Dermatol, 1995. **105**(1): p. 22-6.
155. Osman, I., et al., *Inactivation of the p53 pathway in prostate cancer: impact on tumor progression*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(8): p. 2082-8.
156. Cordon-Cardo, C., et al., *Distinct altered patterns of p27KIP1 gene expression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(17): p. 1284-91.
157. Drobnjak, M., et al., *Overexpression of cyclin D1 is associated with metastatic prostate cancer to bone*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1891-5.
158. Cuesta, T., H. Mendoza, et al., *Biomarkers in breast cancer with high over-expression of her2 protein*. Ginecol obstet mex, 2001. **69**: p. 161-6.
159. Reed, J.A., et al., *Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression*. Cancer Res, 1995. **55**(13): p. 2713-8.

160. Talve, L., et al., *Loss of expression of the p16INK4/CDKN2 gene in cutaneous malignant melanoma correlates with tumor cell proliferation and invasive stage*. Int J Cancer, 1997. **74**(3): p. 255-9.
161. Straume, O., L. Sviland, and L.A. Akslen, *Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1845-53.
162. Geradts, J., et al., *Immunohistochemical detection of the cyclin-dependent kinase inhibitor 2/multiple tumor suppressor gene 1 (CDKN2/MTS1) product p16INK4A in archival human solid tumors: correlation with retinoblastoma protein expression*. Cancer Res, 1995. **55**(24): p. 6006-11.
163. Alex, J., D. Weaver, et al., *Gamma probe guided lymph node localization in malignant melanoma*. Surg Oncol, 1993: p. 303-308.
164. Krag, D., D. Weaver, et al., *Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe*. Oncology, 1993: p. 335-340.
165. Uren, R., R. Howman-Giles, et al., *Lymphoscintigraphy in high risk melanoma of the trunc: Predicting draining node groups, defining lymphatic channels and locating the sentinel node*. J Nucl Med, 1993: p. 1435-1440.
166. Gershenwald, J.E., et al., *Improved sentinel lymph node localization in patients with primary melanoma with the use of radiolabeled colloid*. Surgery, 1998. **124**(2): p. 203-10.
167. Klaase, J.M., et al., *Limb recurrence-free interval and survival in patients with recurrent melanoma of the extremities treated with normothermic isolated perfusion*. J Am Coll Surg, 1994. **178**(6): p. 564-72.
168. Konstadoulakis, M., et al., *Survival of patients with stage IA malignant melanoma*. Surg Oncol, 1995. **4**(2): p. 101-4.

BIBLIOGRAFÍA

169. Kuno, Y., et al., *Clinical and pathological features of cutaneous malignant melanoma: a retrospective analysis of 124 Japanese patients*. Jpn J Clin Oncol, 1996. **26**(3): p. 144-51.
170. Talve, L.A., Y.U. Collan, and T.O. Ekfors, *Nuclear morphometry, immunohistochemical staining with Ki-67 antibody and mitotic index in the assessment of proliferative activity and prognosis of primary malignant melanomas of the skin*. J Cutan Pathol, 1996. **23**(4): p. 335-43.
171. Vossaert, K.A., et al., *Influence of gender on survival in patients with stage I malignant melanoma*. J Am Acad Dermatol, 1992. **26**(3 Pt 2): p. 429-40.
172. Hofmann-Wellenhof, R., et al., *Clinical and histological features of poor prognosis in cutaneous metastatic melanomas*. J Cutan Pathol, 1996. **23**(3): p. 199-204.
173. Meier, F., et al., *Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma*. Br J Dermatol, 2002. **147**(1): p. 62-70.
174. Garbe, C., et al., *Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients*. Cancer, 1995. **75**(10): p. 2484-91.
175. Francken, A.B., et al., *The prognostic importance of tumor mitotic rate confirmed in 1317 patients with primary cutaneous melanoma and long follow-up*. Ann Surg Oncol, 2004. **11**(4): p. 426-33. Epub 2004 Mar 15.
176. Allen, A.C. and S. Spitz, *Malignant melanoma; a clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis*. Cancer, 1953. **6**(1): p. 1-45.
177. Tompkins, V.N., *Cutaneous melanoma: ulceration as a prognostic sign*. Cancer, 1953. **6**(6): p. 1215-8.
178. Thorn, M., et al., *Clinical and histopathologic predictors of survival in patients with malignant melanoma: a population-based study in Sweden*. J Natl Cancer Inst, 1994. **86**(10): p. 761-9.

179. Soong, S.J., et al., *Predicting survival and recurrence in localized melanoma: a multivariate approach*. World J Surg, 1992. **16**(2): p. 191-5.
180. Balch, C.M., et al., *Long-term results of a multi-institutional randomized trial comparing prognostic factors and surgical results for intermediate thickness melanomas (1.0 to 4.0 mm)*. Intergroup Melanoma Surgical Trial. Ann Surg Oncol, 2000. **7**(2): p. 87-97.
181. Corona, R., et al., *Survival and prognostic factors in patients with localised cutaneous melanoma observed between 1980 and 1991 at the Istituto Dermopatico dell'Immacolata in Rome, Italy*. Eur J Cancer, 1994. **30A**(3): p. 333-8.
182. Kanoko, M., et al., *Expression of p53 protein in melanoma progression*. J Dermatol Sci, 1996. **12**(2): p. 97-103.
183. Lassam, N.J., L. From, and H.J. Kahn, *Overexpression of p53 is a late event in the development of malignant melanoma*. Cancer Res, 1993. **53**(10 Suppl): p. 2235-8.
184. Akslen, L.A. and O. Morkve, *Expression of p53 protein in cutaneous melanoma*. Int J Cancer, 1992. **52**(1): p. 13-6.
185. Stretch, J.R., et al., *Expression of mutant p53 in melanoma*. Cancer Res, 1991. **51**(21): p. 5976-9.
186. Yamamoto, M., et al., *Expression of the p53 protein in malignant melanomas as a prognostic indicator*. Arch Dermatol Res, 1995. **287**(2): p. 146-51.
187. Korabiowska, M., et al., *Significance of P-53 antigen in malignant melanomas and naevi of the head and neck area*. Anticancer Res, 1995. **15**(3): p. 885-9.
188. Lee, C.S., A. Pirdas, and M.W. Lee, *p53 in cutaneous melanoma: immunoreactivity and correlation with prognosis*. Australas J Dermatol, 1995. **36**(4): p. 192-5.
189. Florenes, V.A., et al., *TP53 allele loss, mutations and expression in malignant melanoma*. Br J Cancer, 1994. **69**(2): p. 253-9.

BIBLIOGRAFÍA

190. Weiss, J., et al., *Mutation and expression of TP53 in malignant melanomas*. Recent Results Cancer Res, 1995. **139**: p. 137-54.
191. Sparrow, L.E., et al., *Prognostic significance of p53 over-expression in thin melanomas*. Melanoma Res, 1995. **5**(6): p. 387-92.
192. Florenes, V.A., R. Holm, and O. Fodstad, *Accumulation of p53 protein in human malignant melanoma. Relationship to clinical outcome*. Melanoma Res, 1995. **5**(3): p. 183-7.
193. Straume, O. and L.A. Akslen, *Alterations and prognostic significance of p16 and p53 protein expression in subgroups of cutaneous melanoma*. Int J Cancer, 1997. **74**(5): p. 535-9.
194. Harley, S. and N. Walsh, *A new look at nevus-associated melanomas*. Am J Dermatopathol, 1996. **18**(2): p. 137-41.
195. Rieger, E., et al., *Overall and site-specific risk of malignant melanoma associated with nevus counts at different body sites: a multicenter case-control study of the German Central Malignant-Melanoma Registry*. Int J Cancer, 1995. **62**(4): p. 393-7.
196. Bataille, V., et al., *Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study*. Br J Cancer, 1996. **73**(12): p. 1605-11.
197. Alonso, S.R., et al., *Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study*. Am J Pathol, 2004. **164**(1): p. 193-203.
198. Funk, J.O., et al., *p16INK4a expression is frequently decreased and associated with 9p21 loss of heterozygosity in sporadic melanoma*. J Cutan Pathol, 1998. **25**(6): p. 291-6.
199. Keller-Melchior, R., R. Schmidt, and M. Piepkorn, *Expression of the tumor suppressor gene product p16INK4 in benign and malignant melanocytic lesions*. J Invest Dermatol, 1998. **110**(6): p. 932-8.
200. Pavey, S.J., et al., *Loss of p16 expression is associated with histological features of melanoma invasion*. Melanoma Res, 2002. **12**(6): p. 539-47.

201. Cherpelis, B.S., et al., *Sentinel lymph node micrometastasis and other histologic factors that predict outcome in patients with thicker melanomas*. J Am Acad Dermatol, 2001. **44**(5): p. 762-6.
202. McMasters, K.M., et al., *Factors that predict the presence of sentinel lymph node metastasis in patients with melanoma*. Surgery, 2001. **130**(2): p. 151-6.
203. Porter, G.A., et al., *Significance of multiple nodal basin drainage in truncal melanoma patients undergoing sentinel lymph node biopsy*. Ann Surg Oncol, 2000. **7**(4): p. 256-61.
204. Nguyen, C.L., et al., *Melanoma thickness and histology predict sentinel lymph node status*. Am J Surg, 2001. **181**(1): p. 8-11.
205. Tyler, D.S. and C.M. Balch, *Nomograms and staging in melanoma: new tools for better predicting outcomes*. Ann Surg Oncol., 2005. **12**(4): p. 267-9. Epub 2005 Mar 14.
206. Sondak, V.K., et al., *Mitotic rate and younger age are predictors of sentinel lymph node positivity: lessons learned from the generation of a probabilistic model*. Ann Surg Oncol, 2004. **11**(3): p. 247-58.
207. Mraz-Gernhard, S., et al., *Prediction of sentinel lymph node micrometastasis by histological features in primary cutaneous malignant melanoma*. Arch Dermatol, 1998. **134**(8): p. 983-7.
208. Reintgen, D., *Lymphatic mapping and sentinel node harvest for malignant melanoma*. J Surg Oncol, 1997. **66**(4): p. 277-81.
209. Stenius Muller, M.G., et al., *The sentinel lymph node status is an important factor for predicting clinical outcome in patients with Stage I or II cutaneous melanoma*. Cancer, 2001. **91**(12): p. 2401-8.
210. Liskay, G., et al., *Relationship between sentinel lymph node status and regression of primary malignant melanoma*. Melanoma Res., 2005. **15**(6): p. 509-13.
211. Lens, M.B., et al., *Tumour thickness as a predictor of occult lymph node metastases in patients with stage I and II melanoma undergoing sentinel lymph node biopsy*. Br J Surg, 2002. **89**(10): p. 1223-7.

BIBLIOGRAFÍA

212. Rousseau, D.L., Jr., et al., *Revised American Joint Committee on Cancer staging criteria accurately predict sentinel lymph node positivity in clinically node-negative melanoma patients*. Ann Surg Oncol., 2003. **10**(5): p. 569-74.
213. Thompson, J.F. and H.M. Shaw, *Sentinel node metastasis from thin melanomas with vertical growth phase*. Ann Surg Oncol, 2000. **7**(4): p. 251-2.
214. Cuellar, F.A., et al., *Small cell melanoma and ulceration as predictors of positive sentinel lymph node in malignant melanoma patients*. Melanoma Res., 2004. **14**(4): p. 277-82.
215. Stitzenberg, K.B., et al., *Indications for lymphatic mapping and sentinel lymphadenectomy in patients with thin melanoma (Breslow thickness \leq or =1.0 mm)*. Ann Surg Oncol., 2004. **11**(10): p. 900-6. Epub 2004 Sep 20.
216. Koskivuo, I., et al., *Sentinel node metastasectomy in thin \leq or =1-mm melanoma*. Langenbecks Arch Surg., 2005. **390**(5): p. 403-7. Epub 2005 Jul 29.
217. Naruns, P.L., et al., *Recurrence potential of thin primary melanomas*. Cancer., 1986. **57**(3): p. 545-8.
218. Slingluff, C.L., Jr., et al., *Lethal "thin" malignant melanoma. Identifying patients at risk*. Ann Surg., 1988. **208**(2): p. 150-61.
219. Woods, J.E., E.H. Soule, and E.T. Creagan, *Metastasis and death in patients with thin melanomas (less than 0.76 mm)*. Ann Surg., 1983. **198**(1): p. 63-4.
220. Shaw, H.M., et al., *Thin malignant melanomas and recurrence potential*. Arch Surg., 1987. **122**(10): p. 1147-50.
221. Oliveira Filho, R.S., et al., *Vertical growth phase and positive sentinel node in thin melanoma*. Braz J Med Biol Res., 2003. **36**(3): p. 347-50. Epub 2003 Mar 7.

222. Bedrosian, I., et al., *Incidence of sentinel node metastasis in patients with thin primary melanoma ($\leq 1\text{ mm}$) with vertical growth phase.* Ann Surg Oncol, 2000. **7**(4): p. 262-7.
223. Puleo, C.A., et al., *Sentinel node biopsy for thin melanomas: which patients should be considered?* Cancer Control., 2005. **12**(4): p. 230-5.
224. Mansson-Brahme, E., et al., *Prognostic factors in thin cutaneous malignant melanoma.* Cancer, 1994. **73**(9): p. 2324-32.
225. Kesmodel, S.B., et al., *Mitotic rate as a predictor of sentinel lymph node positivity in patients with thin melanomas.* Ann Surg Oncol., 2005. **12**(6): p. 449-58. Epub 2005 Apr 19.
226. Wong, S.L., et al., *Results of sentinel lymph node biopsy in patients with thin melanoma.* Ann Surg Oncol., 2006. **13**(3): p. 302-9. Epub 2006 Jan 30.
227. Thompson, J.F. and H.M. Shaw, *Should tumor mitotic rate and patient age, as well as tumor thickness, be used to select melanoma patients for sentinel node biopsy?* Ann Surg Oncol, 2004. **11**(3): p. 233-5.
228. Evans, A.T., et al., *Mitotic indices, anti-PCNA immunostaining, and AgNORs in thick cutaneous melanomas displaying paradoxical behaviour.* J Pathol, 1992. **168**(1): p. 15-22.
229. Soyer, H.P., *Ki 67 immunostaining in melanocytic skin tumors. Correlation with histologic parameters.* J Cutan Pathol, 1991. **18**(4): p. 264-72.
230. López-Muñiz, A.T., A.; Hernández, L.; Pérez, A.; Herrero-Zapatero, A., *Valoración y significación pronóstica de la expresión morfológica del p53 en melanomas malignos en fase de crecimiento vertical y en nevus melanocíticos.* Oncología, 2000;. **23** (6): p. 36-42.
231. Kaudewitz, P., et al., *Tumor cell growth fractions in human malignant melanomas and the correlation to histopathologic tumor grading.* Am J Pathol, 1989. **134**(5): p. 1063-8.
232. Sparrow, L.E., et al., *Prognostic significance of MIB-1 proliferative activity in thin melanomas and immunohistochemical analysis of MIB-1*

- proliferative activity in melanocytic tumors.* Am J Dermatopathol, 1998. **20**(1): p. 12-6.
233. Gimotty, P.A., et al., *Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma.* J Clin Oncol., 2005. **23**(31): p. 8048-56.
234. Moretti, S., et al., *Correlation of Ki-67 expression in cutaneous primary melanoma with prognosis in a prospective study: different correlation according to thickness.* J Am Acad Dermatol, 2001. **44**(2): p. 188-92.
235. Hazan, C., et al., *Evaluation of the proliferation marker MIB-1 in the prognosis of cutaneous malignant melanoma.* Cancer, 2002. **95**(3): p. 634-40.
236. Smolle, J., H.P. Soyer, and H. Kerl, *Proliferative activity of cutaneous melanocytic tumors defined by Ki-67 monoclonal antibody. A quantitative immunohistochemical study.* Am J Dermatopathol, 1989. **11**(4): p. 301-7.
237. Boni, R., et al., *MIB-1 immunoreactivity correlates with metastatic dissemination in primary thick cutaneous melanoma.* J Am Acad Dermatol, 1996. **35**(3 Pt 1): p. 416-8.
238. Korabiowska, M., et al., *An application of MIB antibody to the retrospective study of melanomas of oral mucosa and facial skin.* J Cancer Res Clin Oncol, 1994. **120**(6): p. 365-8.
239. Chao, C., et al., *Correlation between prognostic factors and increasing age in melanoma.* Ann Surg Oncol, 2004. **11**(3): p. 259-64.
240. Osborne, J.E. and P.E. Hutchinson, *Clinical correlates of Breslow thickness of malignant melanoma.* Br J Dermatol., 2001. **144**(3): p. 476-83.
241. Kopf, A.W., et al., *Factors related to thickness of melanoma. Multifactorial analysis off variables correlated with thickness of superficial spreading malignant melanoma in man.* J Dermatol Surg Oncol., 1981. **7**(8): p. 645-50.

242. Levine, J., et al., *Correlation of thicknesses of superficial spreading malignant melanomas and ages of patients*. J Dermatol Surg Oncol., 1981. **7**(4): p. 311-6.
243. Karakousis, C.P. and D.L. Driscoll, *Prognostic parameters in localised melanoma: gender versus anatomical location*. Eur J Cancer, 1995. **31A**(3): p. 320-4.
244. Stidham, K.R., J.L. Johnson, and H.F. Seigler, *Survival superiority of females with melanoma. A multivariate analysis of 6383 patients exploring the significance of gender in prognostic outcome*. Arch Surg, 1994. **129**(3): p. 316-24.
245. Clemente, C.G., et al., *Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma*. Cancer, 1996. **77**(7): p. 1303-10.
246. Ostmeier, H., et al., *Can immunohistochemical markers and mitotic rate improve prognostic precision in patients with primary melanoma?* Cancer, 1999. **85**(11): p. 2391-9.
247. Straume, O. and L.A. Akslen, *Independent prognostic importance of vascular invasion in nodular melanomas*. Cancer, 1996. **78**(6): p. 1211-9.
248. Olah, J., et al., *Tumour regression predicts higher risk of sentinel node involvement in thin cutaneous melanomas*. Br J Dermatol., 2003. **149**(3): p. 662-3.
249. Guitart, J., Lowe, L., Piepkorn, M., Prieto, VG., Rabkin, MS., Ronan, SG., Shea, CR., Tron, VA., White, W., Barnhill, RL., *Histological characteristics of metastasizing thin melanomas: a case-control study of 43 cases*. Arch Dermatol, 2002. **138**(5): p. 603-8.
250. Fontaine, D., et al., *Partial regression of primary cutaneous melanoma: is there an association with sub-clinical sentinel lymph node metastasis?* Am J Dermatopathol., 2003. **25**(5): p. 371-6.
251. Clark, W.H., Jr., et al., *A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma*. Hum Pathol., 1984. **15**(12): p. 1147-65.

252. Kim, Y.C., et al., *The relation between p53 expression and physical site of melanoma: an immunohistochemical study*. Br J Dermatol, 2003. **149**(6): p. 1299-300.
253. Essner, R., et al., *Prognostic implications of p53 overexpression in cutaneous melanoma from sun-exposed and nonexposed sites*. Cancer, 1998. **82**(2): p. 309-16.
254. Hartmann, A., et al., *Overexpression and mutations of p53 in metastatic malignant melanomas*. Int J Cancer, 1996. **67**(3): p. 313-7.
255. Saenz-Santamaria, M.C., et al., *p53 expression is rare in cutaneous melanomas*. Am J Dermatopathol, 1995. **17**(4): p. 344-9.
256. Loggini, B., et al., *Immunohistochemical study of 49 cutaneous melanomas: p53, PCNA, Bcl-2 expression and multidrug resistance*. Tumori, 2001. **87**(3): p. 179-86.
257. Karjalainen, J.M., et al., *p21(WAF1/CIP1) expression in stage I cutaneous malignant melanoma: its relationship with p53, cell proliferation and survival*. Br J Cancer, 1999. **79**(5-6): p. 895-902.
258. Ostmeier, H. and L. Suter, *The Ki-67 antigen in primary human melanomas--its relationship to mitotic rate and tumor thickness and its stability*. Arch Dermatol Res, 1989. **281**(3): p. 173-7.
259. Ghiorzo, P., et al., *Expression and localization of mutant p16 proteins in melanocytic lesions from familial melanoma patients*. Hum Pathol, 2004. **35**(1): p. 25-33.
260. Mikhail, M., et al., *PTEN expression in melanoma: relationship with patient survival, Bcl-2 expression, and proliferation*. Clin Cancer Res., 2005. **11**(14): p. 5153-7.
261. Leiter, U., et al., *Antiapoptotic bcl-2 and bcl-xL in advanced malignant melanoma*. Arch Dermatol Res, 2000. **292**(5): p. 225-32.
262. Ramsay, J.A., L. From, and H.J. Kahn, *bcl-2 protein expression in melanocytic neoplasms of the skin*. Mod Pathol, 1995. **8**(2): p. 150-4.

263. Selzer, E., et al., *Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines.* Melanoma Res, 1998. **8**(3): p. 197-203.
264. Tang, L., et al., *Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma.* Clin Cancer Res, 1998. **4**(8): p. 1865-71.
265. Saenz-Santamaria, M.C., et al., *Immunohistochemical expression of BCL-2 in melanomas and intradermal nevi.* J Cutan Pathol, 1994. **21**(5): p. 393-7.
266. Olie, R.A., et al., *Bcl-2 and bcl-xL antisense oligonucleotides induce apoptosis in melanoma cells of different clinical stages.* J Invest Dermatol, 2002. **118**(3): p. 505-12.
267. Radhi, J.M., *Malignant melanoma arising from nevi, p53, p16, and Bcl-2: expression in benign versus malignant components.* J Cutan Med Surg., 1999. **3**(6): p. 293-7.
268. van den Oord, J.J., et al., *Bcl-2 expression in human melanocytes and melanocytic tumors.* Am J Pathol, 1994. **145**(2): p. 294-300.
269. Tron, V.A., et al., *Immunohistochemical analysis of Bcl-2 protein regulation in cutaneous melanoma.* Am J Pathol, 1995. **146**(3): p. 643-50.
270. Bush, J.A. and G. Li, *The role of Bcl-2 family members in the progression of cutaneous melanoma.* Clin Exp Metastasis., 2003. **20**(6): p. 531-9.
271. Han Ö, A.F., Seçkin S, Kaçar A, Kulaçođlu S, *Proliferative activity by proliferative cell nuclear antigen (PCNA) and bcl-2 oncoprotein expression in malignant melanoma.* Turkish Journal of Dermatopathology, 1998.
272. Korabiowska, M., et al., *Bcl2 and Bax expression in naevi and melanomas and their relation to ploidy status and proliferation.* Pol J Pathol., 1999. **50**(1): p. 17-21.
273. Berset, M., et al., *Expression of Melan-A/MART-1 antigen as a prognostic factor in primary cutaneous melanoma.* Int J Cancer, 2001. **95**(1): p. 73-7.