



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ”**

**“Determinación de CD117(cKit) , Ki67(MiB1), ciclina D1, Bcl-2 y p16 mediante inmunomarcación (inmunohistoquímica) en Nevos de Spitz, tumores Spitzoides limítrofes y melanoma spitzoide”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN:**

**DERMATOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**DRA. ESMERALDA PATRICIA OCHOA SÁNCHEZ.**

**TUTORES:**

**DRA. SONIA TOUSSAINT CAIRE**

**DRA. MARIA ELISA VEGA MEMIJE**

**DR. RONELL BOLOGNA MOLINA**

**MEXICO, DF.**

**JULIO 2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

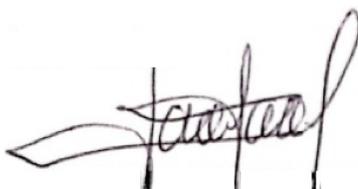
Este trabajo fue realizado en la Secretaría de Salud, Hospital General Dr. Manuel Gea González; División de Dermatología: Secciones de Dermatología Clínica y Dermatopatología; En colaboración con el Dr. Ronell Bologna Molina del Departamento de Investigación de la Escuela de Odontología de la Universidad Juárez del estado de Durango, por la Dra. Esmeralda Patricia Ochoa Sánchez con la dirección y supervisión de la Dra. Sonia Toussaint Caire y la Dra. María Elisa Vega Memije.

Este trabajo de Tesis con No. PROT. 06-58-2012 presentado por el alumno Esmeralda Patricia Ochoa Sánchez se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la tesis la Dra. Sonia Toussaint Caire, y la División de Enseñanza e Investigación a cargo del Dr. Octavio Sierra Martínez con fecha del para su impresión final.



**DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN**

**DR. OCTAVIO SIERRA MARTINEZ**



**TUTOR PRINCIPAL**

**DRA. SONIA TOUSSAINT CAIRE.**

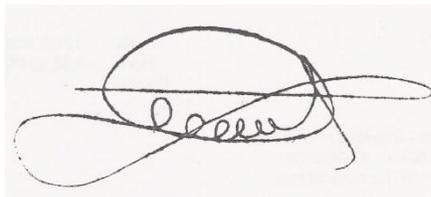
**AUTORIZACIONES.**



**DR. OCTAVIO SIERRA MARTÍNEZ**  
**DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN**  
**HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ”**



**DRA. MARIA ELISA VEGA MEMIJE**  
**SUBDIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**  
**HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ”**



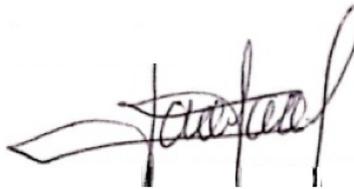
**DR. LUCIANO DOMÍNGUEZ SOTO**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE DERMATOLOGÍA**  
**HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ”**

**“Determinación de CD117(cKit) , Ki67(MiB1), ciclina D1, Bcl-2 y p16 mediante inmunomarcación (inmunohistoquímica) en Nevos de Spitz, tumores Spitzoides limítrofes y melanoma spitzoide”**

**COLABORADORES:**



**DRA. ESMERALDA PATRICIA OCHOA SÁNCHEZ**



**DRA. SONIA TOUSSAINT CAIRE**



**DRA. MARIA ELISA VEGA MEMIJE**



**DR. RONELL BOLOGNA MOLINA**

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre por ser siempre un ángel en mi vida, GRACIAS Gloria porque sin ti esto nunca hubiera sucedido.

A mi marido, por su apoyo incondicional y amor durante este largo camino...

A mi hija MaFer, eres el motor que me impulsa a seguir adelante todos los días, por ti todo vale la pena.

A mis hermanos... Queta, Male y Oscar...gracias por su apoyo, por su amor, por su incondicionalidad, por siempre estar ahí...los amo!!

Maritza gracias por ser parte de mi familia, por apoyarme y por ser mi amiga...

A la Dra. Sonia Toussaint, la Dra. Elisa Vega, al Dr. Ronell Bologna, al Dr. Saúl Lino, al Dr. Martínez Said y a la Dra. Tere Vega por creer en una idea y ayudarme a hacerla tangible, gracias a todos ustedes porque sin su apoyo este trabajo no existiría, gracias por creer en mi.

A Adri, Pris, Jis, Aleja, Karen y Tamar, por seguir este camino a mi lado...gracias por su apoyo y cariño en esta travesía...

A mis jefes de servicio y adscritos...Dr. Domínguez, Dra. Hojyo, Dr. Arenas, Dra. Domínguez, Dra. Lacy, Dr. Contreras, Verito, Dani, Marcia, Angie, Josecito, Adán, Gaby y Elsitita, gracias a todos ustedes por su confianza y por darme la oportunidad de pertenecer a este lugar y ser parte de la Dermatología, gracias por sus enseñanzas y por su cariño, porque todos ustedes han dejado una huella muy grande en mi, en el aspecto académico y en el personal...GRACIAS DERMAGEA!!

## INDICE

Glosario.....	9
Relación de tablas y figuras.....	10
Resumen.....	11
Abstract.....	12
1. Introducción.....	13
2. Marco Teórico.....	19
2.1 p16.....	19
2.2 Ciclina D1 .....	20
2.3 Ki67 (MiB1).....	21
2.4 Bcl2.....	21
2.5 CD117 (cKit).....	22
3. Justificación .....	24
4. Planteamiento del problema.....	25
5. Objetivos.....	25
5.1 Objetivo principal .....	25
5.2 Objetivo secundario.....	25
6. Hipótesis.....	25
7. Material y Métodos .....	25
7.1 Diseño del estudio.....	25
7.2 Universo de estudio.....	25
7.3 Población blanco.....	26

7.4 Tamaño de la muestra.....	26
7.5 Criterios de selección.....	26
7.6 Definición de variables.....	26
7.7 Análisis estadístico.....	28
8. Resultados.....	28
9. Discusión.....	35
10. Conclusiones.....	49
11. Bibliografía.....	50

## **GLOSARIO:**

**HyE:** Hematoxilina y eosina.

**Ckit:** CD117

**CD1:** ciclina D1

**Ki-67:** marcador de proliferación celular o MiB1

**p16:** proteína p16

**NS:** Nevo de Spitz

**TSL:** Tumor Spitzoide limítrofe

**MMS:** Melanoma spitzoide

## RELACIÓN DE TABLAS Y FUGURAS:

### TABLAS:

**Tabla 1.** Características Clínicas e histológicas de tumores Spitzoides.

**Tabla 2.** Estratificación del riesgo de tumores spitzoides atípicos.

**Tabla 3.** Resumen de variables demográficas.

**Tabla 4.** Características histológicas arquitecturales.

**Tabla 5.** Características citológicas de los melanocitos en lesiones spitzoides.

**Tabla 6.** Resultados de inmunomarcación.

### FIGURAS:

**Figura 1.** Histología del espectro de lesiones Spitzoides. (Nevo de Spitz/Tumor spitzoide atípico/Melanoma spitzoide).

**Figura 2.** Vías de señalización y mutaciones en lesiones spitzoides y melanoma.

**Figura 3.** Características arquitecturales de los NS, NSD, TSL y MMS.

**Figura 4.** Características de los melanocitos de las lesiones spitzoides.

**Figura 5.** Inmunomarcación de tumores spitzoides.

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** Las neoplasias spitzoides conforman un grupo de tumores melanocíticos dentro de los que se considera el nevo de Spitz (NS) y sus variantes, nevo de Spitz displásico (NSD), el tumor Spitzoide limítrofe de comportamiento biológico incierto (TSL) así como el melanoma Spitzoide (MMS). Éstos actualmente constituyen una problemática importante en el diagnóstico tanto clínico como histológico, ya que pueden semejarse entre sí, confiriendo dificultad en el manejo de los mismos así como en el pronóstico. **OBJETIVOS:** Describir la expresión de marcadores de inmunohistoquímica como CD117, Ki67, Bcl-2, ciclina D1 y p16 en nevos de Spitz y tumores spitzoides atípicos así como las características clínicas e histológicas de los nevos de Spitz y tumores spitzoides atípicos en nuestra población de estudio. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Se incluyeron todos los bloques disponibles de parafina de biopsias de piel realizadas de 1997 a 2012 con diagnóstico de nevo de Spitz, tumor spitzoide limítrofe y melanoma spitzoide del archivo de dermatopatología del Hospital Manuel Gea González. Se llevó a cabo la determinación de la expresión de CD117(CKit), Ki67(MiB1), Bcl-2, ciclina D1 y p16 mediante inmunomarcación con anticuerpos monoclonales según las instrucciones del fabricante en cada caso. **RESULTADOS:** Se incluyeron 30 casos de los cuales 18 correspondieron a NS, 4 NSD, 3 TSL y 5 MMS. Los tumores Spitzoides en general predominaron en más de 60% de los casos en las mujeres y en los miembros inferiores. La media de edad de presentación para los NS y NSD fue de 15.3 y 16.7 años respectivamente, 7 años para los TSL y 45 años para los MMS. En la revisión histológica solo el 33% de los TSL presentó hiperplasia epidérmica; la ulceración fue más frecuente en los MMS (20%), los cuerpos de Kamino no se observaron en el 100% TSL. El tipo celular más frecuente fue el melanocito epitelioides, y el citoplasma de aspecto polvoso fue más evidente en los TSL y en todos los casos de MMS. Las mitosis fueron  $>2/mm^2$  en los NS, NSD y TSL. Los nucleolos se evidenciaron más en TSL y en MMS (2-3n y 3-5n respectivamente). En cuanto a la inmunomarcación el Ki67 fue bajo en NS y TSL (1.6 y 2%) mientras los NSD y MMS lo expresaron más (10 y 20%). El 100% de los TSL fue p16 positivo mientras en los MMS fueron de menos de 1%. La ciclina D1 se expresó en el 46.4% de los MMS, el CD117 se expresó en el 50% de los NSD y en más del 20% de los NS y TSL, mientras en los MMS fue menor al 1%. Bcl-2 solo se expresó en NS y TSL (22 y 33%). **CONCLUSIONES:** El TSL posee características histológicas atípicas pero por inmunomarcación se comportó como NS. La expresión de Ki67 y p16, además de la

revisión de las características histológicas podrían auxiliar en la diferenciación del MMS de otros tumores spitzoides.

## **ABSTRACT:**

**INTRODUCTION:** Spitzoides neoplasms are a group of melanocytic tumors within is considered the Spitz nevus (SN) and its variants, dysplastic Spitz nevus (NSD), atypical spitzoid tumor (TSL) and spitzoid melanoma (MMS). They are currently a major problem in diagnosis because they can resemble each other, giving difficulty in handling them as well as prognosis. **OBJECTIVES:** To describe the immunohistochemical expression of markers such as CD117, Ki67, Bcl-2, cyclin D1 and p16 in Spitz nevi and atypical spitzoides tumors and the clinical and histologic features of Spitz nevi and atypical spitzoide tumors in our study population. **MATERIALS AND METHODS:** We included all available paraffin blocks of skin biopsies performed from 1997 to 2012 with diagnosis of Spitz nevus, atypical spitzoid tumors and spitzoid melanoma of dermatopathology archives. Was conducted to determine the expression of CD117 (cKit), Ki67 (MIB1), Bcl-2, cyclin D1 and p16 by immunostaining with monoclonal antibodies according to the manufacturer's instructions in each case. **RESULTS:** We included 30 cases of which 18 corresponded to NS, NSD 4, 3 and 5 MMS TSL. Spitzoid tumors generally prevailed in over 60% of cases in women and in lower limbs. The mean age of presentation for the NS and NSD was 15.3 and 16.7 years respectively, for 7 years for TSL and 45 years for MMS. On histologic review only 33% of TSL showed epidermal hyperplasia, ulceration was more frequent in the MMS (20%), Kamino bodies were not observed in 100% TSL. The most common cell type was epithelioid melanocytes, and dusty cytoplasm was more evident in the TSL and in all cases of MMS. Mitoses were <2/mm<sup>2</sup> in the NS, NSD and TSL. The nucleoli were seen more in TSL and MMS. As for the Ki67 immunostaining was low in NS and TSL (1.6 and 2%) while the NSD and MMS expressed by most (10 and 20%). 100% of the TSL was p16 positive while the MMS were less than 1%. Cyclin D1 was expressed in 46.4% of the MMS, the CD117 was expressed in 50% of the NSD and more than 20% of NS and TSL, while MMS was less than 1%. Bcl-2 was expressed only in NS and TSL (22 and 33%). **CONCLUSIONS:** TSL presented atypical histologic features but has acted more like NS for immunostaining. The expression of Ki67 and p16, in addition to the review of the histological features may aid in differentiation from other tumors spitzoides of MMS.

## **1. INTRODUCCION**

Las neoplasias spitzoides conforman un grupo de tumores melanocíticos que constituyen una problemática importante en el diagnóstico tanto clínico como histológico.

Actualmente dentro de las neoplasias spitzoides en general se consideran el nevo de Spitz y sus variantes, el tumor Spitzoide limítrofe de comportamiento biológico incierto así como el melanoma Spitzoide. (Tabla 1, Figura 1).

### **Nevo de Spitz.**

El nevo de Spitz tiene una importancia particular, ya que aunque tiene un comportamiento benigno biológicamente y por ende buen pronóstico, histológicamente puede ser confundido con un melanoma. También se le conoce como melanoma benigno juvenil, nevo de células grandes ahusadas y/o epitelioides.

La primera descripción de nevos de spitz se llevo a cabo en población pediátrica en 1948 por Sophie Spitz. Se describieron como lesiones melanocíticas que a la histología semejaban melanomas pero que tenían un comportamiento biológico benigno, por o que se les llamó “melanomas juveniles o de la infancia”(1,2). Posteriormente se reportó su presencia en adultos, enfatizando en su comportamiento benigno. (2, 3).

### **Histología de nevos de spitz.**

Para hacer el diagnóstico histológico de estas lesiones se requiere de una evaluación cuidadosa de características tanto arquitectónicas como citológica en toda la lesión.

### **Arquitectura.**

La mayoría de los nevos de Spitz son compuestos pero se pueden presentar como lesiones con componente únicamente de unión o puramente intradérmicos. Las características comúnmente encontradas en estos nevos incluyen la presencia de simetría, ausencia de extensión lateral de las células del componente de unión más allá del componente dérmico, limitación lateral de la lesión mediante nidos de unión (terminan en nidos), hiperplasia epidérmica con tendencia a la uniformidad, presencia de diseminación pagetoide que tiende a ser en los tercios inferiores de la epidermis y al centro de la lesión, aunque si se encuentra un gran componente de unión está puede ser

más extensa. Los nidos tienden a ser perpendiculares a la epidermis (verticalizados) y presentan retracción del estroma.

En la unión dermoepidérmica también se describe la presencia de cuerpos de Kamino, que se observan como agrupados eosinofílicos redondos solitarios o agrupados dentro de la epidermis, por arriba de la dermis papilar. Éstos son teñibles con ácido peryódico de Schiff (PAS), así como con tinciones para colágeno tipo con tricrómico de Masson. Además se ha determinado en ellos la presencia de subtipos específicos de colágeno como el tipo IV y VII, así como laminina (componentes de la membrana basal). (3-4)

El componente dérmico presenta maduración y puede haber mitosis escasas en la parte más superficial de éste. Otras características histológicas incluyen la presencia de telangiectasias en la dermis superficial. (5 -7)

### **Características citológicas.**

Las células névicas son ahusadas y/o epitelioides. Las células epitelioides son grandes (hasta 4 veces el tamaño de un melanocito normal) con una forma redonda o poligonal.

En los nevos con células ahusadas así como mixtos pero con mayor tendencia a las células fusiformes presentan una distribución en mantos o fascículos. Por el contrario, en los que predominan las células epitelioides tienen una distribución más individual. Pueden encontrarse células multinucleadas pero no muestran pleomorfismo significativo. Los nucléolos son generalmente prominentes y redondos, sobre todo en las células névicas de tipo epitelioides. (5-7).

### **Variantes.**

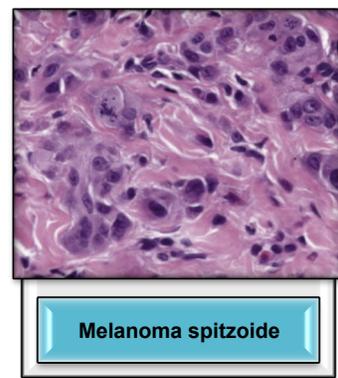
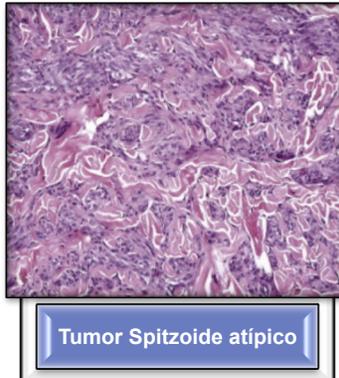
Se han descrito un número importante de variantes del nevo de Spitz. Entre éstas se incluye al nevo de Reed (Spitz pigmentado), nevo halo de Spitz, nevo tubular de Spitz, nevo de Spitz desmoplásico, nevo de Spitz plexiforme, Nevo de Spitz pagetoide, nevo de Spitz mixoide, angiomaso, combinado y hialinizante. La forma pigmentada del nevo de Spitz se conoce como nevo pigmentado de células ahusadas de Reed y es más frecuente en individuos de fototipos más oscuros. (5, 8-12).

**Tabla 1: Características Clínicas e histológicas de tumores Spitzoides.**

Características	Nevo de Spitz	Tumor spitzoide atípico	Melanoma Spitzoide
<b>Clínica</b>	Lesión nodular menor a 6mm, color rojo violáceo o pigmentada café marrón obscuro, simétrica y bien definida que se presenta en extremidades de niños menores a 10 años de edad.	Lesión nodular irregular, de un centímetro o más, asimétrica, de bordes irregulares, que puede presentar ulceración, y es más frecuente de los 10 a los 20 años de edad y la topografía predominante es la espalda.	Lesión nodular mayor a 1cm, irregular. Asimétrica, colores no homogéneos, puede haber ulceración.
<b>Histología</b>	Puede tener componente de la unión, ser dérmico o compuesto. No hay alteraciones en la arquitectura de la epidermis o puede estar ligeramente hiperplásica y con escasa diseminación pagetoide de melanocitos solo al centro de la lesión y en la epidermis inferior. Hay simetría en la lesión, bien definida en los bordes, hay retracción de los nidos de melanocitos en la unión dermoepidérmica,	La epidermis puede estar ulcerada, Hay nidos de melanocitos dispuestos de forma azarosa, infiltrantes, pueden llegar hasta el tejido celular subcutáneo, conforman una lesión asimétrica, mal definida, sin retracción de los nidos de la unión dermoepidérmica.	Epidermis con paraqueratosis y atrofia. Neoformación asimétrica, mal circunscrita, diseminación pagetoide en todo el espesor de la epidermis, ausencia de cuerpos de Kamino. Presencia de patrón infiltrante en la profundidad, melanocitos grandes hacia la base de la lesión.
<b>Maduración</b>	Si	No	No

Cuerpos de Kamino	Si	No	No
Mitosis	<2/mm2.	>2 a 6 /mm2	>5/mm2 (profundidad)
Tipo de Melanocitos	Ahusados o epitelioides	Heterogéneos.	Heterogéneos
Citoplasma de melanocitos	Opaco o en vidrio despulido	Granular, de aspecto polvoso.	Granular, aspecto polvoso.
Núcleo de melanocitos	Pequeños, cromatina fina y dispersa	Grandes, hipercromáticos.	Pleomórfico, hipercromático.
Nucleolos	Uniformes	Grandes, eosinófilos.	Prominentes, eosinófilos.

Figura 1. Histología del espectro de lesiones Spitzoides. (Nevo de Spitz/Tumor spitzoide atípico/Melanoma spitzoide).



## **Tumores Spitzoides limítrofes.**

En 1960 Kernén y Ackerman reportaron casos de “nevus de Spitz metastásicos”, mismos que a posteriori se consideraron como casos de melanoma mal diagnosticados.(2,3)

Posteriormente en 1970, Huarte realizó las primeras descripciones de “tumores spitzoides atípicos” y en 1989 Smith y colaboradores hicieron uso del término “Nevo con células epiteloides y ahusadas con atipia y metástasis” pero con un comportamiento biológico benigno. (13-14). En 1999 Barnhill desató una controversia al reportar la muerte de una paciente femenina, en la pubertad que padecía una lesión spitzoide de características típicas. (1-2,15).

Estas lesiones muestran atipia arquitectónica y citológica en un grado mayor que el aceptado para un nevo de Spitz común. Sin embargo éstas no son suficientes para considerar la lesión un melanoma. Es importante destacar que no existe un número de alteraciones establecido para considerar el diagnóstico de tumor Spitzoide atípico. En estos casos la edad del paciente es siempre un factor determinante para el diagnóstico diferencial, siendo siempre más permisivas en la población pediátrica. (1-2,13-15)

En el componente de unión estas lesiones tienden a presentar una proliferación desordenada de melanocitos, asimetría y extensión lateral del componente intraepidérmico. En la variante intradérmica puede presentarse un incremento en la celularidad, asimetría, pérdida de la cohesión celular, aumento de la profundidad, ausencia de maduración, ulceración y necrosis. Puede existir un pleomorfismo nuclear marcado así como incremento de las mitosis en la profundidad de la lesión.

Por esta razón se ha propuesto que estas lesiones se categoricen en 2 grupos principales para intentar predecir el comportamiento biológico y se dividen en de bajo y alto riesgo. Para llevar a cabo esta clasificación se debe tomar en cuenta la edad del paciente, el tamaño de la lesión y las características histológicas. Por otra parte Spatz y cols desarrollaron un sistema de estadificación de los tumores Spitzoides atípicos el cual se basa en la edad del paciente, el diámetro de la lesión así como la profundidad, ulceración y actividad mitótica. Lo anterior resulta en 3 categorías de riesgo, con puntajes de 0-2 indica bajo riesgo, 3-4 riesgo intermedio y 5-11 riesgo elevado. (16-17) **(TABLA 2)**.

## Melanoma spitzoide.

No existe un criterio único o un conjunto de criterios que permita diferenciar a los nevos de Spitz de los melanomas de forma confiable. Muchos autores han documentado las características que pueden ayudar en este proceso. La mayoría de ellos coinciden en que las características histológicas que favorecen el diagnóstico de melanoma incluyen: actividad mitótica de moderada a marcada y / o la presencia de mitosis atípicas; diseminación pagetoide prominente y en forma individual a través de la totalidad de la lesión incluyendo la periferia (en ausencia de evidencia de trauma), la falta de maduración en la profundidad de la lesión; hipercromatismo nuclear así como pleomorfismo celular, ulceración y necrosis. (16-21).

**Tabla 2. Estratificación del riesgo de tumores spitzoides atípicos.**

Parámetro	Puntaje
<b>Edad</b>	
0-10 años	0
11-17 años	1
<b>Diámetro (mm)</b>	
0-10	0
>10	1
<b>Involucro del tejido celular subcutáneo.</b>	
Ausente	0
Presente	2
<b>Ulceración</b>	
Ausente	0
Presente	2
<b>Mitosis por mm<sup>2</sup></b>	
0-5	0
6-8	2
>8	5
<b>Total</b>	<b>11 puntos</b>

Estratificación del riesgo: 0-2 puntos bajo riesgo; 3-4 riesgo intermedio; 5-11 riesgo alto. Tomada de: Spatz A, Calonje E, Handfield-Jones S, Barnhill RL. Spitz tumors in children: a grading system for risk stratification. Arch Dermatol 1999;135: 282-285.

## 2. MARCO TEORICO

Actualmente el diagnóstico histológico de lesiones spitzoides atípicas continúa siendo un reto, con desconocimiento del potencial de malignidad, e incluso algunos autores sugieren que quizá estos tumores atípicos no sean más que melanomas mal diagnosticados. Es por esto que se ha creado una nueva categoría denominada como “Tumores melanocíticos de potencial maligno incierto”, considerándose intermedios entre los nevos de Spitz típicos y el melanoma spitzoide, siendo los factores histológicos más importantes en el pronóstico la presencia de actividad mitótica, mitosis cerca de la profundidad de la lesión e inflamación. (15,22). **(Tabla 1 y Figura 1).**

Existen algunos marcadores que pueden auxiliar en la diferenciación de estos tumores, aunque los resultados publicados son variables de serie a serie. Entre los marcadores reportados previamente en el diagnóstico de lesiones melanocíticas en general destacan la ciclina D1 y la proteína p16 que son dos reguladores importantes de la progresión del ciclo celular (uno regulador negativo y otro positivo de forma respectiva), además del MIB1 (Ki67) como marcador de proliferación celular y la proteína bcl-2 como reguladora de apoptosis celular. Ninguno de estos estudiado en lesiones spitzoides en latinoamericanos.

### 2.1 P16

La proteína p16 también es conocida como INK4A o p16INK4A. Es el producto del gen del melanoma familiar CDKN2A. Esta proteína es capaz de inhibir las cinasas dependientes de ciclinas (KDC) en la fase G1 del ciclo celular (cinasas dependientes de ciclinas 4 y 6). En ausencia de un p16 funcional, estas cinasas dependientes de ciclinas fosforilan e inactivan los productos de genes supresores de tumor como el gen del retinoblastoma, lo que resulta en progresión del ciclo celular y finalmente incremento en la proliferación celular. (23-25)

Los nevos ordinarios típicamente muestran inmunoreactividad importante para p16 en el núcleo y en el citoplasma, pero tiene un predominio nuclear marcado. Se ha reportado en algunos estudios que la pérdida de la expresión de p16 en el componente dérmico puede ayudar a discriminar entre melanomas spitzoides y melanomas nevoides de nevos comunes y de nevo de Spitz, siendo así la pérdida de la expresión nuclear más específica de los casos de melanoma.(23-25)

Maldonado y colaboradores establecen la probable relación entre el nevo de Spitz y los nevos melanocíticos en general como un ejemplo de célula en senescencia inducida por un oncogen. Se sugiere en otros estudios que los nevos de Spitz que expresan p16 de forma importante puede relacionarse con un mayor número de copias del cromosoma 11p (anormalidad cromosómica más frecuentemente encontrada en nevos de Spitz mediante técnicas de biología molecular) , lo que sugiere un vínculo directo entre la activación de la vía de los mitógenos activados por proteín-cinasas y el p16. La expresión anormal de p16 también se reporta en tumores como melanoma, carcinoma escamocelular de cabeza y cuello, carcinoma de pulmón, carcinoma cervico-uterino y cáncer de mama. (23-25)

## **2.1 Ciclina D1**

Esta ciclina, al igual que p16, esta involucrada en la regulación del ciclo celular. Aunque en contraste con la anterior, la ciclina D1 promueve la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, potenciando el crecimiento celular y la división. También ejerce su acción mediante la activación de ciclinas dependientes de cinasas 4 y 6 e inactivación del gen del retinoblastoma y modulación transcripcional del factor E2F-1, es decir, tienen efectos opuestos en diferentes fases del ciclo celular. La sobre-expresión de la ciclina D1 se ha demostrado en algunos tumores malignos como en carcinomas de cabeza y cuello, así como de esófago. Existen reportes de sobre-expresión de ciclina D1 en melanomas pero no en nevos adquiridos. Con todo lo anterior se sugiere que la presencia de ciclina D1 positiva puede ser un auxiliar en la diferenciación de lesiones spitzoides como nevos de Spitz y tumores limítrofes de melanomas Spitzoides. (25-26)

En este rubro existen dos estudios; uno en el que se exploró la expresión de la ciclina D1 en melanomas y nevos de Spitz, en el que se encontró más frecuente en los nevos de Spitz ( George y cols.) y otro (Tetsuro y cols) en el que se reporta positividad en tanto en los nevos de Spitz como en los melanomas, con un porcentaje de positividad mayor al 10% predominando en dermis papilar, a diferencia de los melanomas que puede encontrarse positividad en las profundidad de la lesión. No se estudió en los tumores limítrofes. El mecanismo que explique la sobreexpresión de ciclina D1 en nevos de Spitz se desconoce aún. (25-27)

### **2.3 Ki67 (MIB1).**

La expresión de MIB-1 mediante tinciones inmunohistoquímica es una herramienta útil para detectar núcleos con activación de síntesis de DNA a nivel nuclear y se considera un marcador de proliferación. Tiene un papel importante en la distinción de lesiones melanocíticas a través de la identificación del patrón de expresión, es decir en relación al número y la distribución de células positivas, ya que es diferente en los nevos en comparación con los melanomas. (28-29).

En los nevos melanocíticos benignos las células Ki67 positivas generalmente se localizan en la unión dermoepidérmica o en la parte más superficial del componente dérmico, mientras en los melanomas se observa la expresión de Ki67 a través de todo el componente dérmico. Aunado a lo anterior, el número de células positivas está significativamente incrementado en los melanomas en comparación con los nevos comunes. (28-31)

Específicamente hablando de nevos de Spitz se ha reportado un índice de proliferación nuclear desde 0-59% hasta 6-92% y en melanoma spitzoide de hasta 14.9% hasta 46-6%. En otros estudios se ha sugerido que la pérdida de la expresión de p16 con un índice de proliferación nuclear elevado es muy sugestivo de melanoma en casos de tumores spitzoides limítrofes, no así en los casos en los que hay ausencia de mitosis con un índice de proliferación bajo o ausente, lo cual apoya más la presencia de un nevo de Spitz. Lo anterior lo hace una herramienta importante en la diferenciación de estos tumores.(28-31)

Por esta razón algunos autores han intentado realizar cortes para la interpretación de este marcador en la estratificación del riesgo de lesiones spitzoides, específicamente las de comportamiento biológico incierto, en las que se reportan índices de Ki67 de hasta 10% (2-10%). Además de ser importante en este rubro el patrón de expresión, siendo más atípico si se manifiesta en la profundidad de la lesión. (28-31).

### **2.4 Bcl-2**

La proteína Bcl-2 (proteína del gen 2 de la leucemia/linfoma B) es producida por el gen con el mismo nombre y se encuentra en el cromosoma 18q21. Esta proteína fue inicialmente descubierta en pacientes con leucemia de células B y linfoma folicular en los que se encontraba la translocación cromosómica (14;18) lo que incrementó la síntesis y expresión de Bcl-2. Es miembro de la familia Bcl y se les atribuye un beneficio en la

sobrevida de las células neoplásicas ya que está encargada de promover el crecimiento e inhibir la muerte celular, por lo que se clasifica como un oncogen. Adicionalmente es miembro de una nueva categoría de oncogenes que prolongan la supervivencia celular por inhibición de la muerte celular más que por potenciación de la proliferación celular. Lo anterior puede promover la acumulación de mutaciones en las células que de otra forma hubieran sido eliminadas. Otros representantes de esta familia son los bcl-x, bax y bak (relacionados con la apoptosis). (32,34)

En tumores Spitzoides se sugiere que su expresión es más frecuente en nevos de Spitz y no así en melanomas spitzoides o tumores spitzoides limítrofes, aunque son pocos los estudios que han comparado la expresión de este en estas neoplasias.(32-34)

## **2.5 CD117**

La expresión de CD117 es producto del proto-oncogen ckit, el cual es un receptor transmembranal acoplado a tirosin-cinasa localizado en el cromosoma 4 (4q11-q12). Tiene un papel importante en el desarrollo normal y migración de las células hematopoyéticas y se expresa en mastocitos humanos normales, precursores mieloides, epitelio glandular mamario, células intersticiales de Cajal. Además se ha descrito su expresión en una amplia variedad de neoplasias incluyendo leucemia mieloide aguda, mastocitosis, tumores de células germinales y algunos otros tumores de tejidos blandos así como epiteliales y de forma característica en los tumores mesenquimales del estroma gastrointestinal (GIST), mismos que se originan de las células intersticiales de Cajal.(35)

Por otra parte también se ha estudiado en los melanocitos, encontrándose su importancia como estimulante del crecimiento, proliferación y migración de estos, mostrando diferencias en su expresión en lesiones melanocíticas benignas y malignas. Se ha descrito su expresión principalmente en melanomas primarios en estadios tempranos como Tis-pT2, lo que se relaciona con una reducción significativa en la progresión tumoral así como en la capacidad de generar metástasis. Se ha reportado en su mayoría en melanomas acrales (más frecuentes en amerindios) y de mucosas así como en piel con fotodaño crónico. (36-38).

Existen algunas otras técnicas auxiliares de diagnóstico descritas con la finalidad de distinguir nevos de Spitz de melanomas Spitzoides. Estos incluyen técnicas de genómica

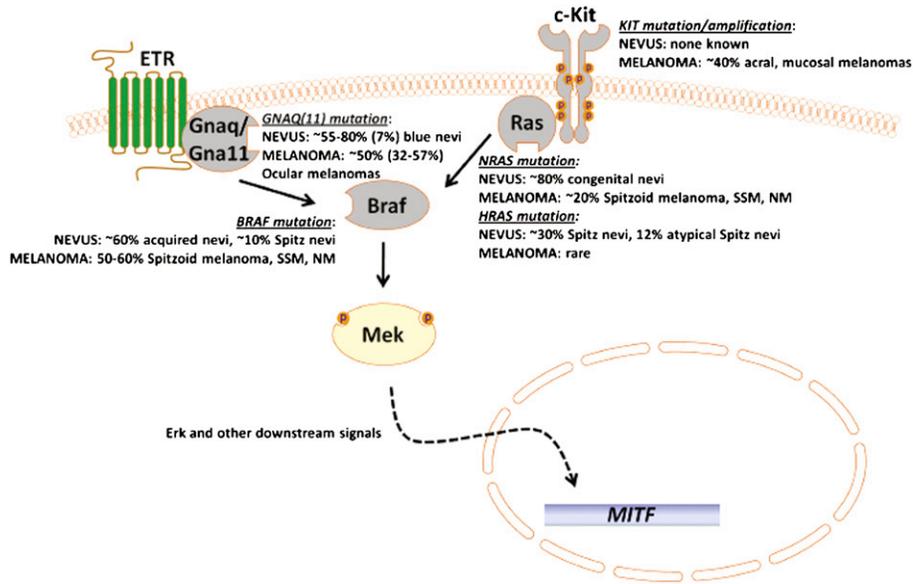
comparativa e hibridación in situ para demostrar aberraciones cromosómicas. Los más frecuentes hasta el momento las mutaciones en la familia de oncogenes de HRAS. (39)

A pesar de todo lo anterior no existe una técnica única para discriminar de forma inequívoca un nevus de Spitz de un melanoma spitzoide que sea además fácilmente accesible para el anatomopatólogo en ejercicio. En el futuro, se espera que las diferencias genéticas entre nevus de Spitz, tumores spitzoides limítrofes y melanomas sean capaces de ser utilizadas para ayudar en el diagnóstico de los casos con características histológicas ambigüas y que no es posible llegar a un diagnóstico con certeza basado éstas por sí solas. (28, 30,40, 43-44).

A nivel molecular, se han encontrado implicadas en el desarrollo de estas lesiones en mutaciones específicas que podrían ser útiles para diferenciar las lesiones spitzoides. Específicamente B-RAF (V-RAF oncogen homólogo B1), N-RAS (V-RAS oncogen homólogo del neuroblastoma) y H-RAS (V-HA-RAS oncogen homólogo del sarcoma). (39-42). Las proteínas del grupo RAS juegan un papel importante en la regulación de procesos celulares como el crecimiento, la proliferación y la diferenciación. De forma subsecuente son capaces de activar otras proteínas como las del grupo RAF que generan aumento de la proliferación celular así como sobrevida. BRAF es una proteín-cinasa intermediaria en la activación de la vía RAS-RAF (41-44) **(Figura 2)**.

En algunos estudios se reporta la presencia de mutaciones de BRAF en melanomas, no así en nevus de Spitz típicos. Sin embargo existen otros estudios en los que sí se ha encontrado positividad para mutaciones de BRAF en nevus de Spitz convencionales. Por otro lado las mutaciones de BRAF parecen ser más frecuentes en melanomas spitzoides, pero son estudios limitados. Las mutaciones de N-RAS se han reportado en melanomas y tumores de Spitz atípicos pero no en nevus de Spitz clásicos. Las mutaciones de H-RAS se han visto tanto en nevus de Spitz típicos como atípicos, pero no se reportan en melanomas.(39,41-44). **(Figura 2)**.

**Figura 2. Vías de señalización y mutaciones en lesiones spitzoides y melanoma.**



Adaptado de: Luo Su y cols. Spitz nevi and other Spitzoid lesions Part I. Background and diagnoses. J Am Acad Dermatol 2011;65:1073-82. (2).

### 3. JUSTIFICACION

El diagnóstico de los tumores Spitzoides atípicos continúa siendo un reto diagnóstico para el dermatólogo y el dermatopatólogo, ya que es difícil distinguir en ocasiones los nevos de Spitz y los tumores Spitzoides atípicos de los verdaderos melanomas y es mandatorio detectarlos para ofrecer una terapéutica adecuada y temprana.

Hasta ahora no existen estudios que permitan clasificar a estos tumores mediante inmunomarcación en población mexicana y los existentes a nivel mundial no son tan consistentes o uniformes, por lo que se decidió evaluar estos tumores mediante marcadores de inmunohistoquímica específicos en complemento con la evaluación morfológica (arquitectural y citológica) por histopatología.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

- ¿Cómo es la expresión de marcadores de inmunohistoquímica como CD117, Ki 67 (MIB1), Bcl-2, ciclina D1 y p16 en Nevos de Spitz y tumores spitzoides atípicos ?

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 OBJETIVO PRINCIPAL.**

- Describir la expresión de marcadores de inmunohistoquímica como CD117, Ki67, Bcl-2, ciclina D1 y p16 en nevos de Spitz y tumores spitzoides atípicos.

##### **5.2 OBJETIVO SECUNDARIO:**

- Describir las características clínicas e histológicas de los nevos de Spitz y los tumores spitzoides atípicos en nuestra población de estudio.

#### **6. HIPÓTESIS.**

Es un estudio descriptivo y no requiere prueba de hipótesis.

#### **7. MATERIAL Y METODOS**

##### **7.1 Diseño del estudio:**

Se trata de un estudio retrospectivo, observacional, transversal, descriptivo, tipo serie de casos.

##### **7.2 Universo de estudio.**

Bloques de parafina de biopsias del archivo del servicio de Dermatopatología.

### 7.3 Población blanco.

Bloques de parafina de biopsias de piel realizadas de 1997 a 2012 con diagnóstico de nevo de Spitz, tumor Spitzoide atípico o Melanoma Spitzoide disponibles en el servicio de Dermatopatología del Hospital Manuel Gea González.

### 7.4 Tamaño de la muestra.

Se incluyeron todas las laminillas de nevos de Spitz, tumores spitzoides atípicos y melanomas spitzoides del archivo de dermatopatología, por lo que no se requirió de cálculo de tamaño de muestra.

### 7.5 Criterios de selección:

- **Criterios de Inclusión.** Bloques de parafina de nevos de Spitz, tumores spitzoides atípico y melanoma spitzoides del archivo de dermatopatología diagnosticados entre 1997 y 2012 (15 años).
- **Criterios de exclusión.** Estudios histopatológicos que no tengan disponible el bloque de parafina o que éste sea insuficiente para los estudios de inmunohistoquímica.
- **Criterios de eliminación.** Estudios de Inmunohistoquímica no legibles por mala técnica. (sobreexposición al reactivo).

### 7.6 Definición de variables

Las variables estudiadas en este trabajo se dividieron en demográficas, histológicas y de inmunomarcación.

**Demográficas:** Se recabó información de los expedientes clínicos como edad, sexo, localización y tamaño del tumor, presencia de asimetría y ulceración.

**Histológicas:** Se evaluaron aspectos histológicos de tipo arquitectural y citológico de todos los tumores, los cuales incluyeron la hiperplasia epidérmica, ulceración a nivel histológico, presencia de cuerpos de Kamino, diseminación pagetoide y extensión de la misma (focal o en toda la epidermis), el tipo retracción de los nidos de la unión dermo-epidérmica (total o parcial), la profundidad de la lesión (unión dermo-epidérmica, dermis reticular superficial, media o profunda), maduración de células névicas, mitosis por

milímetro cuadrado y localización de éstas (en el componente superficial o profundo), tipo de melanocitos (ahusados o fusiformes), citoplasma de los mismos (granular o de aspecto polvoso), hipercromasia de los núcleos así como presencia de nucléolos y número.

**Inmunomarcación:** Se evaluó la positividad nuclear del marcador de proliferación Ki67 y de diferenciación p16 en las células névicas, revisando 4 campos de 40x en cada muestra de forma respectiva en la zonas de mayor positividad y realizando un promedio de las tres. El resultado se expresó en porcentaje. Además se valoró la positividad de marcadores citoplasmáticos en las células névicas como CD117, ciclina D1 y Bcl-2, de igual forma haciendo revisión de 4 campos de 40x con posterior elaboración de u promedio, reportándose como porcentaje y grado de positividad dependiendo de la intensidad de la tinción (X: levemente positivo XX: moderadamente positivo XXX: fuertemente positivo).

Se tomaron como controles de la inmunomarcación 6 nevos intradérmicos al azar, los cuales se re-evaluaron para confirmar el diagnóstico y la disponibilidad de tejido de la muestra.

La evaluación de las laminillas tanto de los aspectos histológicos como de la inmunomarcación se realizó por dos observadores diferentes sin conocer los diagnósticos hasta después del reporte de resultados.

### **Descripción de la técnica de inmunohistoquímica**

Previa solicitud de cortes de tejido parafinado de las muestras, previamente seleccionadas para el estudio, en laminillas cargadas negativamente para inmunohistoquímica se llevó a cabo el desparafinado el tejido por 10 minutos a 60° C en incubadora con lavados con xileno y ulterior rehidratación del tejido mediante alcohol a diferentes concentraciones con una lavado final con agua destilada. De forma subsecuente llevo a cabo una recuperación antigénica mediante incubación con buffer citrato por 20 segundos y lavado con agua destilada e incubación con solución permeabilizante con su lavado correspondiente así como incubación subsecuente con el anticuerpo monoclonal por 3 horas a temperatura ambiente y lavado con metanol. Se elaboró un montaje final con solución de PBS-glicerol.

### **7.7 Análisis Estadístico:**

Se utilizó estadística descriptiva, resumiendo los resultados de las variables cualitativas “CD117, Bcl-2, p16 y ciclina D1” en frecuencias absolutas y porcentajes. Para la variable cuantitativa Ki-67, expresada en porcentaje, se darán medidas de tendencia central y dispersión (mediana y valor mínimo y máximo).

## **8. RESULTADOS**

En total se encontraron 42 casos de Tumores de Spitz en un periodo de 15 años (1999-2012) en nuestro archivo de Dermatopatología. De éstos 1 caso se excluyó por no encontrarse el bloque tejido parafinado, 10 se excluyeron por muestra insuficiente para la inmunomarcación y en un caso no se corroboró el diagnóstico a la revisión con microscopía de luz. Las muestras incluidas en el trabajo después de aplicar los criterios de selección fueron 30. Se utilizaron 6 muestras de nevos intradérmicos comunes seleccionados al azar para realizar las inmunotinciones y comparar la expresión de los marcadores (control de inmunomarcación, controles “sanos”).

Los diagnósticos encontrados en esta muestra fueron nevo de Spitz (NS) con un total de 18 casos, nevo de Spitz displásico (NSD) 4 casos, tumor spitzoide limítrofe (TSL) 3 casos y melanoma spitzoide (MMS) 5 casos.

### **Demografía.**

En cuanto a las variables demográficas los tumores Spitzoides en general fueron más frecuentes en mujeres, 66.1% en el grupo NS, 75% NSD, 66.6% TSL y 60% en MMS. La edad de presentación presentó diferencias importantes, siendo en más jóvenes la presentación de NS (15.3 años, rango de 10 días a 40 años) y NSD (16.75 años, rango de 5 a 23 años) así como de tumores spitzoides limítrofes (7 años, rango de 2 a 16 años) no así como el MMS que la edad promedio de presentación fue de 45 años ( rango de 35 a 60 años).

En relación al tamaño del tumor el 60% de las lesiones menores a 1mm fueron nevos de Spitz, las lesiones de 1mm 75 y 100% correspondieron a NDS y TSL y los de más de 1 mm fueron en un 60% melanomas spitzoides. La presencia de asimetría en la lesión se encontró en el 60% de los pacientes con MMS y en el 50% de los NSD, fue menos frecuente en los NS y TSL.

La topografía más frecuente de tumores spitzoides fueron la extremidades y de éstas las inferiores de un 40 a 67% en los grupos de NS, NSD y TSL. Los melanomas spitzoides no tuvieron predominio de localización en esta serie. **(Tabla 3).**

**Tabla 3. Resumen de variables demográficas.**

<b>Diagnóstico</b>	<b>NS (N=18)</b>	<b>NSD (N=4)</b>	<b>TSL (N=3)</b>	<b>MMS (N=5)</b>
<b>Edad</b>	15.33 (10d-40)	16.75 (5-23)	7 (2-16)	45 (35-60)
<b>Sexo</b>	Fem 61.1%	Fem 75%	Fem 66.6%	Fem 60%
<b>Tamaño</b>	60% (<1mm)	75% (1mm)	100% (1mm)	60% (>1mm)
<b>Topografía</b>	Extremidades 40%	Extremidades (50%)	Extremidades (67%)	Sin predominio
<b>Simetría</b>	70%	50%	60%	40%

### **Histología.**

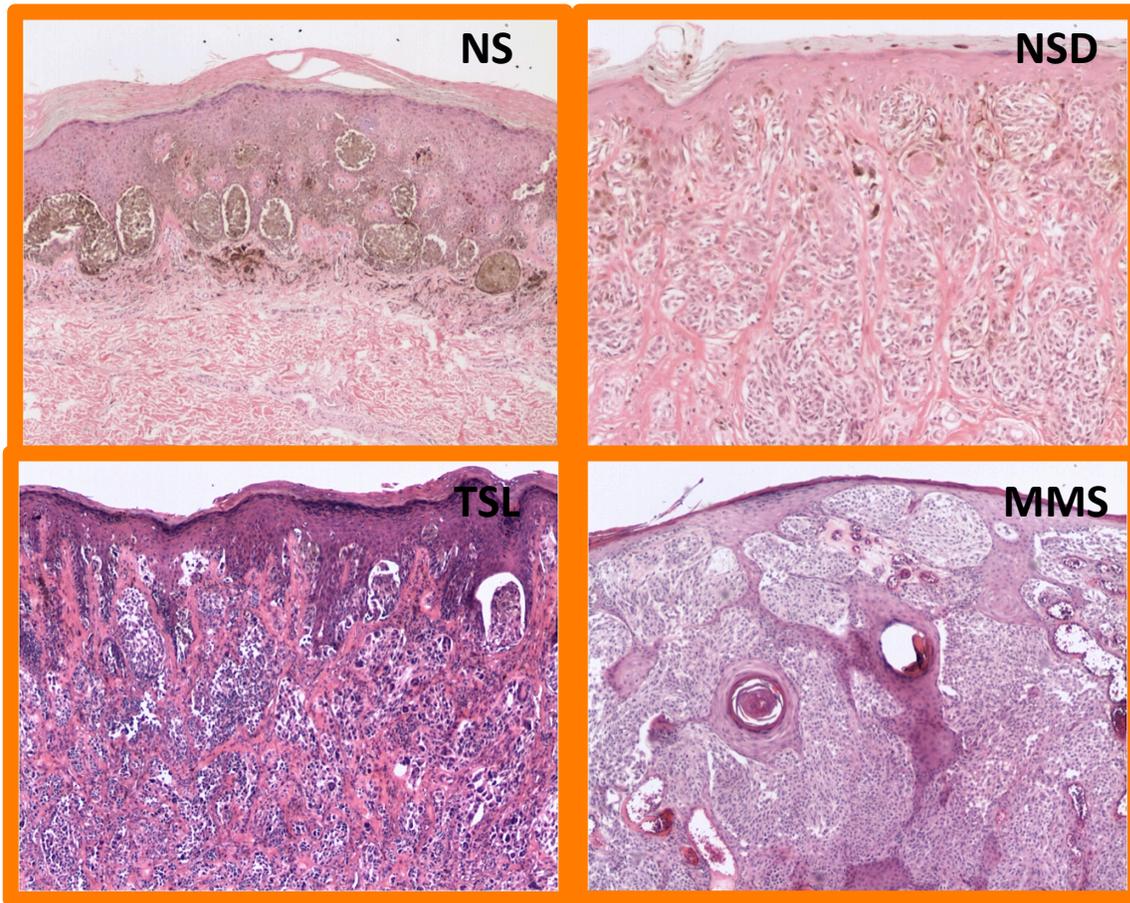
En la revisión de los casos encontramos hiperplasia epidérmica en casi todos los casos de NS y MMS (83.3%), y en el 100% de los NSD. Por el contrario los TSL solo mostraron esta característica en el 33% de los casos. La ulceración fue una característica más frecuente en los MMS (20%), no así en los NS, NSD y TSL, aunque es importante recalcar que el 5% de los NS presentó ulceración. Los cuerpos de Kamino estuvieron

ausentes en los TSL, y se encontraron en casi la mitad de los NS, NSD y MMS. La retracción de los nidos de melanocitos en el componente de unión se encontró en casi todos los nevos de Spitz (94%) y en los TSL (100%) aunque de forma parcial. Por el contrario en los NSD y en el MMS la retracción de los nidos solo se presentó en cerca de la mitad de los casos (50% NSD; 60% MMS 60% y de forma parcial). La diseminación pagetoide como era esperado fue una de las características principales en el 94% de los NS y en los NSD, TSL y MMS en el 100% de los casos. En los MMS la diseminación pagetoide característicamente no fue focal, si no que se encontró en toda la extensión de la lesión. El fenómeno de maduración se encontró en el 91% de los casos de NS (los que presentaron componente dérmico), no así en los TSL o en los MMS. (Tabla 4, Figura 3)

**Tabla 4. Características histológicas arquitecturales.**

<b>Histología</b>	<b>NS (N=18)</b>	<b>NSD (N=4)</b>	<b>TSL (N=3)</b>	<b>MMS (N=5)</b>
<b>Hiperplasia epidérmica</b>	83.3%	100%	33%	80%
<b>Ulceración</b>	5.5%	0%	0%	20%
<b>Cuerpos de Kamino</b>	44.4%	50%	0%	40%
<b>Retracción de nidos</b>	94.4%	50%	100%	60% (parcial)
<b>Diseminación pagetoide</b>	94.4%	100%	100%	100%
<b>Focal</b>	88.23%	100%	100%	0%
<b>Maduración</b>	91%	100%	0%	0%

Figura 3. Características arquitecturales de los NS, NSD, TSL y MMS.



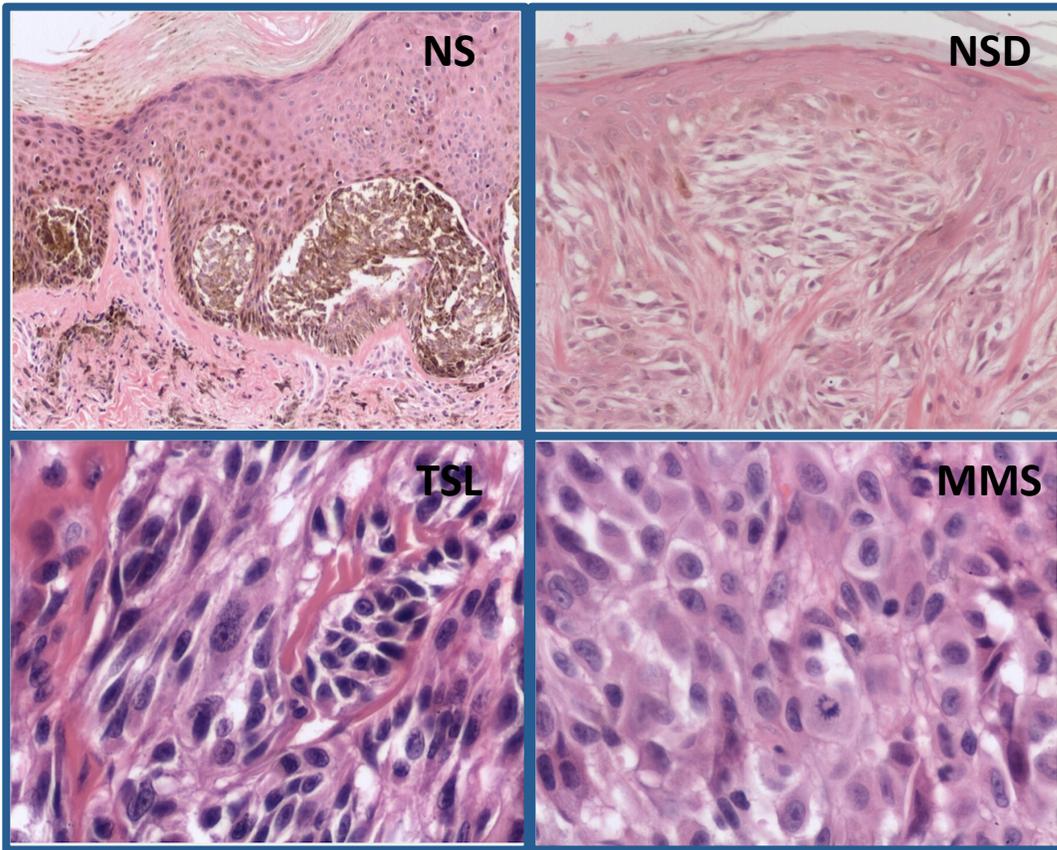
**Figura 3: NS (nevo de Spitz)** Se observa hiperplasia epidérmica con presencia de nidos verticalizados con retracción importante, así como cuerpos de Kamino. **NSD (nevo de Spitz displásico)** Se observan nidos más horizontalizados con pérdida de la retracción de los mismos y cuerpos de Kamino. Mayor cantidad de melanocitos fusiformes algunos dispuestos individualmente, grandes y sin respetar las áreas suprapapilares. **TSL (tumor spitzoide limítrofe)** nidos irregulares, verticalizados, con retracción del estroma, disminución de la simetría, presencia de melanocitos grandes, en algunas áreas con formación de células gigantes. Componente dérmico predominante. **MMS (melanoma spitzoide)** Presencia de nidos grandes, pérdida de la retracción de éstos con disminución de la cohesión a la profundidad. Hay afección de anexos.

Continuando con las características citológicas de los melanocitos se encontró un predominio de melanocitos epitelioides en todas las lesiones, aunque en los NSD y MMS hubo mayor presencia de melanocitos fusiformes en relación con los NS y los TSL. El citoplasma de los melanocitos en los NS y NSD fue en su mayoría granular. (67% en NS y 75% en NSD), por el contrario en los TSL y MMS en su mayoría hubo presencia de citoplasma de aspecto polvoso. El número de nucleolos fue mayor en los TSL y en MMS (2-3n y 3-5 respectivamente), no así en los NS y NSD en los que los nucleolos oscilaban entre 1-2. La presencia de mitosis fue un dato cardinal en el MMS, encontrando hasta 4 por mm<sup>2</sup>, en los NS, NSD y TSL las mitosis fueron poco frecuentes (1mm<sup>2</sup>). (**Tabla 5, Figura 4**).

**Tabla 5. Características citológicas de los melanocitos en lesiones spitzoides.**

Histología	NS (N=18)	NSD (N=4)	TSL (N=3)	MMS (N=5)
Mitosis	1/mm <sup>2</sup>	<1/mm <sup>2</sup>	<2/mm <sup>2</sup>	4/mm <sup>2</sup>
Melanocitos	72% epitelioides	60%Epitelioides/ fusiformes	70% epitelioides	60% epitelioides
Melanina	66.6% granular	75% granular	70% polvosa	100% polvosa
Nucleolos	75% (1-2n)	100% (2n)	67% (2-3n)	100% (3-5n)

**Figura 4. Características de los melanocitos de las lesiones spitzoides.**



**Figura 4: NS (nevo de Spitz).** Se observan melanocitos con citoplasma granular. **NSD (nevo de Spitz displásico).** Hay melanocitos más fusiformes, algunas con citoplasma granular y otras con aspecto polvoso. **TSL (tumor spitzoide limítrofe).** Los melanocitos son epitelioides, grandes y co citoplasma de aspecto polvoso y se evidencian los nucleolos de forma importante. **MMS (melanoma spitzoide)** Los melanocitos son grandes, con nucleolos evidentes, citoplasma de aspecto polvoso y hay mitosis en la profundidad de la lesión.

## **Inmunomarcación**

### **Marcadores nucleares.**

En relación al Ki67, encontramos índices de proliferación bajos en NS y TSL (1.6% y 2% respectivamente), comparables con lesiones benignas como nevos intradérmicos, los cuales mostraron un índice de proliferación de 3%. En cuanto al NSD y el MMS mostraron índices de ki67 elevados (10 y 20% respectivamente) . La presencia de p16 fue manifiesta

de forma más importante en los NID, mostrándose con un índice del 50%. Los NS mostraron positividad en un 39%, NSD en 25% y de forma importante en el 100% de los TSL. Los MMS tuvieron una expresión de p16 menor al 1%. **(Figura 5).**

### **Marcadores citoplasmáticos.**

La ciclina D1 mostró positividad en el 3.8% de los NS, 7% en los TSL y 10% en los NSD, con intensidad de una a dos cruces. Las muestras de NID tuvieron 1.3% de positividad. Los MMS mostraron ciclina D1 de intensidad dos a tres cruces en el 46.4% de los casos.

En el caso de CD117 los NS mostraron positividad del 22% con intensidad de una a dos cruces, muy cercano al TSL. El NSD mostró positividad del 50% con intensidad de dos cruces, en comparación con los NID con 2.5% de positividad con intensidad de una cruz. En el caso de los MMS se perdió la expresión de este marcador (<1%, una cruz).

En el caso del Bcl-2 solo hubo positividad en los casos de NS y TSL (22 y 33% respectivamente). En el resto de los tumores se encontró en <1%, con intensidad baja. **(Tabla 6, Figura 5).**

**Tabla 6. Resultados de inmunomarcación.**

<b>Diagnóstico</b>	<b>NID</b>	<b>NS (*)</b>	<b>NSD</b>	<b>TSL</b>	<b>MMS</b>
<b>Ki-67</b>	3.3%	1.6%	10%	2%	20%
<b>p16</b>	50%	39%	25%	100%	<1%
<b>Ciclina D1</b>	1.3% (+)	3.8% (+)	10% (+ a ++)	7% (+)	46.6% (++ a +++)
<b>Bcl-2</b>	<1% (+)	22% (++)	<1% (+)	33% (+)	<1% (+)
<b>C-Kit</b>	2.5% (+)	22% (++)	50% (++)	25% (++)	<1% (+)

**Figura 5. Inmunomarcación de tumores spitzoides.**

Tinción	NID	NS	NSD	TSL	MMS
Ki67					
MCM3					
Ciclina D1					
p16					
Bcl-2					
C-Kit					

## 9. DISCUSION

En esta serie estudiada los tumores spitzoides fueron más frecuentes en mujeres, al igual que en otras series reportadas en la literatura (45-46). Encontramos que a mayor edad era mayor también la probabilidad de presentar enfermedad maligna, específicamente hablando del caso de los melanomas spitzoides, que se encontraron con una edad

promedio de 45 años. Los tumores de más de 1 milímetro de diámetro fueron más frecuentes en el grupo de los TSL así como en los MMS. En relación a la topografía la localización más frecuente fueron las extremidades y de éstas las inferiores, al igual que lo reportado en otros estudios similares. La simetría fue una característica poco frecuente en los MMS. En relación a la arquitectura histológica la hiperplasia epidérmica y los cuerpos de Kamino fueron menos frecuentes en los TSL, probablemente en relación a la poca presencia de componente de unión, ya que el peso principal lo mostró el componente intradérmico. La ulceración fue un dato presente en el 20% de los MMS, aunque es importante destacar que el 5% de los NS de esta serie la presentó, sin conferir un comportamiento biológico diferente. La retracción de los nidos de melanocitos de la unión dermo-epidérmica fue menor en los casos de NSD así como en los MMS. La diseminación pagetoide presente más allá del centro de la lesión (de tipo extenso) se presentó en los casos de MMS. No se encontró fenómeno de maduración de melanocitos en el componente intradérmico de los MMS y los TSL. En relación a la citomorfología encontramos 4 o más mitosis por campo en los MMS en comparación con los TSL que mostraron menos 2 por mm<sup>2</sup>. El tipo de melanocito más frecuentemente encontrado en los tumores spitzoides de esta serie fueron los de tipo epitelioides, aunque la presencia de melanocitos fusiformes fue más frecuente en los NSD. El citoplasma de aspecto polvoso fue característico de los TSL así como de los MMS de igual forma en el caso de los nucleolos evidentes. En cuanto a la expresión de Ki67 se mostró más en los NSD y en los MMS como era de esperarse, siendo de hasta 10% en los NSD, por el contrario fue bajo en los TSL (<3%). La ciclina D1 se expresó más en NSD y en MMS. En los TSL y NS fue de menos del 10%. Por otra parte el CD117 o Ckit se expresó más en NSD que en MMS (<1%), y finalmente p16 se encontró expresada en mayor proporción en NS, TSL (100% de los casos) en comparación con el MMS donde lo encontramos en <1%.

En este estudio los TSL mostraron menor expresión de marcadores de proliferación (<5%) así como de ciclina D1, con una alta expresión de p16 (gen supresor), por lo que se puede resaltar la tendencia de estos resultados a mostrar que los TSL poseen características histológicas tanto arquitecturales como citológicas de un tumor potencialmente agresivo, pero en los resultados de inmunomarcación se observa más bien un comportamiento similar al de un NS común. Es importante destacar que en hasta este momento ninguno de los TSL de esta serie ha mostrado recurrencias y solo en un caso se realizó ganglio centinela, el cual resultó negativo.

En teoría la expresión de p16 está más asociada a la presencia de alteraciones del cromosoma 11p que traducen mutaciones a nivel de HRAS, las cuales se han descrito de forma frecuente en los casos de nevos de Spitz y sobre todo asociados a poliploidía, por lo que, morfológicamente, traduce la presencia de células epiteliales de núcleos grandes, característica presente en todos nuestros TSL. Aparentemente la expresión de p16 es necesaria para que en estos tumores se frene la cascada de genes como RAF-MEK y ERK activación que está relacionada con la expresión de ciclina D1, la cual en esta serie se presentó más frecuentemente en MMS y NSD. (47).

## **10. CONCLUSIONES**

El TSL presentó características morfológicas atípicas pero con una tasa de proliferación comparable con un nevo común. La expresión de p16 en todos estos tumores podría estar relacionada con una alta tasa de senescencia celular por la presencia de poliploidía 11p asociada a mutaciones de HRAS, como freno de la activación de oncogenes mitógenos. Por lo tanto se acercaron más a los NS que a los MMS en relación a la inmunomarcación.

Los marcadores como Ki67 (MiB1) y p16 en conjunto con el análisis de las características histológicas podrían ser auxiliares en la diferenciación del melanoma spitzoide de nevos de spitz o tumores spitzoides limítrofes.

## 11. BIBLIOGRAFIA

1. Barnhill RL. The Spitzoid lesion: rethinking Spitz tumors, atypical variants, 'Spitzoid melanoma' and risk assessment. *Mod Pathol* 2006;19 (suppl 2):S21-33.
2. Luo Su y cols. Spitz nevi and other Spitzoid lesions Part I. Background and diagnoses. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:1073-84.
3. Kernen JA, Ackerman LV. Spindle cell nevi and epithelioid cell nevi (so-called juvenile melanomas) in children and adults: a clinicopathological study of 27 cases. *Cancer* 1960;13:612-25.
4. LeBoit PE. Kamino Bodies: what They May Mean. *Am J Dermatopathol* 23(4): 374–377, 2001.
5. Dahlstrom JE y cols. Spitz naevus: diagnostic problems and their management implications. *Pathology* 2004 Oct;36(5):452–457.
6. Mooi WJ. Spitz nevus and its histological simulators. *Adv Anat Pathol* 2002; 9: 209–21.

7. Crotty KA, Scolyer RA, Li LW, Palmer AA, Wang L, McCarthy SW. Spitz naevus versus Spitzoid melanoma: when and how can they be distinguished? *Pathology* 2002; 34: 6–12
8. Barnhill RL, Barnhill MA, Berwick M, Mihm Jr MC. The histologic spectrum of pigmented spindle cell nevus: a review of 120 cases with emphasis on atypical variants. *Hum Pathol* 1991; 22: 52–58.
9. Busam KJ, Barnhill RL. Pagetoid Spitz nevus. Intraepidermal Spitz tumor with prominent pagetoid spread. *Am J Surg Pathol* 1995; 19: 1061–1067.
10. Hoang MP. Myxoid Spitz nevus. *J Cutan Pathol* 2003; 30: 566–8. 10.
11. Liu J, Cohen PR, Farhood A. Hyalinizing Spitz nevus: spindle and epithelioid cell nevus with paucicellular collagenous stroma. *Sout Med J* 2004; 97: 102–106.
12. Requena C y cols. Spitz Nevus: A Clinicopathological Study of 349 Case. *Am J Dermatopathol* 2009;31:107–116.
13. Huarte PS. Spitz' atypical nevus (juvenile melanoma). Clinico-pathological study of 9 cases. *Actas Dermosifiliogr* 1970;61:205-24.
14. Smith KJ, Barrett TL, Skelton HG 3rd, Lupton GP, Graham JH. Spindle cell and epithelioid cell nevi with atypia and metastasis (malignant Spitz nevus). *Am J Surg Pathol* 1989;13:931-9.
15. Barnhill RL, Argenyi ZB, From L, Glass LF, Maize JC, Mihm MC Jr, et al. Atypical Spitz nevi/tumors: lack of consensus for diagnosis, discrimination from melanoma, and prediction of outcome. *Hum Pathol* 1999; 30:513-520.
16. Barnhill RL, Flotte TJ, Fleischli M, Perez-Atayde A. Cutaneous melanoma and atypical Spitz tumours in childhood. *Cancer* 1995; 76:1833–1845.

17. Spatz A, Calonje E, Handfield-Jones S, Barnhill RL. Spitz tumors in children: a grading system for risk stratification. *Arch Dermatol* 1999;135: 282–5.
18. Peters MS, Goellner JR. Spitz naevi and malignant melanomas of childhood and adolescence. *Histopathology* 1986; 10: 1289–1302.
19. McCarthy SW, Crotty KA, Palmer AA, Ng ABP, McCarthy WH, Shaw HM. Cutaneous malignant melanoma in teenagers. *Histopathology* 1994; 24: 453–61. 15
20. Orchard D, Dowling J, Kelly J. Spitz naevi histologically misdiagnosed as melanoma: prevalence and clinical profile. *Australas J Dermatol* 1997; 38: 12–4. 16.
21. Walsh N, Crotty K, Palmer A, McCarthy S. Spitz nevus versus spitzoid malignant melanoma: An evaluation of the current distinguishing histopathologic criteria. *Hum Pathol* 1998; 29: 1105–12.
22. Piepkorn M. On the nature of histologic observations: the case of the Spitz nevus. *J Am Acad Dermatol* 1995;32:248-54.
23. Hilliard NJ, Krahl D, Sellheyer K. p16 Expression differentiates between desmoplastic Spitz nevus and desmoplastic melanoma. *J Cutan Pathol* 2009; 36: 753–759.
24. Dhaybi R y cols. p16 Expression: A marker of differentiation between childhood malignant melanomas and Spitz nevi. *J Am Acad Dermatol* 2011;65:357-63.
25. George, E y cols. Immunohistochemical Evaluation of p16INK4A, E-Cadherin, and Cyclin D1 Expression in Melanoma and Spitz Tumors. *Am J Clin Pathol* 2010;133:370-379.

26. Tetsuro N y cols. Cyclin D1 Overexpression in Spitz Nevi: An Immunohistochemical Study. *Am J Dermatopathol* 1999; 21(2): 115-120.
27. Sparrow LE, Eldon MJ, English DR, et al. p16 and p21/WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol*. 1998;20:255-261.
28. Li LX, Crotty KA, McCarthy SW, Palmer AA, Kril JJ. A zonal comparison of MIB1-Ki67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 2000;22: 489-95.
29. Kapur P, Selim MA, Roy LC, et al. Spitz nevi and atypical Spitz nevi/ tumors: a histologic and immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 2005;18:197–204.
30. Bergman R y cols. MIB-1 monoclonal antibody to determine proliferative activity of Ki-67 antigen as an adjunct to the histopathologic differential diagnosis of Spitz nevi. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44:500–504.
31. Nielsen PS, Riber-Hansen R, Steiniche T. Immunohistochemical Double Stains Against Ki67/ MART1 and HMB45/MITF: Promising Diagnostic Tools in Melanocytic Lesions. *Am J Dermatopathol* 2011 Jun;33(4):361-370.
32. Boyd A y cols. Expression of bcl-2 in Lichen Planus, Acute Graft-versus-Host Disease, and Erythema Multiforme. *Am J Dermatopathol* 1997;19(1): 46-51.
33. Ilmonen S, Hernberg M, Pyrhonen S, et al. Ki-67, Bcl-2 and p53 expression in primary and metastatic melanoma. *Melanoma Res*. 2005;15: 375–381.
34. Stefanaki C y cols. Cell cycle and apoptosis regulators in Spitz nevi: comparison with melanomas and common nevi. *J Am Acad Dermatol*. 2007 May;56(5):815-24.

35. Dorfman D y cols. The CD117 Immunohistochemistry tissue microarray survey for quality assurance and interlaboratory comparison. Arch Pathol Lab Med 2006 Jun; 130(6):779-782.
36. Zhu YI, Fitzpatrick JE. A study looking at CD117 immunohistochemical expression showed essentially no difference in the staining pattern between Spitz nevi and melanoma. Expression of c-kit (CD117) in Spitz nevus and malignant melanoma. J Cutan Pathol. 2006;33:33–37.
37. Oba J y cols. Expression of c-Kit, p-ERK and cyclin D1 in malignant melanoma: an immunohistochemical study and analysis of prognostic value. J Dermatol Sci. 2011 May;62(2):116-23.
38. Curtin JA y cols. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. J Clin Oncol. 2006 Sep 10; 24(26);4340-4346.
39. Takata M, Lin J, Takayanagi S, Suziki T, Ansai S, Kimura T, et al. Genetic and epigenetic alterations in the differential diagnosis of malignant melanoma and Spitzoid lesion. Br J Dermatol 2007;156:1287-94.
40. Kanter-Lewensohn L, Hedblad MA, Wejde J, Larsson O. Immunohistochemical markers for distinguishing Spitz nevi from malignant melanomas. Mod Pathol 1997;10:917-20.
41. Indsto JO, Kumar S, Wang L, Crotty KA, Arbuckle SM, Mann GJ. Low prevalence of RAS-RAF-activating mutations in Spitz melanocytic nevi compared with other melanocytic lesions. J Cutan Pathol 2007;34:448-55.
42. Van Dijk MC, Bernsen MR, Ruiters DJ. Analysis of mutations in B-RAF, N-RAS, and H-RAS genes in the differential diagnosis of Spitz nevus and Spitzoid melanoma. Am J Surg Pathol 2005; 29:1145-51.

43. Harvell JD, Bastian BC, LeBoit PE. Persistent (recurrent) Spitz nevi: a histopathologic, immunohistochemical, and molecular pathologic study of 22 cases. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 654–61. 22.
44. Bastian BC, Wesselmann U, Pinkel D, Leboit PE. Molecular cytogenetic analysis of Spitz nevi shows clear differences to melanoma. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 1065–9.
45. Berlingeri-Ramos A, Morales-Burgos A, Sánchez J, Nogales E. Spitz Nevus in a Hispanic Population: A Clinicopathological Study of 130 Cases. *Am J Dermatopathol* 2010;32:267–275.
46. Cesinaro A, Foroni M, y cols. Spitz Nevus Is Relatively Frequent in Adults. A Clinico-Pathologic Study of 247 Cases Related to Patient's Age. *Am J Dermatopathol* 2005;27:469–475.
47. Maldonado J, Timmerman L, Fridlyan J, Bastian B. Mechanisms of Cell-Cycle Arrest in Spitz Nevi with Constitutive Activation of the MAP-Kinase Pathway. *Am J Pathol* 2004, 164:1783–1787.