

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIVISIÒN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL GENERAL DR MANUEL GEA GONZÁLEZ

**SERVICIO DE DERMATOLOGIA DEL HOSPITAL GENERAL DR MANUEL GEA
GONZALEZ**
**DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLOGICA DEL HOSPITAL GENERAL DR MANUEL
GEA GONZALEZ**
**DEPARTAMENTO DE ATENCION A LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA XOCHIMILCO.**



**“DETERMINACION DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN MELANOMA
DE MUCOSAS MEDIANTE PCR.”**

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN DERMATOLOGIA.

PRESENTA
ADRIANA AGUILAR DONIS

ASESOR DE TESIS
DRA MARIA ELISA VEGA MEMIJE

MEXICO, D.F. AGOSTO DE 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Hospital General Dr. Manuel Gea González, en la Sección del departamento de Atención a la salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco bajo la Dirección de la Dra. Maria Elisa Vega Memije.

Este trabajo de Tesis con No. PROT 06-39-2009 , presentado por el alumno Adriana Aguilar Donis se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis Dra. María Elisa Vega Memije, y por con fecha del 31 de julio del 2009 para su impresión final.

Tutor principal
Dra. María Elisa Vega Memije

Autorizaciones

Dr. Octavio Sierra Martínez
Director de enseñanza e Investigación.
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dr. Luciano Domínguez Soto
Jefe del Servicio de Dermatología
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

Dra. Maria Elisa Vega Memije
Subjefa de la División de Investigación
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

**DETERMINACION DE VIRUS DE PAPILOMA HUMANO EN MELANOMA
DE MUCOSAS MEDIANTE PCR.**

Colaboradores:

Nombre: ____Dra. Sara Parraguirre Martínez. _____

Firma: _____

Nombre: ____Dr. Adalberto Mosqueda Taylor_____

Firma: _____

Nombre: ____Dra. Sonia Tousaint Caire_____

Firma: _____

INDICE

Glosario	7
Relación de figuras y tablas.....	8
Resumen.....	9
Abstract	10
1. Introducción	11
2. Antecedentes	12
2.1. Marco de referencia.....	15
2.2 Factores de riesgo.....	17
2.3 Etiopatogenia	20
2.4 Detección y diagnóstico.....	24
3. Justificación.....	28
4. Hipótesis	29
5. Objetivo	29
6. Material y Métodos.....	29
6.1. Tipo de estudio.....	29
6.2. Ubicación temporal y espacial.....	29
6.3. Criterios de selección de la muestra.....	30
6.4. Variables.....	30
6.5. Tamaño de la muestra.....	31
6.6. Métodos de Laboratorio.....	32
7. Resultados.....	41
8. Discusión.....	44
9. Conclusiones	47
10. Perspectivas	47
11. Bibliografía.....	48
12. Anexos.....	53

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, a ti mamá, papá y marie que sin escatimar esfuerzos siempre me han apoyado a alcanzar mis sueños; por su amor incondicional, su fortaleza y su dulzura siempre, por motivarme siempre a ser mejor y esforzarme día a día, por infundirme el amor al conocimiento, por tolerar mis desvelos, mi cansancio y mi entrega, no tengo más palabras que decirles gracias .

A mis maestros, a aquellos que me permitieron compartir su amor al arte, su entrega al trabajo, su dedicación , su amor hacia la enseñanza y al orgullo de ver crecer a nuevas generaciones, por su compromiso con una medicina mas digna y mejor para los mexicanos, gracias por sus enseñanzas.

Un agradecimiento en particular al servicio de DermaGea en especial a la Dra. María Elisa Vega Memije y a la Dra. Sonia Toussaint Caire, a la Fundación Domínguez-Hoyo para la Enseñanza y la Investigación, al Dr. Jaime Berumen del Hospital General, al Dr. Adalberto Mosqueda Taylor , a la Dra. Sara Parraguirre y a la Dra. Lourdes Suárez, por su financiamiento y apoyo permanente para la realización de este trabajo, ya que sin su colaboración no hubiera podido ser posible. Gracias.

A todos mis amigos y amigas que me han acompañado en este largo camino, donde siempre he encontrado sus palabras y enseñanzas, por compartir conmigo su gran cariño y apoyo. Gracias.

Y a ti Arturo, mi amor, por estar siempre, por tolerar mis desvelos, mi cansancio y mi entrega, por estar conmigo en mis fracasos y éxitos, por ser mi compañero y mi mejor amigo. Por todas tus enseñanzas, apoyo y amor ilimitado. Gracias.

GLOSARIO

VPH: Virus de Papiloma Humano. Los papilomavirus son virus ADN de doble cadena, de 52-55 nm de diámetro, sin envoltura y con una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros que envuelven el genoma. Los viriones contienen al menos dos proteínas de cápside: la proteína mayor (L1) o principal (el 80% del virión) de 559 kilodaltons (kDa) y la proteína menor (L2) de 76 kDa. Hasta la fecha se han identificado 130 subtipos.

MM: Melanoma de mucosas. Tumor maligno derivado de melanocitos que se origina en las mucosas.

ADN: Acido Desoxirribonucleico. Molécula polimérica compuesta de nucleótidos, que constituye el material genético. La información que contiene se expresa por la secuencia de nucleótidos. Estos pueden ser de cuatro tipos: Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina (C). El ADN (Ácido Desoxiribo Nucleico) constituye el material genético de las células del cuerpo humano.

Ng: nanogramos. El nanogramo es una unidad de medida de masa del SI, de símbolo ng, equivalente a la milmillonésima parte de un gramo, es decir, un nanogramo corresponde a 1/1.000.000.000 gramo. También correspondería a la billonésima parte de un kilogramo, es decir 1 nanogramo es 1/1.000.000.000.000 kilogramo.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa. Esta técnica utiliza una enzima denominada ADN polimerasa que copia cadenas de ADN en un proceso que simula la forma en la que el ADN se replica de modo natural en la célula. Este proceso, que ha revolucionado todos los campos de la biología, permite a los científicos obtener gran número de copias a partir de un segmento determinado de ADN

PRIMER: oligonucleotidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos complementarios a la zona flanqueante de la región que se quiere amplificar, estos actúan como cebadores para la síntesis de ADN in Vitro la cual esta catalizada por la Taq polimerasa, los primer actúan como marcadores del sitio de inicio de la enzima.

RNA: Ácido constituido por tres sustancias distintas: ácido fosfórico, un monosacárido del tipo pentosa (la ribosa) y una base nitrogenada cíclica que puede ser púrica (uracilo o guanina) o pirimidínica (adenina o citosina).

RELACION DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1

Reacción en cadena de la polimerasa:

Paso 1: Calentamiento para la separación de las cadenas de DNA,

Paso 2: Hibridación de los oligonucleótidos,

Paso 3: Síntesis de DNA a partir de los oligonucleótidos

Figura 2

Mapa de oligonucleótidos en el gen L1 de los VPH

Figura 3

Diagrama de flujo general

Figura 4

Demostración del PCR.

TABLAS

Tabla 1.

Regiones del gen L1 amplificadas.

Tabla 2.

Ciclajes.

Tabla 3

Resultados.

RESUMEN

Se sabe que el virus de papiloma humano participa en el desarrollo de varios tumores malignos en el ser humano. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de virus de papiloma humano en tejido de melanomas de mucosas en bloques de parafina. Se tomó un periodo de 10 años en el Hospital General Dr. Manuel Gea González, de donde se obtuvieron 4 muestras, un periodo de 29 años en la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco de 1979 al 2008 con 3 muestras y 21 años en la clínica Peribact (a cargo Dr. Adalberto Mosqueda Taylor) con 6 muestras recolectadas (1989-2008). Trece especímenes de melanoma de mucosas embebidos en bloques de parafina obtenidos de 13 pacientes diferentes entre 1979-2008 fueron incluidos en el estudio. El diagnóstico histopatológico fue revisado y confirmado como melanoma maligno de mucosas, de estos 13 melanomas primarios de mucosas el tumor fue micro-disecado y analizado. Se realizó la detección del ADN de VPH mediante los primers generales GP, MY, L1C1 para virus de papiloma humano, los cuales en conjunto identifican 69 subtipos de VPH. Esta técnica puede detectar la presencia de menos de 10 ng de ADN de VPH. Antes de ser examinadas para la presencia de ADN de VPH las muestras fueron examinadas para valorar la amplificación del ADN mediante PCR de b-globina. De los 13 especímenes, 3 fueron insuficientes por lo que quedaron 10 para el análisis, de estas ninguna muestra fue positiva para la presencia del virus de papiloma humano. En conclusión, el DNA de 69 subtipos diferentes de VPH no fue detectado en los especímenes de melanoma de mucosas.

Abstract

Human papillomavirus (HPV) has been associated with some types of human cancer. The aim of this study was to investigate if HPV could be associated with human primary malignant melanoma in mucous membranes.

We reviewed and collected all the specimens from the dermatopathology , and pathology department, at Dr. Manuel Gea Gonzalez General Hospital in a period of ten years (1998-2008). The Health Department Attention Unit of the Metropolitan Autonomous University Xochimilco in a period of 29 years (1979-2008) and specimens from the private collection of Dr. Adalberto Mosqueda Taylor of Peribact clinic (1989-2008) The histopathological diagnosis was reviewed, and from 13 primary mucosal melanomas, tumour tissue was micro-dissected and analysed further. A protocol for detection of HPV DNA using general HPV primers GP, MY, L1C1 which together identify 69 different HPV subtypes, was developed. This protocol could detect presence of HPV DNA in less than 10 ng of DNA of a control cell that contained HPV type 16/cell. Before HPV testing the melanoma samples were examined for amplifiable DNA by a b-globulin PCR and 10 were positive. Ten of these 13 samples could be evaluated for HPV DNA and no samples were positive. In conclusion, HPV was not detected in primary mucous malignant melanomas in this study.

1. INTRODUCCION

Se sabe que el virus de papiloma humano participa en el desarrollo de varios tumores malignos en el ser humano. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia de virus de papiloma humano en tejido de melanomas de mucosas en bloques de parafina. Se tomó un periodo de 10 años en el Hospital General Dr. Manuel Gea González, de donde se obtuvieron 4 muestras, un periodo de 29 años en la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco de 1979 al 2008 con 3 muestras y 21 años en la clínica Peribact (a cargo Dr. Adalberto Mosqueda Taylor) con 6 muestras recolectadas (1989-2008). Aunque la radiación ultravioleta parece ser el principal agente en el desarrollo de melanomas cutáneos al parecer no juega un papel fundamental en el desarrollo de los melanomas en mucosas por lo surge la necesidad de identificar otros agentes que influyan en su génesis y debido a que el VPH participa en la patogénesis de otros carcinomas, se plantea identificar si este juega o no un rol en la génesis del melanoma de mucosas.

Trece especímenes de melanoma de mucosas embebidos en bloques de parafina obtenidos de 13 pacientes diferentes entre 1998-2008 en diferentes estadios clínicos fueron incluidos en el estudio. El diagnóstico histopatológico fue revisado y confirmado como melanoma maligno de mucosas, de estos 13 melanomas primarios de mucosas el tumor fue micro-disecado y analizado. Se realizó la detección del ADN de VPH mediante los primers generales GP, MY, L1C1 para virus de papiloma humano, los cuales en conjunto identifican 69 subtipos de VPH siendo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 90, 91, 94, 97, 102, MM4, MM7, MM8, MM9, C417. Este protocolo puede detectar la presencia de menos de 10 ngs. de DNA de VPH. Antes de ser examinadas para la presencia de ADN de VPH las muestras fueron examinadas para valorar la amplificación del ADN mediante PCR de b-globina . De las 13 muestras, 3 fueron insuficientes por lo que quedaron 10 para el análisis,

de estas ninguna muestra fue positiva para la presencia del virus de papiloma humano. En conclusión, el DNA de 69 subtipos diferentes de VPH no fue detectado en los especímenes de melanoma de mucosas.

2. ANTECEDENTES

El cáncer de piel ocupa el segundo lugar en frecuencia en México, según informes del Registro Histopatológico de las Neoplasias de 2001(1). En las mujeres representa el segundo lugar mientras que en los hombres el primer lugar. De los diferentes tipos histológicos existentes merece especial atención el melanoma debido a su alta mortalidad, la afección de grupos en edad productiva y la poca información que existe al respecto; todo ello la convierte en una neoplasia de difícil estudio y manejo (2) . En México constituye el 2% de todas las neoplasias malignas y el 11% de todos los tumores malignos de piel (3,4,5)

En un artículo publicado en México se realizó una investigación documental retrospectiva 1980 a 1999, de la Lista básica de Defunciones de los Estados Unidos Mexicanos; del Registro Nacional del Cáncer, de 1982 a 1988; del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, de 1993 a 1998; y del Boletín de Información Estadística Vol. II Daños a la Salud, de 1992 a 1999. Se recabó el número de casos de melanoma cutáneo (MC) y se consideró: edad, género, diagnóstico de egreso hospitalario, letalidad, número de defunciones según grupo de edad y género y defunciones por MC según entidad federativa. En él, se observó que el melanoma ocupó el decimonoveno lugar entre los 42 tumores malignos más frecuentes. Se calculó una incidencia de 1.01 por 100 000 habitantes para el periodo entre 1993-1998. Se calculó la tasa de mortalidad que fue de 0.22 por 100 000 habitantes, se observó un incremento en la mortalidad y en el riesgo de desarrollar esta neoplasia, tanto en hombres como en mujeres. (6)

Tomando en cuenta el registro de neoplasias en México, y el artículo antes citado, la situación en México es preocupante. En la Clínica de Melanoma del Instituto Nacional de Cancerología este aumento también ha sido evidenciado, con un desarrollo de casi el 500% en los últimos años.(7)

Aunque el melanoma representa el 4% de todos los tumores malignos de piel, éste es responsable del 75-80% de las muertes secundarias a cáncer de piel (8,73). Es por estas razones que es de suma importancia aprender acerca de su comportamiento biológico.

El melanoma maligno es una neoplasia que se origina de melanocitos de mucosa o piel normal que sufren una transformación. Afortunadamente el melanoma que surge en mucosas de cabeza o cuello es muy raro ya que se considera entre las neoplasias humanas más mortales que hay. Comprende el 1.3% de todos los tumores; el de cavidad oral constituye el 0.2% a 8.0% de todos los melanomas. Debido a que es asintomático en etapas iniciales, el diagnóstico generalmente se retrasa, lo que le confiere un muy mal pronóstico. (9)

Los melanomas que emergen en sitios protegidos de la radiación ultravioleta, particularmente en membranas mucosas como la vulva, mucosa sinonasal, mucosa oral, mucosa anorectal, etc; tienen diferencias significativas de los melanomas en zonas fotoexpuestas. Estas diferencias son epidemiológicas, clínicas, histopatológicas y moleculares (10,11,14), y no se deben solamente a la diferencia de exposición a radiación ultravioleta por lo que se piensa que existen diferencias etiológicas o diferentes cofactores involucrados. (12)

Se ha demostrado que ciertos subtipos de melanoma no están relacionados con la radiación ultravioleta como pudiera ser el acral lentiginoso o el melanoma de mucosas. (13)

Con este aumento en la incidencia de melanomas es urgente encontrar otros cofactores en la génesis del melanoma, que pudieran estar involucrado en la génesis de los melanomas extracutáneos. Uno de los candidatos es el virus del papiloma humano en donde en algunos artículos se ha reportado su presencia en relación con los melanomas y en otros artículos no ha mostrado relación, sin embargo hay muy poca literatura al respecto surgiendo la necesidad de aumentar la información.

2.1 MARCO DE REFERENCIA.

Los melanocitos derivan de la cresta neural y producen melanina. Su precursor son los melanoblastos, los cuales provienen de la cresta neural haciendo un recorrido durante la etapa embrionaria para asentarse en la capa basal de la epidermis, dermis o en glándulas sebáceas. El melanoma se puede general de cualquier melanocito solitario o reunido en nidos en epidermis, dermis de piel y mucosas.(15)

El cáncer es causado por mutaciones en los oncogenes, genes supresores de tumor y microarreglos de RNA. Estas alteraciones son generalmente eventos somáticos, aunque puede haber mutaciones germinales, estas se ven más en familias o cuando hay predisposición a cáncer. Generalmente se necesita un proceso en donde coexistan varias mutaciones a diferentes niveles como oncogenes o genes supresores de tumor en las células tumorales. (16)

Los tumores frecuentemente poseen diferentes clonas citogenéticas, que surgen de la célula inicial transformada. Esta heterogeneidad contribuye a las diferencias en el comportamiento clínico y a la respuesta al tratamiento de los tumores. Además de la clona inicial y de las subclonas, los tumores pueden tener células progenitoras cancerosas, dando un espectro de células con diferentes alteraciones genéticas y diferentes estados de diferenciación. Es por esta razón que entender los fenómenos que se desarrollan en el cáncer, es sumamente importante y una prioridad para desarrollar tratamiento dirigidos hacia éstos. Un ejemplo es la leucemia mieloide crónica, la cual inicia con una translocación cromosómica reciproca t(9:22) fusionando el protoncogen ABL al gen BCR. Todas las células leucémicas poseen esta alteración, por esta razón el uso de imatinib induce remisión completa en casi todos los pacientes, y cuando las leucemias presentan resistencia es normalmente por la adquisición de mutaciones en ABL. (15,16,17,18,19)

Es por eso que en el melanoma es de suma importancia identificar si en estos tumores hay o no infección por el virus del papiloma humano en las células cancerosas ya que esto nos pudiera orientar hacia posibles mecanismos en los cambios somáticos en oncogenes, genes supresores de tumor, que se relacionarían con su carcinogénesis.

2.2 FACTORES DE RIESGO

Se han descrito múltiples factores de riesgo para desarrollo de melanoma cutáneo.

Los más relevantes son:

1.- Historia familiar para melanoma.

Cuando hay más de 3 familiares directos afectados, aumenta hasta 70 veces la posibilidad de tener melanoma.

2.- Historia de múltiples nevos benignos (más de 100)

3.- Historia de nevos atípicos

4.- Haber padecido melanoma previamente.

Otros factores de riesgo descritos son:

1.-Inmunosupresión

2.- Exposición a radiación ultravioleta

3.-Fotosensibilidad

Cada uno de estos representa una predisposición genética o factor de estrés ambiental, que contribuye en la génesis del melanoma.

El 25 al 40% de los melanomas familiares, tienen mutaciones en el gen CDKN2A y una proporción menor tienen mutaciones en CD4 (cinasa dependiente de ciclina 4), ambos son genes de supresión tumor, estos se conocen como factores intrínsecos.

Estudios epidemiológicos sugieren que la exposición a la radiación ultravioleta (UVA y UVB) es el factor principal que propicia el desarrollo del melanoma. La radiación UV causa daño al DNA de las células, que cuando no son reparadas pueden crear mutaciones en los genes de ésta. Los elementos que determinan el riesgo a padecer melanoma incluyen la intensidad y la duración de la exposición del sol, la edad en la cual ocurre la mayor exposición y el grado de pigmentación de la piel. La presencia de quemaduras solares agudas en la niñez es uno de los factores de riesgo más importantes, aún más que la exposición solar en la edad adulta, todos estos incluidos como los factores ambientales (38). Estudios de migración indican incremento en el riesgo de padecer melanoma en individuos que vivieron o emigraron durante su infancia, a áreas más calurosas y con mayor exposición solar.(33)

El 50% de los melanomas se originan *de novo*, sin embargo, pueden originarse de lesiones melanocíticas previas, como son los nevos congénitos gigantes que lo desarrollan en un 5%, o los nevos displásicos, con un riesgo relativo de 11 al igual que la presencia de múltiples nevos (más de 100). (38)

La respuesta a la exposición de radiación ultravioleta, desencadena diversas adaptaciones, las cuales están gobernadas por los polimorfismos de los genes, confiriendo diferentes susceptibilidades a esta. La radiación ultravioleta causa mutaciones en el material genético, produce inmunosupresión, incrementa la producción de factores de crecimiento y hay producción de radicales libres de oxígeno que producen daño al DNA y evitan la apoptosis (22)

Otros de los factores de riesgo descritos son los fototipos I y II de la clasificación de Fitzpatrick. Los blancos tienen una incidencia 10 veces mayor de melanomas comparado con la raza negra y 7 veces mayor que la raza indígena y criolla en América Latina.(39)

Sin embargo en el melanoma en mucosas la radiación ultravioleta no juega un papel fundamental ya que prácticamente estos tumores no se ven expuestos a ella, por lo que dentro de las diferencias en cuanto a su etiopatogenia se ha visto por ejemplo que la expresión genética es diferente. Por ejemplo, se ha visto que los melanomas anorectales tienen menor expresión de BRAF que los cutáneos o la molécula DMBT1 la cual se encuentra aumentada en los melanomas anorectales versus los cutáneos (18). Por esta razón se deben buscar cofactores diferentes en la génesis de estos tumores, como pudiera ser la infección de virus oncogénicos que favorecieran este tipo de mutaciones o alteraciones en oncogenes.

2.3 ETIOPATOGENIA

El melanoma se produce por una serie de anormalidades genéticas acumuladas en los melanocitos. Estas anormalidades promueven la proliferación celular y previenen las vías de la apoptosis cuando hay daño al DNA. Este melanocito acumula mutaciones que van determinando su fenotipo maligno. Entre estas mutaciones se encuentran la estimulación de factores de crecimiento, invasión tumoral, la evasión de la respuesta inmune y las metástasis. Al parecer los mecanismos antiapoptóticos son una vía importante en la resistencia a quimioterapias, radioterapia o inmunoterapia, especialmente a través de la vía de los inhibidores de la proteína antiapoptosis Bcl-2 y BclxL. La radiación solar induce factores de crecimiento que actúan sobre los melanocitos, queratinocitos y fibroblastos. Estos estimulan vías mediadas por Ras/ RAF, activando vías de transcripción de genes involucrados con proliferación celular y migración. La radiación solar también estimula la producción de melanocortina (MSH), el ligando para el receptor de la melanocortina 1 (MC1R), el cual mediante la vía del AMP cíclico induce producción de eumelanina. Se ha visto que productos del metabolismo de la síntesis de melanina pueden causar daño oxidativo y favorecer la transformación maligna.

Se han encontrado mutaciones activas en el oncogen NRAS en 21% de las líneas celulares de los melanomas.. Estas mutaciones junto con mutaciones en el oncogen BRAF, son las más comunes reportadas en melanoma. Estas dos mutaciones ocurren en 10 a 30% de los melanomas primarios, siendo coadyuvantes para la proliferación celular.(8, 23.)

Llama la atención que las mutaciones en BRAF están presentes en 60-80% de los nevos melanocíticos benignos, sugiriendo que hay una maquinaria compleja y delicada que protege en diversos puntos de la proliferación celular anormal y que se necesita de otras mutaciones para contrarrestar estas barreras moleculares. (8, 24, 25,26)

Otras moléculas claves reguladoras en el ciclo celular son p16 y p14ARF, productos del gen CDKN2A. Este locus está frecuentemente mutado en familiar con melanomas. Cuando p16 está defectuoso, es incapaz de inactivar a CD4 y CDK6, los cuales fosforilan a Rb, liberando factor de transcripción E2F y promueven el ciclo celular.

La molécula central que contrarresta el daño al DNA es p53, la cual raramente está mutada en melanomas tempranos. Sin embargo mutaciones en p14ARF permiten la degradación de p53 al liberar su contraparte hdm2. (27)

Como otro mecanismo de defensa el melanoma expresa frecuentemente niveles altos de moléculas antiapopticas Bcl-2 y Bcl-x. (28) Estos son importantes blancos terapéuticos para el futuro. Los melanomas avanzados frecuentemente inactivan al efector de la apoptosis Apaf-1.(29)

Por otra parte, las variaciones en el receptor de melanocortina 1 (MC1R) se han asociado con melanoma y cáncer de piel no melanoma en europeos (40).

Se sabe que hay una vigilancia tumoral; esta se propuso por McFarlane Burnet y Lewis Thomas. Ellos propusieron que el sistema immune reconocía células precancerosas y cancerosas destruyéndolas. El papiloma virus es un agente que desencadena que las células infectadas sean destruidas porque se reconocen como

externas. Sin embargo las células cancerosas que no tienen DNA viral son reconocidas como propias y es más fácil que esquiven esta vigilancia. (54)

No está bien establecida la patogenia del melanoma de mucosas, ya que a diferencia del cutáneo, normalmente no se ve expuesto a radiaciones ultravioleta y tiene un comportamiento biológico distinto. Es por eso que se han intentado buscar otros iniciadores o promotores como el virus del papiloma humano.

La familia de virus de papiloma incluye muchos genotipos alrededor de 100. Hay diversas secuencias subgenómicas, sugiriendo que hay VPH putativos.

La mayoría son epiteliotrópicos y se dividen en alto y bajo riesgo. El genoma tiene 6 proteínas tempranas y dos proteínas tardías. Las proteínas tempranas están involucradas con la replicación viral y las tardías con la formación de la cápside viral, esta involucrada en la maduración y liberación de partículas víricas.

Las 3 proteínas oncogénicas E5, E6 y E7 tienen propiedades como factores de crecimiento y E6 y E7 son consideradas oncoproteínas porque transforman a las células in Vitro. E6 regula a la baja p53. La E7 se une con pRb que conlleva a estimulación del ciclo celular. Estas inestabilidades hacen que las células infectadas se brinquen pasos de regulación para su crecimiento celular.

Tipos específicos de virus de papiloma humano se han identificado como factores causales en tumores malignos del tracto genital. (56)

Un número de investigaciones ha demostrado la presencia de VPH en cáncer de piel diferente al melanoma tanto en inmunosuprimidos como inmunocompetentes. (57)

La detección de VPH en biopsias de piel normal es de 35%, y 90% por hisopos, esto habla de la gran distribución de estos virus en poblaciones humanas.

El VPH-38 se aisló en un melanoma cutáneo, pero ha habido pocos estudios examinando esta asociación. (58)

En un estudio realizado por Miracco et al, se encontró secuencias de DNA de VPH en 7.4% de los melanomas cutáneos: HPV-16, HPV 18 y DL436(relacionado con VPH 17). El VPH-24 se vio en melanomas acrales lentiginosos y en conjuntiva junto con el HPV-20. (58)

Los nuevos tipos de VPH DL284 y DL297 (relacionados con VPH 5) deberán ser estudiados para valorar su juego en la génesis ya que también se han reportado. (58)

2.4 DETECCION Y DIAGNOSTICO

El diagnóstico de melanoma se hace por clínica, ayudado por la dermatoscopia y sólo se confirma con el estudio histopatológico.

El melanoma maligno se clasifica en cutáneo, ocular y de mucosa. De 1074 pacientes con melanoma en mucosas en un reporte de 198 de la base de datos de EU de Cáncer , 55% fueron en cabeza y cuello, 24% anorectal, 18% tracto genital femenino, 3% tracto urinario(61).

El melanoma en mucosas es muy raro. Los sitios más comunes son conjuntiva, intranasal, senos paranasales, cavidad oral, vulva, anorectal y uretral. A excepción de la conjuntiva, generalmente el diagnóstico es tardío.

Los melanomas de mucosas afectan diferentes localizaciones teniendo comportamientos biológicos diferentes a los cutáneos. Estos melanomas representan 1.5% de los melanomas comparados con los cutáneos que son el 93.6% y el ocular 4.9%. El anorectal representa 22% de los melanomas en mucosas, después de los melanomas en mucosas en cabeza, y tracto genital.

Los melanomas anorectales representan un grupo muy pequeño de etiología desconocida y pobre pronóstico. Por su localización la radiación UV no juega un papel en su desarrollo, y es poco probable que tenga una lesión precursora como nevos. En cuanto a la edad, tiene una distribución bimodal. No hay información de infección de virus papiloma humano en su tumorigénesis aunque se ha planteado la posibilidad. (14)

Clínicamente se confunden con hemorroides, las formas amelanicas con linfomas, sarcomas o carcinomas no diferenciados. Generalmente al ser detectados están en una etapa avanzada y su sobrevida va de -5% a 22% según el estadio.(14)

Los melanomas sinonasales son raros, representan el 1% de los melanomas, y menos del 5% de las neoplasias sinonasales. Estos son más comunes en hombres que en mujeres. En la cavidad nasal, el sitio más frecuente de ocurrencia es el septum (porción anterior) y en la pared nasal lateral. Clínicamente, la mayoría de los pacientes tienen síntomas de obstrucción nasal o epistaxis. A la exploración se pueden ver grandes, bulbosos o como masas friables que sangran al manipularlos. Su presentación es indistinguible de poliposis benigna. Los melanomas nasales generalmente son polipoides. Su consistencia es firme, friable o gelatinosa. La mayoría crece en nidos o laminas de nidos poligonales de diversos tamaños. Pueden tener núcleo vesicular o nucleolo prominente. En pocos se observan células fusiformes. La cantidad de melanina varía considerablemente. Su tasa de mortalidad varía de 17 a 46%. No hay un periodo después del cual los pacientes pueden considerarse curados.

En estas localizaciones puede permanecer quiescente y recurrir después de décadas. Cuando son diagnosticados en la gran mayoría de los pacientes el tumor se encuentra localizado, solo del 10-20% tiene metástasis a ganglios regionales y 10% metástasis a distancia. Factores de mal pronóstico son edad avanzada, síntomas obstructivos, tumores mayores a 3 cm, localizaciones paranasales y en nasofaringe, invasión vascular o a músculo o hueso, alto índice mitótico, pleomorfismo celular marcado y metástasis regionales y a distancia. (59)

El melanoma en cavidad oral es raro, en la mucosa oral los melanocitos se encuentran en la periferia de los procesos interpapilares y en las puntas. Los melanocitos se encuentran en la encía en un relación de 1 melanocito por cada 15 queratinocitos. Los melanocitos, las células névicas y el melanoma difieren en su apariencia citológica, organización y características biológicas.

El melanoma oral representa el 0.2-8% de todos los melanomas. Es más frecuente en países como Japón, Uganda e India. Los japoneses tienen una mayor incidencia siendo de hasta 11-14% de todos los melanomas. En el este parece ser más común que en el occidente. Melanomas orales primarios en EU representan menos del 2% de todos los melanomas. En el estudio de Jackson y Simpson el melanoma primario de boca representó menos del 2% de todos los melanomas. Otros reportan desde 0.4%-1.3%. Es muy raro en niños o etapas prepuberales. Esta neoplasia, se ve más en adultos, con un pico entre los 40-70 años. En la boca se han propuesto diversos factores contribuyentes sin poder establecer un rol etiológico. Clínicamente estos tumores se clasifican en pigmentado nodular, no pigmentado nodular, pigmentado macular, pigmentado mixto y no pigmentado mixto. El melanoma oral puede ocurrir con o sin crecimiento radial. Su pronóstico es muy malo a comparación del cutáneo con sobrevida de 15% a 5 años vs 80% en melanoma cutáneo, coincidiendo con estas diferencias con su comportamiento biológico. (60)

Como ya se mencionó, el pronóstico de los melanomas en mucosas es más deletéreo que para su contraparte cutánea. En un estudio realizado por Pirua, et al, la supervivencia fue de 25% para el de mucosas, contra un 81% de piel. La más baja 11% fue para mujeres en el tracto urogenital, probablemente por el rico aporte vascular y linfático así como por la tardanza del diagnostico. Los melanomas en el tracto urogenital representan el 7% de estos tumores en las mujeres.

Su incidencia se ha mantenido estable a diferencia del cutáneo. Alrededor de 1000 mujeres con melanoma tracto urogenital han sido reportadas, siendo el vulvar el más común. (61)

Después del CEC el MM en región vulvar es el más común. 3-7% de los melanomas en mujeres ocurre en la vulva sugiriendo la posibilidad de predisposición al desarrollo de MM en esta zona. El melanoma vulvar ocurre en mujeres entre 50-70 años, más en caucásicas. Se origina de los labios menores, clítoris o labios mayores en su porción interna. Melanoma lentiginoso es el subtipo más común, seguido de la diseminación superficial o nodular. 25% son amelánicos. Generalmente es agresivo. (61)

Siempre se debe descartar la posibilidad de metástasis de melanoma ocular o primario cutáneo. Así mismo este tipo de melanoma tiende a volverse metastático. Su tratamiento es con cirugía desde escisiones amplias a vulvectomías, vaginectomías, uretrocistectomías, histerectomía radical. (61)

3. JUSTIFICACION

La importancia de este trabajo radica en que el melanoma es el cáncer de piel con mayor mortalidad y mayor auge en diversos países a nivel mundial, por lo que se ha convertido en un problema de salud pública. Desde 1960 la incidencia ha aumentado entre 3 a 8% por año en europeos, con mayor incidencia en hombres mayores. Habiendo en promedio 62,480 nuevos casos por año y de estos aproximadamente 8,420 pacientes morirán de este padecimiento en los Estados Unidos.

Tomando en cuenta el registro de neoplasias en México, y el artículo antes mencionado la situación en México es preocupante. En la Clínica de Melanoma del Instituto Nacional de Cancerología este aumento también ha sido evidenciado, con un desarrollo de casi el 500% en los últimos años.(7) y aunque el melanoma en mucosas afortunadamente es mucho más raro, es necesario entender su biología tumoral para que en un futuro se pueden establecer tratamientos más exitosos y con menos efectos adversos .

En nuestro conocimiento este estudio sería el primer estudio hecho en población mexicana en describir la relación del melanoma en mucosas con el virus del papiloma humano, ya que no encontramos ningún estudio publicado a la fecha.

4. HIPOTESIS

Se encontrará expresión del virus del papiloma humano en muestras de melanomas de mucosas en población mexicana.

5. OBJETIVOS

Determinar mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación la presencia de virus de papiloma humano en melanomas de mucosas embebidos en bloques de parafina de los servicios de anatomía patológica, dermatopatología del hospital general Dr. Manuel Gea González, el departamento de Patología Bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, y el Dr. Adalberto Mosqueda Taylor con casos de la clínica Peribact.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. TIPO DE ESTUDIO

Descriptivo, observacional, ambispectivo, transversal.

6.2. UBICACIÓN TEMPORAL Y ESPACIAL

Se revisó toda la base de datos del servicio de dermatopatología de 1998 al 2008, así como la base de Datos del servicio de anatomía patológica del hospital general Dr. Manuel Gea González , También participo el departamento de Patología Bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco con muestras desde 1979 al 2008 (29 años) y el Dr. Adalberto Mosqueda Taylor con casos de la clínica Peribact recolectados en 21 años (1989-2008). Se recolectaron todas las muestras de melanoma de mucosa que cumplieran con los criterios de selección.

6.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Criterios de Inclusión

Melanomas primario de mucosas

Que se cuente con el bloque de parafina de melanomas en mucosas y con la laminilla teñida con hematoxilina y eosina.

Que tengan más de 1.5 mm de grosor de tejido el bloque

Que la muestra haya sido procesada mediante los criterios estándar.

Que se cuente con sus datos en la base de datos del servicio de Dermatopatología, de Anatomía Patológica, del Departamento de patología bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco y de la clínica Peribact del Dr. Adalberto Mosqueda Taylor.

Criterios de exclusión.

Se excluirán aquellos bloques con tejido que no tuvieran suficiente DNA para su procesamiento o que presentaran fallas o fracasos durante el procesamiento de tipificación o secuenciación.

6.4. VARIABLES

Independientes. (CAUSA)		Dependientes. (EFECTO)	
Variables	Escala (intervalo, ordinal, nominal)	Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)
Edad	Intervalo	Virus de papiloma humano	Nominal
Sexo	Nominal		Dicotómica:
Localización Anatómica	Nominal	Tipo de virus	SI, NO
			Nominal

6.5. TAMAÑO DE LA MUESTRA

Se reunieron un total de 13 muestras de melanoma de mucosas; de las cuales, 4 muestras fueron del Hospital General Dr. Manuel Gea González en un periodo de 10 años, correspondiendo 2 al servicio de Anatomía Patológica y 2 al Servicio de Dermatopatología; del Departamento de Patología Bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco se reunieron 3 muestras en un periodo comprendido entre 1979 al 2008 (29 años) y 6 muestras correspondientes a la práctica privada del Dr. Adalberto Mosqueda Taylor en la clínica Peribact en un periodo de 21 años (1989-2008).

6.6 METODOS DE LABORATORIO

Los bloques de parafina se seleccionaron de las bases de datos ya descritas, se corroboró su disponibilidad, y que estuvieran embebidos en bloques de parafina de al menos 1 mm de grosor y con el procesamiento fijado en formalina. Todos estos bloques debían contar con rebajes del tejido teñidas con hematoxilina y eosina. Fueron revisadas corroborándose el diagnóstico y determinando su grado de invasión.

Todos los pacientes se trataron conforme a los criterios estandarizados, y estas biopsias fueron tomadas antes de se iniciarán los tratamientos estandarizados.

También se colectó información del expediente clínico, que incluyo la edad, diagnóstico, localización del tumor y año del diagnóstico.

Este trabajo fue aprobado por el comité de ética del Hospital General Dr. Manuel Gea González y no requirió de consentimiento informado.

Preparación de las muestras y Extracción del DNA.

Ya recolectadas las muestras, con la autorización mencionada y bajo las condiciones mencionadas se procedió a realizar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa , analizando los 13 especímenes para valorar la amplificación de DNA, a través de la b-globina, así como controles positivos con VPH 16 y controles negativos. De ser positiva la prueba de amplificación de DNA, se procedió a realizar la técnica en reacción de cadena de la polimerasa con 3 primers generales MY, GP, L1C1 para VPH analizando 10 especímenes . Si se hubiera encontrado la presencia de VPH entonces se hubiera realizado la segunda fase que es la secuenciación del VPH. Procedimiento realizado en el laboratorio.

Preparación del Tejido.

De cada bloque de parafina se tomaron dos microdisecciones de 20 mm de ancho en cortes consecutivos.

Los criostatos y escalpelos se lavaron en 70% etanol entre cada preparación

Cada corte con el criostat se le agregó una gota de agua estéril.

La parafina se removió:

Colocando en un tubo de 2 mlts una pequeña sección del tejido que se encontraba inmerso en la parafina siendo no más de 25 miligramos, se seccionó en pequeñas partes.

Se Adiciono 1200 microlitros de xileno y se volteo vigorosamente. Se Centrifugo a 13200 rpm por 5 minutos y se removió el sobrenadante por pipeteo, cuidando de no eliminar el pellet.

Se adiciono 1200 microlitros de etanol al 100% al pellet y vortexeo suavemente.

Se centrifugo a 13200 rpm por 5 minutos y se removió el sobrenadante por pipeteo , cuidando no eliminar el pellet.

Se repitieron los últimos dos pasos descritos una vez más.

Se secó el pellet a 37 C por 10 a 15 minutos hasta que se evaporó el etanol completamente.

Se resuspendió el pellet obtenido en 180 microlitros de buffer de digestión y 20 microlitros de proteinasa K, se vortexeo vigorosamente y se incubó la muestra a 50 C toda la noche con agitación. Después se continuó con el protocolo de purificación de DNA.

Se extrajo el DNA con el kit de extracción de DNA (Pure Link) Genomic DNA Mini Kit de Invitrogen. Cat K1820-02, Lot no. 538559.

Extracción de DNA.

Se realizó con el kit el cual se basa en la cromatografía de adsorción cuyo fundamento es la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas, cuando el ADN está en una solución acuosa se encuentra cubierto de una capa de moléculas de agua que mantienen su solubilidad en estas soluciones, al adicionar iones caotrópicos al ADN, se destruye esta capa de moléculas de agua, por lo que las sales caotrópicas crean un entorno hidrofóbico alrededor del ADN. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, el ADN se une a la membrana de sílica gel de las columnas, mientras que las proteínas y otros contaminantes no se unen, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante el lavado. Posteriormente, el ADN se separa de la membrana mediante soluciones tampón de elusión con baja concentración de sales (ligeramente alcalinos), ya que permiten recuperar la capa hidrofílica alrededor del ADN, liberándolos de la membrana. Para el Kit de PureLink Genomic DNA Mini Kit de Invitrogen el primer paso se realiza con proteinasa K, que es una enzima proteolítica, y buffer de lisis purelink que ayuda a lisar membranas celulares permitiendo la salida del material genético, posteriormente se adiciona una solución con alta concentración de sales caotrópicas (buffer de unión), principalmente cloruro de guanidina, en este paso el ADN se une con alta afinidad a la membrana de sílica

gel y los contaminantes se eluyen, la siguiente solución (buffer de lavado) esta compuesta principalmente de azida de sodio a bajas concentraciones, el ADN permanece unido a la membrana, el siguiente paso es la elusión del ADN mediante una solución ligeramente alcalina pH=8.0 (AE) que contiene Tris-EDTA, la cual arrastra al DNA de la membrana para colectarlo purificado.

Para la detección y tipificación de VPH la extracción del ADN se realizó de las biopsias en parafina de los melanomas en mucosas

Amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa): El fundamento de la PCR es la complementariedad de bases del DNA, se emplean 3 temperaturas: 1) Temperatura de desnaturalización en la cual se separan las hebras, 2) Temperatura de hibridación de los oligonucleótidos, 3) Temperatura de polimerización, donde se lleva a cabo la elongación de la cadena.

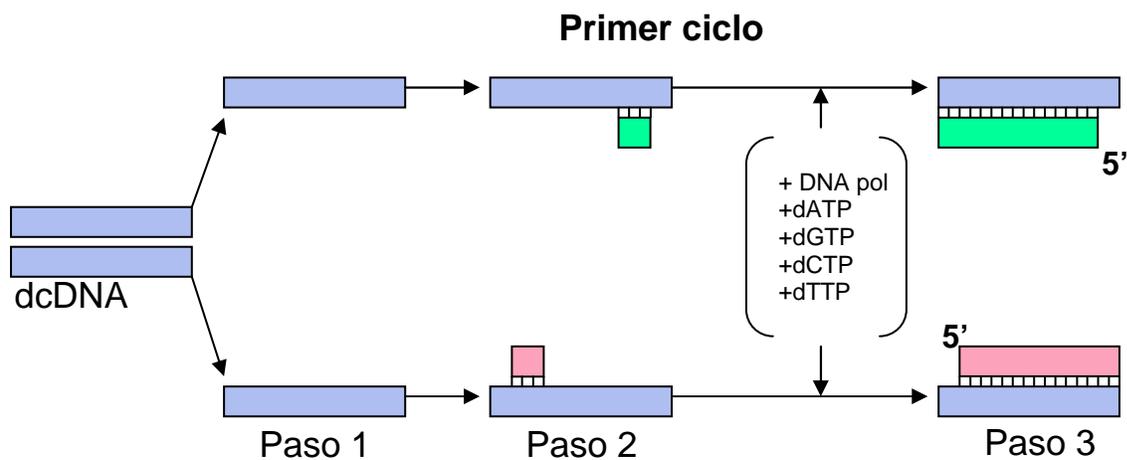


Fig 1 : Reacción en cadena de la polimerasa:

Paso 1: Calentamiento para la separación de las cadenas de DNA,

Paso 2: Hibridación de los oligonucleótidos,

Paso 3: Síntesis de DNA a partir de los oligonucleótidos

En cada ciclo se duplica la cantidad de DNA sintetizada, cada nuevo fragmento sirve como templado para la siguiente cadena, luego de varios ciclos el producto

predominante son fragmentos de DNA del tamaño correspondiente a la distancia entre el par de oligonucleótidos.

Para llevar a cabo la PCR se requieren oligonucleótidos, que son pequeños fragmentos de DNA (15-25 pb) que proporcionan un extremo 3'-OH libre para que la enzima Taq polimerasa pueda elongar la cadena colocando los dideoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) correspondientes, el MgCl₂ es un cofactor de la enzima, y se adiciona además una solución amortiguadora para controlar el pH y la fuerza iónica durante la reacción.

Para la tipificación de VPH se amplificaron 3 regiones localizadas en el gen L1 del virus, denominadas L1C1, MY y GP, con oligonucleótidos previamente reportados (Ver tabla 1 y Figura 2), además de la región B-globina como un control de la calidad del material genético de partida.

Tabla 1. Regiones del gen L1 amplificadas.

Nombre Oligo	Secuencia	Localización	Región	Tamaño (pb)
P13 P14	5' GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3' 5' -CCACTTGACCTACTTCAAC-3'	5203130-5203150 25203360- 55203380	B- globina	250
MY/11 MY/09	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3' 5' -CTAGTCAWAGGRRAMCCTGC-3'	6582-6601 7033-7013	MY	451
GP 5+ GP 6+	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC-3' TYATACTAAATGTCAAATAAAAAG-3'	6624-6646 6765-6741	GP	141
L 1 L 2	5' -CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTT-3' 5'-GTTATGTCTCATAAATCCCAT-3'	5609-5632 5861-5841	L1	252

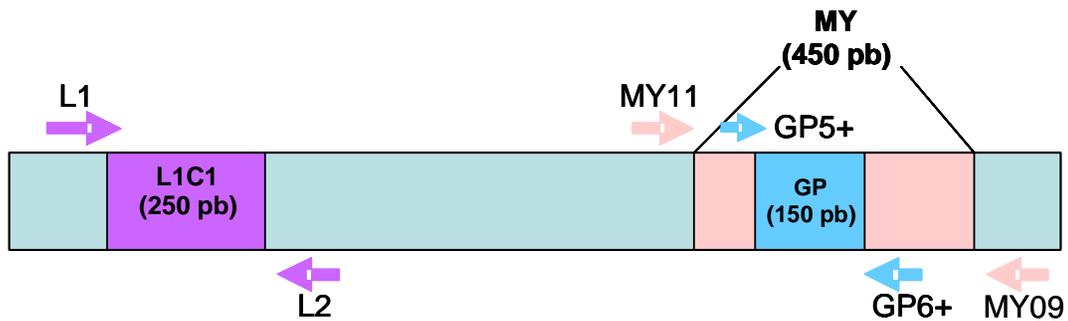


Fig. 2: Mapa de oligonucleótidos en el gen L1 de los VPH

La mezcla de reacción para la B-globina se preparó con una concentración final de 25 mM de solución amortiguadora, 2.0 mM de cloruro de magnesio, 200 μ M de dNTP's, 1 μ M de cada oligonucleótido, 0.5U de enzima Taq polimerasa y 500 ng de DNA en un volumen total de 25 μ L. Para las demás regiones solo cambió la concentración de cloruro de magnesio, para la región MY 2.0 mM de $MgCl_2$, para L1C1 3.0 mM de $MgCl_2$ y para GP 3.5 mM de $MgCl_2$ y para la región GP 1U de enzima.

Como control positivo se utilizó una mezcla de muestras positivas para VPH 16, como control negativo de la PCR, se utilizó una mezcla de reacción con todos los componentes y agua estéril en vez de DNA.

Tabla 2. Ciclajes.

B-globina y MY	GP	L1C1
94°C - 2:30 min	94°C - 5:00 min	94°C - 2:30 min
40 ciclos	40 ciclos	40 ciclos
94°C - 0:30 min	94°C - 1:00 min	94°C - 0:30 min
55°C - 0:30 min	40°C - 2:00 min	45°C - 0:30 min
72°C - 0:30 min	72°C - 1:30 min	72°C - 0:30 min
72°C - 5:00 min	72°C - 4:00 min	72°C - 5:00 min

1. Purificación del DNA: Luego del corrimiento electroforético del fragmento de ADN amplificado por PCR se realiza la purificación por medio del kit de QIAGEN MR, el fundamento de esta purificación se basa en la solubilización de la agarosa y la adsorción selectiva del ADN a partículas de sílica-gel en presencia de altas concentraciones de sales. La posterior elusión del ADN se realiza con una solución baja en sales o con agua. Para la solubilización de la agarosa se emplea la solución QX 1, la cuál contiene una alta concentración de sales caotrópicas lo que ocasiona la ruptura de los puentes de hidrógeno entre los azúcares del polímero, además de disociar la unión de proteínas de unión al ADN. Para la adsorción del ADN se emplea el reactivo QIAEX II y es dependiente de la concentración de sales y del pH, cuando existe un ambiente aniónico, el ADN es adsorbido por las partículas de sílica-gel, la adsorción se ve beneficiada a pH entre 6.0 - 7.5.

Se realiza un lavado con el reactivo QX I para remover residuos de agarosa, posteriormente lavados con el reactivo PE remueve las sales y otras impurezas. Las partículas de sílica-gel y el ADN unido se secan a temperatura ambiente para remover el etanol residual, el cuál puede interferir en reacciones enzimáticas subsecuentes. La elusión eficiente del ADN se realiza a bajas concentraciones de sales y a un pH de 8.0 - 8.5, normalmente la elusión del ADN se realiza con TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH=8.0), Luego de la elusión, se centrifuga la muestra para que las partículas de sílica-gel se precipiten, el sobrenadante contiene entonces, el ADN limpio.

Como no hubo presencia de ADN de virus de papiloma humano de 69 subtipos diferentes, no se realizó la secuenciación, la cual se realiza para la identificación del subtipo.

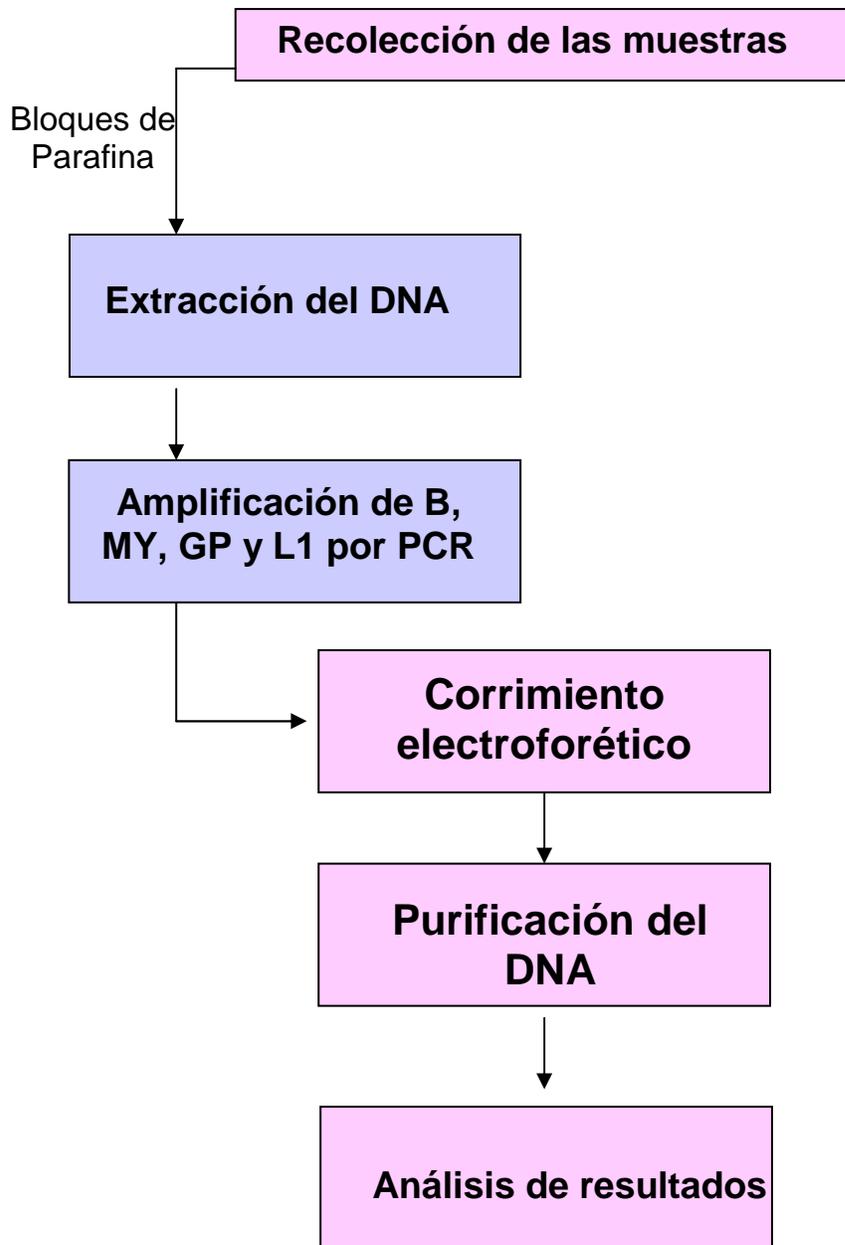


Figura 3: Diagrama de flujo general

7. RESULTADOS

De los 13 bloques de parafina con tejido de melanoma de mucosas primario recabados, 4 pertenecientes al Hospital Dr. Manuel Gea González, 6 de la clínica Peribact y 3 departamento de atención a la salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco , 10 muestras tuvieron DNA amplificable, confirmado por la positividad para la b-globina por técnica de PCR.

De estos 13 bloques de parafina con tejido de melanoma de mucosas la mayoría, (10), se encontraban en cabeza y cuello concordando con lo reportado en la literatura como los sitios más frecuentes de afección del melanoma de mucosas. (60). De esta localización 7 afectaban la mucosa oral y 3 afectaban la mucosa nasal. El melanoma oral es raro y representa desde 0.2 a 11% de todos los melanomas dependiendo del país que lo reporte. En nuestro estudio 7 afectaban esta mucosa y 3 afectaban mucosa nasal y paranasal, representando los primeros lugares en frecuencia de los melanomas de mucosa de esta muestra, concordando con alguna literatura, en que de la localización de cabeza y cuello los más frecuentes son los oronasales(60), como en nuestro estudio, sin embargo hay otras bibliografías que reportan que en cabeza y cuello los más frecuentes son los oculares(59) sin embargo en esta muestra no contamos con ninguno . Igualmente las edades en su mayoría fueron mayores a 65 años como se reporta en la literatura (Ver Tabla 3)

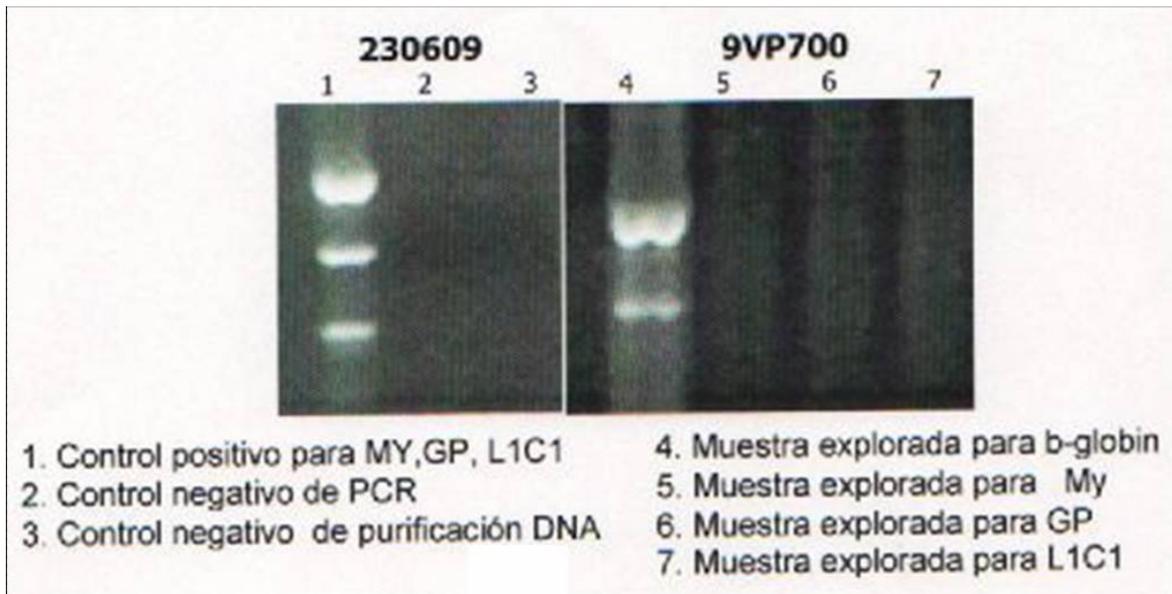
De los 13 bloques, 10 muestras tuvieron positividad para b-globina, significando suficiencia de material genético para ser analizadas y estar seguros de que los resultados de ser negativos no serían falsos negativos por falta de material genético. Diez muestras fueron positivas para b-globina por lo que fueron examinadas posteriormente a través de la técnica de PCR para la presencia de HPV. Se tuvieron controles positivos y negativos. Los controles positivos eran los primers de MY, GP, L1C1 para tejido con presencia de VPH 16, confirmándose la

presencia de este virus en los controles y así asegurando que no habría falsos negativos por la técnica. Se utilizó como control negativo agua en lugar de DNA para descartar que no hubiera contaminación y esto pudiera dar falsos positivos. No se encontró presencia de DNA viral de virus de papiloma humano en ninguna de las muestras de tejido de melanoma de mucosas.

Tabla 3. Resultados

Código	Edad	Sexo	Localización	DNA B-globina	DNA VPH
Mm1	67	Fem	Mucosa retromolar inferior	positivo	Negativo
Mm2	77	Mas	Encía y paladar	positivo	Negativo
Mm3	73	Fem	Encía y paladar	positivo	Negativo
Mm4	27	Fem	Cuerpo mandibular	positivo	Negativo
Mm5	46	Fem	Encía y paladar	positivo	Negativo
Mm6	86	Masc	Paladar	positivo	Negativo
Mm7	81	Fem	Fosa nasal	positivo	Negativo
Mm8	76	Fem	Seno maxilar	positivo	Negativo
Mm9	76	Fem	Paladar duro	positivo	Negativo
Mm10	46	Fem	Vulva	Negativo	Muestra insuficiente
Mm11		Fem	Vulva	Negativo	Muestra insuficiente
Mm12	85	Fem	Seno frontoetmoidal	No hubo tejido suficiente	Muestra insuficiente
Mm13	83	Mas.	Anorectal	Positivo	Negativo

Figura 4. Demostración del PCR.



8. DISCUSION

Aproximadamente el 15-20% de los melanomas surgen en cabeza y cuello. De éstos 80% (59) a 93.6% son cutáneos, los oculares representan el 4.9% y de las mucosas 1.5% aproximadamente.(55)

En un estudio se reporta que 55% de los melanomas afectan cabeza y cuello, 24% son anorectales, 18% en el tracto genital femenino y 3% en el tracto urinario. (61)

Los melanomas malignos de mucosas del tracto aerodigestivo representan 0.5% de los melanomas malignos de todos los lugares. Los sinonasales son raros representando menos del 1% y menos del 5% de las neoplasias sinonasales (59), en nuestro estudio representaron el 23%(3 muestras) de las 13 muestras. Los melanomas vulvares son el segundo cáncer más frecuente en la vulva y aunque el área de la vulva representa 1-2% de la superficie corporal, 3-7% de los melanomas ocurren aquí y además representan el sitio más frecuente de los melanomas del tracto urogenital, por lo que se sugiere que hay predisposición en esta área. (61)

En nuestro estudio representaron el 15% (2 muestras) de las 13 muestras.

El melanoma anorectal es muy raro se presenta después del melanoma de cabeza, cuello, tracto urogenital. Representan 0.04% de los tumores del tracto digestivo.(72)

En nuestro estudio solo hubo una muestra la cual representó el 7.6%. Y el más prevalente en nuestro estudio fue el melanoma de mucosa oral, debido a que la mayoría de las muestras fueron proporcionadas por servicios de patología oral. Sin embargo en la literatura se reporta que la mucosa oral y después la nasal son las más afectadas por este tumor. En nuestra serie fueron 7 tumores de mucosa oral representando el 54%. En cuanto al sexo 10 de las pacientes fueron mujeres y 3 hombres, contrario a lo reportado en la literatura (59,60). Un artículo publicado por Karam et al. donde se estudiaron las Características clínicas e histopatológicas del melanoma maligno en el Hospital General "Dr. Manuel Gea González" , se reporta que el melanoma en general en nuestra población fue mas frecuente en mujeres siendo de 2.1:1. (73) Coincidiendo con los datos de este estudio. En nuestro estudio las mujeres representaron el 77% de los casos y los hombres 23%.

En la literatura se ha relacionado la presencia de VPH como causa específica de diferentes tipos de cáncer (57) y ocasionalmente en melanomas cutáneos (58,62,63). y solo en un melanoma de la vulva (64).

Frecuentemente el virus de papiloma humano puede ser aislado de la región vaginal/vulvar, ano/rectal, y seno/nasal. (65)

El hecho que el VPH no se haya hallado en melanomas probablemente tiene que ver con que el VPH es un virus epiteliotrópico primordialmente. (66, 67) y los melanomas son neoplasias provenientes de la cresta neural (59). Sin embargo hay un estudio donde indica que en un cultivo de células de melanomas amelanicos, estas células pueden ser infectadas por VPH 16 con expresión subsecuente de E5. Estas células infectadas interesantemente presentan cambios en las actividades metabólicas pero no con alteraciones estructurales de las células. Se encontró que E5 interactúa con la bomba V-ATPasa, aumentando el pH intracelular y endosomal, aumentando la actividad de la tirosinasa condiciones contrarias al desarrollo del melanoma, por lo que estos investigadores se dieron a la tarea de investigar si la alcalinización endosomal y el aumento de la tirosinasa volvía más susceptibles a los melanomas amelanicos ante los agentes de quimioterapia. Se basaron en la noción de que el 3-4-DHBA es un prodroga simula dopamina la cual es un sustrato para la tirosinasa con la producción de intermediarios tóxicos. Viendo una disminución in Vitro importante de las células neoplásicas que presentaban expresión de E5 vs las que no la presentaban demostrando susceptibilidad aumentada a la apoptosis. Planteando para un futuro la posibilidad de su uso para disminuir la resistencia ante los agentes de quimioterapia. Por lo que como interacciona el virus del papiloma humano en el melanoma es un campo en el cual se requieren de muchos estudios aún para entender su interacción con estas células.

En este estudio no se encontró la presencia de VPH concordando con un estudio realizado por Dahlgren L. et al. En el cual de 45 muestras solo 2 muestras tuvieron presencia de VPH pudiendo representar contaminación o presencia del VPH independiente del melanoma. Igualmente ha habido estudios donde no se ha encontrado la presencia de herpes virus o poliomavirus como BK , JC, KI, WU , MCPyV y SV40 (69,70) en melanomas de mucosas por lo que probablemente la interacción viral de todos estos virus no juegue un papel clave en la génesis de estos melanomas y las mutaciones genéticas tengan un rol más importante como lo demuestra un artículo donde si se ha confirmado que hasta 28% de los melanomas en mucosas tiene mutaciones en el p53. (71) Las limitantes de este estudio es su tamaño de muestra siendo de 13 especímenes de los cuales 10 pudieron ser analizados. Tres muestras no se pudieron analizar por insuficiencia de DNA por lo que un estudio con muestras en fresco tendría mayor poder para preservar el material genético. Igualmente en el futuro podría intentarse un estudio multicéntrico de varios centros de referencia para estos tumores, ya que por la rareza de esta patología la obtención de especímenes debe hacerse multicéntrica, como en este estudio.

En conclusión en este estudio en población mexicana no se encontró la presencia de VPH en 10 muestras de melanoma de mucosas. Deberán seguirse buscando otros factores desencadenantes donde probablemente las mutaciones genéticas jugarán un papel clave en su génesis .

9. CONCLUSIONES

En conclusión en este estudio en población mexicana no se encontró la presencia de VPH en 10 muestras de melanoma de mucosas. Deberán seguirse buscando otros factores desencadenantes donde probablemente las mutaciones genéticas jugarán un papel clave en su génesis.

10. PERSPECTIVAS

Esta sección es para proponer estudios adicionales que permitan completar la información generada por el trabajo de tesis.

Los resultados de este estudio sugieren que no hay presencia de DNA de virus de papiloma humano en los melanomas de mucosas analizados en población mexicana, sin embargo cuenta con las limitantes de su naturaleza retrospectiva, el tamaño de la muestra siendo de 13 especímenes de los cuales 10 pudieron ser analizados. En un futuro podría realizarse un estudio con un número mayor de muestras, para lo cual se necesitaría una interacción entre diversas instituciones ya que el número de muestra de este estudio fue posible gracias a la participación de tres servicios institucionales diferentes así como la participación privada de un centro de patología bucal. Tres muestras no se pudieron analizar por insuficiencia de DNA por lo que un estudio con muestras en fresco tendría mayor poder para preservar el material genético y permitiría una mejor recolección de las muestras, dándole también un enfoque prospectivo.

11. BIBLIOGRAFIA.

1. Registro Histopatológico de las Neoplasias Malignas. Compendio de Cáncer. Secretaría de Salud 2001. México.
2. Martínez Saíd H. El primer Consenso Nacional de Expertos en Melanoma Vol. 4 Suplemento 2, 2005 en http://www.pisa.com.mx/recursos/melanoma/MEL_I.pdf .
3. Saúl A. Melanoma Maligno Lecciones de dermatología. 14ª. México. 2001:666-678.
4. Arenas R. Melanoma maligno. Atlas de dermatología diagnostico y tratamiento. 2ª. México: Mc Graw-Hill Interamericana,1996: 512-516.
5. Herrera A, Granados M, De la Barrera F. Melanoma Maligno IN: Herrera Angel. Manual de oncología. México: Mc Graw-Hill Interamericana, 2001. 478-488.
6. Parada RJ, Corona PB y Dorantes GL. Melanoma Maligno cutáneo. Perfil epidemiológico en México. GAMO. 2003;17-22
7. Martínez-Saíd H, Cuellar-Hubbe M, Barrón Velásquez E, Padilla RA, Herrera-Gómez A, López Graniel CM, De la Garza SJ, Mohar- Betancourt A. Epidemiology of cutaneous melanoma in México (1980-2002). Eur J Surg Oncol. 2004;30(2):163
8. Miller A., Mihm M.C. Melanoma N Engl J Med. 2006;355:51-65.
9. Gondivkar SM, Indurkar A, Degwekar S, Bhowate R. Primary oral malignant melanoma a case report and review of the literature. Quintessence Int. 2009;40(1):41-6.
10. Ragnarsson-Olding BK, Kanter-Lewensohn LR, Lagerlof B, Nilsson BR, Ringborg UK. Malignant melanoma of the vulva in a nationwide, 25-year study of 219 Swedish female: clinical observations and histopathological features. Cancer. 1999; 86(7): 1273- 84.
11. Jiveskog S, Ragnarsson-Olding B, Platz A, Ringborg U. N-ras mutations are common in melanomas from sunexposed skin of humans but rare in mucosal membranes or unexposed skin. J Invest Dermatol 1998;111:757-61.
12. Dahlgren L, Schedvins K, Kanter- Lweensohn L, Dalianis T. y Ragnarsson-Olding B. Human papilloma virus (HPV) is rarely detected in malignant melanomas of sun sheltered mucosal membranas. Acta Oncologica. 2005; 44: 694-699.
- 13 Ragnarsson-Olding BK. Primary malignant melanoma of the vulva - An aggressive tumor for modeling the genesis of non- UV light-associated melanomas. Acta Oncol 2004; 43(5):421-35.
- 14 Helmke BM, Renner M, Poustka A, Schirmacher P, Mollenhauer J, Kern MA. DMBT1 expression distinguishes anorectal from cutaneous melanoma. Histopathology 2009 Jan;54(2):233-40.

15. Fitzpatrick's. Neoplasms:Cutaneous Melanoma. *Dermatology in general medicine*. 6a ed. McGraw-Hill. EUA 2003:917-947.
16. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. *Nature* 1985;315:550-4.
17. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031-7.
18. Ottmann OG, Druker BJ, Sawyers CL, et al. A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias. *Blood* 2002;100:1965-71.
19. Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 2003; 22: 3042–52.
20. Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM, et al. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 894–903.
21. Meyskens FL Jr, Farmer PJ, Anton-Culver H. Etiologic pathogenesis of melanoma: a unifying hypothesis for the missing attributable risk. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2581
22. Tsao H, Zhang X, Benoit E, Haluska FG. Identification of PTEN/MMAC1 alterations in uncultured melanomas and melanoma cell lines. *Oncogene* 1998; 16: 3397–402.
23. Dong J, Phelps RG, Qiao R, et al. BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. *Cancer Res* 2003; 63: 3883–85.
24. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003; 33: 19–20.
25. Uribe P, Wistuba, II, Gonzalez S. BRAF mutation: a frequent event in benign, atypical, and malignant melanocytic lesions of the skin. *Am J Dermatopathol* 2003; 25: 365–70.
26. Sharpless E, Chin L. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene* 2003; 22: 3092–98.
27. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003; 22: 3138–51.
28. Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001; 409: 207–11.
29. Alonso S.,Ortiz P., Pollan M.P. Progression in Cutaneous Malignant Melanoma Is Associated with Distinct Expression Profiles. *Am J Pathol* 2004, 164:193–203.
30. Bosserhoff A. Novel biomarkers in malignant melanoma. *Clinica Chimica Acta* 367 . 2006, 28– 35.

31. Utikal J, Schadendorf D, Ugurel S, Serologic and immunohistochemical prognostic biomarkers of cutaneous malignancies. *Arch Dermatol Res* 2007, 298:469–477.
32. Fitzpatrick`s. Neoplasms:Cutaneous Melanoma. *Dermatology in general medicine*. 7a. McGraw-Hill. EUA 2007; 1134-
33. Coleman WP III, Loria PR. Reed Rj et al : Acral lentiginous melanoma. *Arch Dermatol* 1980; 116: 773-776.
34. Barnhill RL, Mihm MC. The histopathology of cutaneous malignant melanoma. *Sem Diag Patol* 1993;10:47-75
35. Cameron RB. *Practical Oncology*. Montevideo, Uruguay: Appleton & Lange, 1994:131-147.
36. Glass A, Hoover R. The emerging epidemic of melanoma and squamous cell skin cancer. *JAMA* 1989; 262: 2097-2100.
37. Gutiérrez Vidrio RM, Cortés Lozano N. Confrontando al melanoma en el siglo XXI. *Med Cutan Iber Lat Am* 2007;35(1):3-13)
38. Thompson JF. Scolyer RA. Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2005;365: 687-701.
39. DuncanLM, DeedsJ,CroninFE, Donovan M, Sober AJ, Kauffman M, McCarthy JJ. Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19:568-76.
40. Estadísticas del Servicio de Dermatooncología del Hospital General de México. México, 2002.
41. Estadísticas del Servicio de Dermatología del Instituto Nacional de Cancerología. México, 2004.
42. Estadísticas del Servicio de Dermatooncología del Centro Dermatológico “Dr. Ladislao de la Pascua”. México, 2002.
43. Robertson GP. Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma: *Cancer Metastasis Rev* 2005;24:273-85.
44. Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. *J. Clin Oncol* 2005;23:1473-82.
45. Easty DJ, Hill SP, Hsu MY, et al.Up-regulation of ephdrin-A1 during melanoma progression. *Int J Cancer* 1999;84:494-501.
- 46 Hussein MR, Haemel AK, Wood GS. Apoptosis and melanoma:molecular mechanisms. *J Pathol* 2003;199:275-88.

47. Soengas MS, Capodieci P, Polsky D, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001;409:207-11.
48. Mustika R, Budiyo A, Nishigori C, Ichihashi M, Ueda M. Decreased expression of Apaf-1 with progression of melanoma. *Pigment Cell Res* 2005;18:59-62.
49. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003;22:8590-607.
50. Cerroni L, Soyer HP, Kerl H. Bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol* 1995;17:7-11.
51. Moon RT, Bowerman B, Boutros M, Perrimon N. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 2002;296:1644-6.
52. Morin PJ. Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 1999;21:1021-30.
53. Haritopoulos KN, Lazaris AC, Kavantzias N, Tseleni-Blafouta S, Thomopoulou G, Aroni K. ICAM-1 and beta(3) integrin immunoreactivity in malignant melanoma cells: can they be used as additional predictors? *APMIS* 2003;111:421-9.
54. Klein G, Klein E. Surveillance against tumors--is it mainly immunological?. [Immunol Lett.](#) 2005 Aug 15;100(1):29-33.
55. Helmke BM, Otto HF. Anorectal melanoma. A rare and highly malignant tumor entity of the anal canal. *Pathologe*.2004May;25(3):171-7.
56. Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:690-698.
57. De Villiers E-M, Ruhland A, Sekaric P. Human papillomaviruses in nonmelanoma skin cancer. *Semin Cancer Biol.* 1999; 9:413-422.
58. Miracco C., Palumbo N., Lavergne D., Aggrey Nyong H., Tosi P., de Villiers E.M.. Malignant Melanomas: Search for Human Papillomaviruses. *Arch. Dermatol.* 2001; 137: 826-827.
59. Bothale KA, Maimoon SA, Patrikar AD, Mahore SD. Mucosal malignant melanoma of the nasal cavity. *J Cancer* 2009;46:67-70
60. Pour H. Malignant melanoma of the oral cavity: A review of literature. *Indian J Dent Res* 2008;19:47-51.
61. Piura B. Management of primary melanoma of the female urogenital tract. *Lancet Oncol.* 2008; 9: 973-81
62. Scheurlen W, Gissman L, Gross G, Zur Hausen H. Molecular cloning of two new HPV types (HPV 37 and HPV 38) from a kerato-acanthoma and a melanoma. *Int J Cancer* 1986; 37: 505-10.

63. Dreau D, Culberson C, Wyatt S, Holder WJ. Human papilloma virus in melanoma biopsy specimens and in relation to melanoma progression. *Ann Surg.* 2000; 231(5): 664-71.
64. Rohwedder A, Philips B, Malfetano J, Kredentser D, Carlson AJ. Vulvar malignant melanoma associated with human papillomavirus DNA: Report of two cases and review of literature. *Am J Pathol* 2002; 24(3): 230-40.
65. Zur Hausen H. Papillomavirus infections a major cause of human cancers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1288: F55- 78.
66. Le Poole IC vdB, van den Wijngaard RM, Galloway DA, van Amstel PJ, Buffing AA, Smits HL, et al. Generation of a human melanocyte cell line by introduction of HPV16 E6 and E7 genes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1997; 33(1): 42- 9.
67. Howley PM. Papilloma viridae and their replication. In: Field BN, Knipe DM, et al, editors. *Virology*, 2nd ed. New York: Ravenpress Ltd; 1990. p. 1625- 50.
68. Domenico F., Foppoli C., Blarzino C., Perluigi M., Paolini F. , Morici S., Cocía R., Cini C. y De Marco F. Expression of human papilloma virus type 16 E5 protein in amelanotic melanoma cells regulates endo-cellular pH and restores tyrosinase activity. *JECCT.* 2009; 28:4.
69. Lundberg R, Brytting M, Dahlgren L, Kanter-Lewensohn L, Schloss L, Dalianis T, Ragnarsson-Olding B. Human herpes virus DNA is rarely detected in non-UV light-associated primary malignant melanomas of mucous membranes [Anticancer Res.](#) 2006 Sep-Oct;26(5B):3627-31
70. Giraud G, Ramqvist T, Ragnarsson-Olding B, Dalianis T. DNA from BK virus and JC virus and from KI, WU, and MC polyomaviruses as well as from simian virus 40 is not detected in non-UV-light-associated primary malignant melanomas of mucous membranes. [J Clin Microbiol.](#) 2008 Nov;46(11):3595-8.
71. Ragnarsson-Olding BK, Karsberg S, Platz A, Ringborg UK. Mutations in the TP53 gene in human malignant melanomas derived from sun-exposed skin and unexposed mucosal membranes. [Melanoma Res.](#) 2002 Oct;12(5):453-63.
72. [Zhong J](#), [Zhou JN](#), [Xu FP](#), [Shang JQ](#). Diagnosis and treatment of anorectal malignant melanoma--a report of 22 cases with literature review. [Ai Zheng.](#) 2006 May;25(5):619-24.
73. Karam M., Toussaint S., Domínguez J. y Veja E. Características clínicas e histopatológicas del melanoma maligno en el Hospital General "Dr. Manuel Gea González". *Gac Med Mex* .2008: 144 (3); 219-223.