

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

**Estudio Exploratorio de expresión inmunohistoquímica de C-KIT y VEGF en  
Ganglio Centinela positivo por Melanoma**

Tesis para obtener el título de especialista en Cirugía Oncológica

P R E S E N T A

DR. FRANCISCO LOPEZ SACHIÑAS

ASESORES

DR. HECTOR MARTINEZ SAID.

Co-Asesor

DRA. DELIA PEREZ MONTIEL.

México DF

2009



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.

Estudio Exploratorio de expresión inmunohistoquímica de C-KIT y VEGF en Ganglio Centinela positivo por Melanoma

---

AUTOR

DR FRANCISCO LOPEZ SACHIÑAS

---

DR. HECTOR MARTINEZ SAID

CIRUJANO ONCOLOGO

ADSCRITO AL SERVICIO DE MELANOMAS

---

DR .EDUARDO CERVERA CEBALLOS

DIRECTOR DE DOCENCIA

## DEDICATORIA.

Con profundo agradecimiento a DIOS porque siempre estuvo ahí. A mis padres por el apoyo y confianza que siempre me han brindado, a mis maestros y compañeros por el tiempo que les robé y por las enseñanzas que me brindaron para seguir sus pasos de superación profesional.

\*

A todos los pacientes que son la base del saber médico y que me brindaron su confianza para atenderlos aún en riesgo de su vida. A todas las personas que me ayudaron a realizar este trabajo. GRACIAS.

\*

Al Instituto Nacional de Cancerología por haber hecho posible mi preparación de especialización en Cirugía Oncológica....

## INDICE

<b>Antecedentes</b>	5
<b>Introducción</b>	6
<b>Planteamiento del problema</b>	14
<b>Hipótesis</b>	15
<b>Justificación</b>	16
<b>Objetivos</b>	17
<b>Tipo de estudio</b>	17
<b>Material y métodos</b>	18
<b>Resultados</b>	21
<b>Discusión</b>	22
<b>Agradecimientos</b>	25
<b>Imágenes y tablas</b>	24
<b>Gráficas</b>	25
<b>Bibliografía</b>	37

---

## ANTECEDENTES

Como consecuencia de los continuos progresos en el conocimiento de la biología celular y molecular de los tumores, surge la necesidad de buscar nuevos marcadores biológicos capaces de aportar una información adicional a los parámetros patológicos habituales.

Dichos hallazgos ayudarían, tanto a clínicos como a no clínicos a establecer un diagnóstico adecuado y definir grupos de pacientes cuyos tumores presenten determinadas características, ya no solo morfológicas y estructurales, si no también genéticas y moleculares, que se puedan beneficiar de una terapia más adecuada y efectiva.

El melanoma representa una de las neoplasias más agresivas en humanos. Su incidencia ha incrementado significativamente en décadas recientes, el mecanismo de progresión aún no se ha determinado, y el interés por descubrir nuevos agentes contra blancos moleculares aún está en estudio.

El factor de crecimiento endotelial y el c-Kit (*protein tirosin cinasa* y *protein tirosin cinasa*) están involucrados en la iniciación, crecimiento, diferenciación, migración, adhesión y progresión tumoral de algunas neoplasias humanas, tal es el caso de Melanoma.

El tratamiento disponible en la actualidad es limitado e incluye diversas modalidades como cirugía, quimioterapia, inmunoterapia y radioterapia externa.

Con los nuevos descubrimientos en la biología molecular, así como en la genética ha permitido la clasificación molecular de esta neoplasia y recientemente con la búsqueda y creación de nuevos fármacos, en especial contra blancos moleculares, como lo son el C-kit y el VEGF se han abierto nuevas expectativas de tratamiento.

En el desarrollo y progresión del melanoma ha sido de interés la búsqueda de factores moleculares encontrando así c-Kit y VEGF en melanocitos normales, en melanomas tempranos y metastásicos, presentando mayor expresividad en el subtipo acral lentiginoso, representando así un probable factor pronóstico adverso.

Es por ello imperativo analizar la expresión por inmunohistoquímica del c-Kit y del VEGF en el Ganglio centinela positivo de pacientes con melanoma ya que este indica de manera directa el status ganglionar y da pie a la búsqueda de una probable alternativa terapéutica.

## INTRODUCCION.

El melanoma es una neoplasia de pigmento producido en las células (melanocitos) localizado predominantemente en la piel (90%), pero además puede afectar ojos, tracto gastrointestinal, meninges cavidad oral, mucosas y genitales.

La melanogénesis es el proceso mediante el cual la célula normal (melanocito) se transforma en célula maligna, debido a mutaciones genéticas progresivas que llevan a la alteración en la proliferación celular, diferenciación y muerte.

El melanoma cutáneo primario se desarrolla a partir de un precursor nevo melanocítico (común, congénito, atípico o displásico) y hasta el 60% se desarrolla de novo (no-lesión preexistente)

La causa primaria del melanoma es por exposición a rayos UV, pero existen otros factores de riesgo que incluyen piel blanca, factor hereditario, edad y raza. (1)

El melanoma constituye la forma más letal de cáncer de piel y actualmente representa el séptimo lugar en cuanto a incidencia en USA. Se predice para este año 2008 se diagnosticaran 62480 nuevos casos de melanoma con una mortalidad 8420. Actualmente mas de 1.3% de los americanos desarrollará melanoma a lo largo de su vida. (2)

La incidencia del Melanoma se ha incrementado a través del tiempo y en los últimos 2 decenios se han triplicado debido a diversos factores ambientales y a su mayor detección en etapas tempranas permitiendo así la curabilidad en este grupo de pacientes.

El riesgo de presentar melanoma en USA en el año 2000 fue de 1/58 hombre y de 1/82 mujeres, con un rango promedio de presentación de 45-55 años. (3)

En México el cáncer de piel ocupa el segundo lugar de frecuencia según el Registro Histopatológico de las neoplasia malignas (2003) para las mujeres representa el segundo sitio de frecuencia, mientras que para los varones el primero. .

En los tres últimos decenios el melanoma ha aumentado su frecuencia en varios lugares del mundo hasta en 400%; en nuestro país se carece de estadísticas confiables, sin embargo, se reporta un promedio anual de 1031 casos nuevos ocasionando la muerte de 389 pacientes, según el registro histopatológico de neoplasia malignas (2003) de los cuales 474 fueron hombres, y 557 mujeres, con una incidencia de 0.22/100 000 habitantes. En cuanto al género no se observó diferencia significativa en la tasa de mortalidad ya que para el varón se estimó en 0.26 y para la mujer en 0.22. sin embargo, el grupo de edad más afectado fue mayor de 65 años, tanto en varones como en mujeres.

En la clínica de melanoma del INCAn este aumento también ha sido evidenciado con un desarrollo de casi el 500% en los últimos años. Representando un promedio anual de 74 (2002) a 99 casos (2003) a 108 casos (2007),

Si bien el melanoma no representa un problema de alto impacto para la salud pública, es importante notar que cada año habrá cuando menos 1000 nuevos casos y 389 muertes a nivel Nacional. (4,5)

El sistema de clasificación tradicional se ha centrado en el sitio de origen, profundidad del tumor, subtipo histológico. El melanoma cutáneo se ha clasificado en 4 grandes subgrupos:

Melanoma de diseminación superficial

Melanoma nodular

Melanoma lentigo maligno

Melanoma Acral lentiginoso.

En México existen varias diferencias con el resto del mundo, una de ellas es la frecuencia de presentación de los diferentes patrones clínicos-patológicos.

Los distintos subtipos están basados en sitio anatómico y características histopatológicas.

En nuestro país el predominante es el tipo Acral Lentiginoso (51- 55%) mientras que en los países caucásicos representa no mas del 10%

SUBTIPOS	Literatura mundial	México
Diseminación Superficial	70%	14%
Nodular	15-30%	34%
Lentigo Maligno	4-10%	1%
Acral lentiginoso	2-8%	51%

El Melanoma Acral Lentiginoso, reconocido inicialmente por Reed en 1976 (6) es un tipo de melanoma con fase de crecimiento radial que ocurre en superficies plantares, palmares, subungueales y ocasionalmente en mucosas. Histológicamente consiste en una proliferación de células a lo largo de la unión dermo-epidérmica, las cuales muestran núcleos prominentes e índices amplios citoplásmicos nucleares, de manera características se asocian con incremento en la producción de gránulos de melanina, lo que llena y destaca las extensiones dendríticas de las células. (7)



Actualmente se desconocen totalmente los efectos genéticos y bioquímicos que transforman al melanocito (una célula que raramente prolifera en la piel adulta normal), en una célula capaz de replicarse, dando lugar a un tumor muy invasivo y a menudo fatal, la etiología del melanoma cutáneo probablemente sea multifactorial implicando efectos complejos de la exposición intermitente a la radiación UV combinados con el genotipo, fenotipo y a la inmuno competencia de cada individuo. La progresión biológica del melanoma refleja una alteración progresiva en el complemento genético del melanocito, que en estado no transformado dispone de barreras múltiples e independientes para la transformación oncogénica. La rotura de estas barreras depende del acumulo gradual de alteraciones irreversibles en un número desconocido de genes. (8, 9)

Existen modelos de desarrollo y progresión del melanoma que correlacionan los estadios con las alteraciones biológicas y acumulativas. Las características fundamentales del melanoma que se derivan de esta progresión son la relación entre los nevos con alteraciones arquitecturales y atipia citológica (nevos atípicos o “displásicos”) con el melanoma, el aumento de la proliferación de los melanocitos dentro de la epidermis y la asunción por parte del tumor de la competencia para invadir la dermis, proliferar en ella y desarrollar su capacidad metastásica. La adquisición progresiva de estas características implica una serie de acontecimientos complejos que se derivan de alteraciones moleculares en una subpoblación o clona celular. Estas alteraciones se producen en dos tipos de genes: genes supresores tumorales cuyas funciones son suprimidas, disminuidas o alteradas y oncogenes dominantes cuyas funciones son activadas, aumentadas o modificadas. (10, 11)

#### INICIACION.

La inducción de una inestabilidad genética mantenida dentro del genoma del melanocito representa un acontecimiento crítico para el desarrollo del melanoma. La inestabilidad genética es la primera fase de la progresión molecular, existen varios genes implicados localizados en cromosomas 1,6,7,9,11 y 22.

Existe evidencia suficiente que implican a 1 o más genes supresores tumorales localizados en la región p21 de cromosoma 9 en las fases precoces del desarrollo del melanoma tanto esporádico como familiar. Detectándose así deleciones en la región 9p21 (46-73%) en melanoma esporádico. En esta región crítica se ha localizado un gen supresor tumoral el inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina (CDKN2) cuyas deleciones hemi y homocigóticas son frecuentes tanto en melanoma metastásico cultivados (18%) como no cultivados (22%), también se observan mutaciones intragénicas de CDKN2 en líneas celulares de melanoma (16-40%). el gen CDKN2 codifica una proteína de 16 KD (p16) que inhibe la cinasa dependiente de la ciclina 4 y 6; cuando la proteína p16 se une al CDK4 y al CDK6 se suprime la transición de G1 a S. (12,13)

## ALTERACION DE LA PROLIFERACION

La transición de la fase G0 a G1 y S en las células del melanoma parece implicar la evolución de las células que han perdido el control sobre la transición G1 a S debido en parte a defectos en las proteínas reguladoras del ciclo celular (proteína p16, p15, CDK4,CDK6,) estos tipos de defectos pueden dar lugar al acortamiento del a fase G1 y a la entrada inadecuada en la fase S, durante la proliferación normal o inducida por ultravioletas, lo que predispone al daño genético del melanocito. (14)

## EVOLUCION DE LA INESTABILIDAD

El genoma del melanocito puede ser lesionado por un daño endógeno debido a la diseminación de las pirimidinas, la generación de radicales libres oxidativos, la infidelidad en la replicación del ADN, etc. La inhibición de la reparación del ADN se relaciona directamente con la inducción del cáncer. Sin embargo puesto que los melanocitos epidérmicos normalmente se dividen solo de forma ocasional en la piel del adulto, el daño espontáneo del ADN probablemente tiene escasas consecuencias en la tumorigénesis. Pero si el melanocito se ve inducido a dividirse, los defectos del ADN contribuirán a su transformación. (15)

## GENES IMPLICADOS

La integridad estructural del genoma se mantiene por un sistema de controles del ciclo celular cuya pérdida constituye un paso crítico en la tumorigénesis. El gen supresor tumoral p53 tiene un papel central en este mecanismo, puesto que su función primordial es determinar la detención del ciclo celular o la producción de apoptosis en respuesta a la lesión del genoma e impedir la propagación de defectos genéticos por parte de la célula. El defecto más frecuente del p53 son mutaciones puntuales en regiones conservadas del gen que suprimen la función normal de las proteínas p53 y da lugar a su acumulo en el núcleo y en el citoplasma de la célula. El aumento de los niveles de p53 induce directamente la transcripción del gen WAF1 cuyo producto: la proteína p21, potente inhibidor de numerosas cinasas dependientes de ciclinas G1 (CDK). La inhibición de la actividad enzimática de ciclinas induce una detención temporal del ciclo en G1 que permite que tenga lugar una reparación del ADN antes de que se produzca la división celular. La pérdida funcional de los puntos de control debido a los defectos de p53, CDK4 ó ciclinas da lugar a la progresión de la tumorigénesis .(16)

También podrían estar implicados en la supresión de la apoptosis defectos de otras proteínas tales como Bcl.2 (17)

Laure et al observó que la mutación del gen c-KIT en modelos murinos resultaba en una transformación maligna con producción de tumor similar al melanoma amelanico. Lassar y Bickford, Natali et al, y Zakut sugirieron que la expresión del c-Kit decrece progresivamente durante el crecimiento local del tumor a la invasión. (18,19)

Los cambios moleculares asociados con el melanoma de crecimiento radial a crecimiento vertical no han sido del todo definidos. Se ha demostrado previamente que la expresión de moléculas adhesinas MCAM/MUC18 se correlaciona

directamente con el potencial metastásico del melanoma. Sin embargo en esta progresión se ha determinado que la pérdida de expresión del c-kit es un factor importante. Todo ese proceso es regulado por el AP2. De igual manera es el que regula otros genes implicados en la progresión del melanoma como E-caderina, p21/WAF-1, HER-2, BCL-2, IGF.R1, FAS/APO-1 y el receptor de trombina (PAR-1).

De esta forma se propone que la pérdida de AP2 es un evento crítico en el desarrollo del melanoma. Durante este proceso de cambio sigue un trayecto direccional de cambios de melanocitos a nevo, de fase radial a fase vertical hasta el fenotipo metastásico, el mecanismo sin embargo aun no ha sido dilucidado. (20) FIGURA 1.

## C-KIT

El descubrimiento a principios de los 80 que mutaciones de oncogenes específicos que alteran la actividad enzimática de las proteínas involucradas en las vías de regulación del ciclo celular podrían ser usadas como dianas para la inhibición del crecimiento tumoral, dio lugar al desarrollo de una serie de fármacos con capacidad inhibitoria más o menos específica en las diferentes vías de transducción de señales.

El c-KIT (CD 117) es una glicoproteína transmembrana de 145 KDa con actividad tirosin-quinasa estructuralmente similar a PDGF o a MCSF que expresa en las células hematopoyéticas, células intersticiales de Cajal, germinales, mastocitos y melanocitos.

El c-kit es un proto-oncogen localizado en el cromosoma 4 (4q11-12.), próximo al gen del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) y también al receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR). Este proto-oncogen produce una proteína de su mismo nombre, también denominada factor receptor de células progenitoras, funciona como un receptor con actividad tirosin-quinasa. Es el homólogo celular normal del producto del oncogén vírico V-Kit y pertenece a la subclase III de la familia de receptores de tirosina quinasa.

CD 117 es un epítipo localizado en el dominio extracelular del receptor KIT. Es estructuralmente similar a otros receptores con actividad tirosin-quinasa con posibilidades oncológicas, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRs) A y B, CSF1R (factor estimulantes de colonias) y otros. El receptor posee un dominio extracelular con cinco regiones de tipo Ig-like, una región única transmembrana y un dominio intracitoplásmico con actividad tirosin-quinasa. (21) VER FIGURA 2

El ligando para Kit se conoce como SCF (stem cell factor), la activación del receptor se produce como consecuencia de un proceso de homodimerización; este proceso provoca una serie de cambios estructurales en el receptor que determinan una activación del dominio con actividad quinasa de KIT y fosforilación de numerosas proteínas. (22)

El resultado final de la activación es la génesis de una serie de señales que actúan sobre procesos cruciales en la tumorigénesis como la proliferación celular, adhesión, apoptosis y diferenciación. En el tejido normal; el receptor tirosin-quinasa y su factor de crecimiento, conocido como el factor de la célula madre SCF, son esenciales para la hematopoyesis, la melanogénesis y la fertilidad. Se ha demostrado que la activación del KIT juega un papel crítico en las diferentes funciones celulares antes mencionadas. (23, 24)

El SCF o ligando del c-Kit estimula la migración, proliferación y diferenciación de melanocitos en ratas, su pérdida conlleva a la ausencia de melanoblastos, síndrome anémico, lesiones no pigmentadas, deficiencia en células mastocíticas y esterilidad. El SCF puede ser producido en la piel por queratinocitos, fibroblastos y células endoteliales. SCF está compuesta de un dominio extracelular, uno transmembrana y uno citoplasmático. El SCF es expresado en células endoteliales y queratinocitos y en menor frecuencia en melanocitos basales. (25) FIGURA 3

### C KIT Y MELANOMA.

C-KIT (CD 117) codifica un receptor de tirosin kinasa cuyo ligando es SCF (Stem cell Factor) o también conocido factor de resistencia (SLF) o Kit ligando, regula MAPK y PI3K (fosfatidil inositol 3 kinasa), fosfolipasa C, Src y MITF (factor de transcripción asociada a microftalmia). Kit-SCF es esencial para el desarrollo del melanocito, diferenciación, proliferación, supervivencia y migración. SCF es un mitógeno que causa incremento en la producción de melanina en melanocitos normales. Los melanocitos normales son dependientes de señalización del c-Kit para supervivencia pero este efecto se pierde en células nevícas. La mutación hereditaria del C-KIT lleva al piebaldismo caracterizado por pérdida de melanocitos y otras anomalías. (26)

La activación del C-kit también se ha visto involucrado en otros cánceres, en diversos mecanismos de acción, la expresión del c-Kit en melanoma es extensa y variada, sin embargo no existe correlación consistente entre la expresión del c-Kit y variables del melanoma (espesor, invasión, ulceración, edad, sitio, sexo). De igual manera su expresión no constituye un valor pronóstico en el periodo libre de enfermedad. (27)

Tres mecanismos generales de activación del C-Kit se han visto implicados en el desarrollo del tumor:

- 1.- Estimulación autócrina y/o parácrina del receptor por los ligandos SCF
- 2.- Activación por otras quinasas y/o pérdida de regulación de la actividad fosfatasa
- 3.- Adquisición o activación de mutaciones.

Mutaciones en el proto-oncogen ocasionan alteraciones en la PIGMENTACION, tumores del estroma Gastrointestinal, hiperplasia de mastocitos, leucemias, cáncer de mama, cáncer de células pequeñas de pulmón y tumores germinales.

El papel de este proto-oncogen juega un papel en el desarrollo y progresión del melanoma encontrando su expresión en melanocitos normales, en melanomas

tempranos y metastásicos, sin embargo, la variedad acral lentiginoso fue la que mayor frecuencia expresó C-Kit. (75%) (28)

A pesar del aumento en la incidencia del melanoma, las bases moleculares del desarrollo continúan sin dilucidarse, aunque los nevos melanocíticos y en particular los displásicos son importantes en el desarrollo del melanoma, no se conocen las alteraciones moleculares.

Estudios sobre el crecimiento tumoral han mostrado que la progresión depende de angiogénesis, responsable de suministrar nutrientes y oxigenación al tumor.

La angiogénesis se define como el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, en el caso de las neoplasias es inducida por las propias células tumorales. La angiogénesis es un proceso necesario en el crecimiento tumoral ya que permite no sólo el aporte de oxígeno y nutrientes sino también el paso de células neoplásicas al torrente sanguíneo para diseminación metastásica. La actividad angiogénica es considerada como factor pronóstico .

En la angiogénesis existe un equilibrio entre los factores activadores e inhibidores. El factor de crecimiento en endotelio vascular (VEGF) es una citocina multifuncional que favorece la proliferación de las células endoteliales, induce la formación del factor estimulador de la uroquinasa plasminógena que permite la transformación del plasminógeno en plasmina (factor de degradación de la matriz extracelular) y activa las colagenasas intersticiales, lo cual facilita la migración de las células endoteliales y neoplásicas

Para mantener una idea de la vasculatura, las células tumorales producen o inducen su producción a través de otras células, identificándose así algunos factores angiogénicos y citocinas. unos que estimulan y otros que inhiben el proceso angiogénico.

El VEGF también conocido como VPF (factor de permeabilidad vascular) es una glicoproteína endotelial específica mitógena que induce vascularización propiciando el crecimiento tumoral. Recientes estudios han demostrado que la presencia o incremento de VEGF mRNA es un factor pronóstico adverso para algunos carcinomas de colon, gástrico y en el melanoma.

Existen varios factores angiogénicos que son expresados en células de melanoma en vivo y se ha documentado que el VEGF juega un papel en la angiogénesis y progresión en melanoma.

Existen 5 isoformas de VEGF 121, 145,165, 189,206. De los cuales el 165 es el más abundante en tejidos humanos y el 121 predomina en melanomas. Se ha visto que la expresión del VEGF en diversos estudios fue significativamente alto en melanoma de crecimiento vertical comparado con melanoma de crecimiento radial, sugiriendo una correlación entre VEGF que induce la angio-génesis y la progresión del melanoma.

Recientemente se ha descrito que ambos el C-Kit y el VEGF son regulados por el factor transcripcional AP-2, la pérdida crucial de ambos lleva al desarrollo del melanoma. En lesiones melanocíticas la expresión de AP2 fue positivamente correlacionada con c-Kit, sin embargo, la asociación entre ambas aun no se ha estudiado.

La evidencia sugiere que la angiogénesis tumoral juega un papel pivote en el desarrollo, crecimiento, mantenimiento y potencial metastásico del tumor. Podemos afirmar que VEGF es expresado con alta especificidad en melanoma y no en lesiones melanocíticas proliferativas benignas. (29)

Es importante señalar que el abordaje terapéutico del melanoma primario Vs metastásico es crucial, La distinción clínica de estos al igual que microscópicamente, es difícil ya que comparten características histológicas e inmuno histoquímicas similares, la diferencia inmuno fenotípica fue observada en la expresión del CD 117, expresado en células melanocíticas normales nevos melanocíticos, melanoma in situ con crecimiento radial, no así en los melanomas metastásicos, esto probablemente debido a la teoría de pérdida del CD 117 en depósitos secundario de melanoma. (30)

En modelos preclínicos la expresión del c-Kit fue asociado con incremento en la tumorigénesis y progresión al melanoma metastásico, (mayor letalidad) .acorde a este reporte el cambio ocurre cuando la fase de crecimiento radial progresa a la fase vertical, .esto no correlaciona con el papel del c-Kit en tumores del estroma gastrointestinal. (31)

La explicación por la pérdida de la expresión génica del c-KIT en melanoma aún no ha sido determinado, recientes estudios señalan que la relación entre el c-KIT y AP2 es directamente proporcional. Huang y colaboradores a ausencia de expresión del c-KIT correlaciona con la ausencia del AP-2, y que el AP-2 sirve como un regulador positivo del c-KIT (32,33)

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente no se cuenta con una terapia eficiente para melanoma. Se ha reportado que c-Kit se expresa en melanoma acral lentiginoso hasta en un 75%. Deseamos conocer la prevalencia del c-Kit y el VEGF en ganglio centinela detectada por mapeo linfático para eventualmente ser usado como alternativa de terapia blanco.

La expresión del C-Kit y del VEGF constituyen un factor adverso en pacientes con melanoma en estadio temprano y GC positivo.

## HIPOTESIS.

C-Kit se expresa en melanoma acral lentiginoso, el ganglio centinela determina la presencia de micro metástasis en melanoma, por consiguiente las metástasis de melanoma en ganglio centinela expresaran c-kit y VEFG



## JUSTIFICACION

- 1.- No existen estudios con relación a la expresión del c-Kit y VEGF en pacientes con melanoma y ganglio centinela positivo.
- 2.- La presentación Acral lentiginosa es frecuente en México y es la que mayormente expresa C-kit, probablemente en este subgrupo de pacientes se beneficie con terapia blanco
- 3.- No existe estudio en cuanto a la expresión del c-KIT y VEGF en melanoma en población Mexicana.
- 4.- No existe una terapia sistémica eficaz en el melanoma.

## OBJETIVOS

### GENERAL

Determinar la viabilidad y frecuencia de expresión del C-Kit Y VEGF en Ganglio centinela Positivo de pacientes con melanoma.

### ESPECIFICOS::

- 1.- conocer la frecuencia de expresión del c-Kit y VEGF en el Ganglio centinela positivo.
- 2.-correlacionar ganglio centinela c-Kit y VEGF con nivel de Breslow

### TIPO DE ESTUDIO.

Retrospectivo, descriptivo, observacional y transversal.

## MATERIAL Y METODOS.

Se realizó la búsqueda de expedientes de pacientes con diagnóstico histológico de melanoma y que fueron llevados a búsqueda de ganglio centinela y que estos resultaron positivos a macro metástasis o micro metástasis por Hematoxilina y eosina o por inmuno histoquímica.

La selección se basó en la disponibilidad de laminillas, tejidos congelados y almacenados en el archivo de bloques de parafina del servicio de Patología se revisaron las laminillas para confirmar el diagnóstico, paralelamente se seleccionaron bloques de parafina, y en estos se realizaron cortes finos de 3µm de los bloeis de arrays, que se colocaron sobre portas tratados (DAKO)

Los bloques de tejidos de parafina se cortaron en micrótopo rotatorio con navajas desechables (Feather Co) a 3 µm de espesor y luego montados en portaobjetos silanizados. Los especimenes obtenidos fueron tratados con una solución de peróxido de hidrógeno al 5% (para inhibir la presencia de peroxidasa endógena), lavados con buffer PBS pH 7.2, incubados con el anticuerpo c-kit (CD117), A4502 DAKO con dilución 1:50, revelados con avidina-biotina-complex (ABC) y la puesta en evidencia de la inmuno reacción fue realizada con el cromógeno de color rojo 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), se contrastaron con tinción de Hematoxilina y montados en medio hidrófilo permanente Faramount (Dako, S3025).

La laminilla fue observada bajo microscopia de luz expresando positividad del c-kit ante presencia y negatividad cuando esta no presento intensidad.

Para la determinación de VEGF se efectuó lo siguiente. Tras desparafinar bloques se realizó técnica inmuno histoquímica con el método estreptavidina-biotina-peroxidasa (LSAB-Dako-citomatyon). El método de inmunotinción fue automatizado mediante el sistema Dako Tech Mate 500 plus, se realizó recuperación antigénica incubando las preparaciones histológicas en tampón citrato pH6.0 y tratamiento por calor en autoclave a 1.5 atmosferas durante 3 minutos, el anticuerpo primario utilizado fue VEGF de Santacruz Biotechnology (ca-USA) a una dilución de 1:100 El revelado se realizó con diaminobencidina.

La valoración de los casos se hizo con un microscopio óptico valorando la intensidad de la tinción, otorgándose negativo ante ausencia o menos del 10%, y positivo mayor del 10%.

## CRITERIOS DE INCLUSION

Pacientes tratados en el servicio de Melanomas INCAN con expediente laminillas y bloques de parafina completos llevados a Ganglio Centinela con resultado positivo.

## CRITERIOS DE EXCLUSION.

Pacientes que no cuenten con expediente, laminillas o bloques de parafina completos.

## CRITERIOS DE ELIMINACION.

Pacientes no tratados en el INCAN

## TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Estudio exploratorio de 18 pacientes.

## DESCRIPCION DE PROCEDIMIENTOS.

Recopilación de datos del expediente electrónico y físico.

Llenado de hoja de captura de datos donde se incluyan variables definidas.

Clasificación de pacientes de manera general y específica de acuerdo (tipo histológico; Breslow, edad, sexo, etc)

Análisis de datos mediante estadística descriptiva.

## ANALISIS ESTADISTICO.

Estadística descriptiva: medidas de tendencia central y dispersión, rango, media, desviación estándar, porcentajes para establecer las características epidemiológicas de la población estudiada

## CONSIDERACIONES ETICAS.

Al efectuar la presente investigación no se incurrió en violaciones del Código de Ética Internacional delineados en la declaración de Helsinki , revisada por la 58ava. Asamblea de la Asociación Médica Mundial de Edimburgo , Escocia en Octubre del 2000.

Dado que la investigación es considerada sin riesgo de acuerdo al artículo 17 del Reglamento de la Ley General del Salud en materia de Investigación para la salud, solo es necesario la aprobación del comité de ética e Investigación del propio hospital para la revisión de expedientes.

Titulo segundo, capítulo 1, artículo 17, sección 1: Investigación sin riesgo, no requiere consentimiento informado.

## RESULTADOS.

En este estudio se examinaron la expresión del c-Kit vía inmunohistoquímica en ganglio centinela positivo de pacientes con melanoma.

Se revisaron un total de 577 expedientes físicos de los cuales 223 fueron sometidos a búsqueda de ganglio centinela ya sea por azul de patente, nanocoloide o con ambas modalidades, identificándose 65 pacientes con GC positivo, mismos llevados a disección complementaria.

De este universo de pacientes se realizó estudio exploratorio a 18 pacientes

En cuanto al nivel de Breslow 3 pacientes resultaron con B menor de 1mm, 25 pacientes con B de 1.4mm, 29 ptes con B mayor de 4mm, y 8 pacientes sin poder definir nivel de Breslow

BRESLOW 1mm	BRESLOW 1-4mm	BRESLOW 4mm	BRESLOW NV	TOTAL
3	25	29	8	65
1	7	8	2	18

45/65 pacientes se catalogaron como melanoma tipo acral lentiginoso, correspondiendo al 69%

Del universo exploratorio

De las características demográficas , 8 correspondieron al sexo masculino (44.4%) y 10 al sexo femenino (55.6%), con rango de edad de 23 a 81 años con media de 55 años  $\pm$ 13.8.

Con respecto a la localización del tumor primario. 15 pacientes tuvieron lesión en extremidades (83.3%) y 3 pacientes en dorso (16.7%),

Con respecto al tipo histológico 14 correspondieron al tipo acral lentiginoso, 4 a la variante nodular.

Los resultados de la expresión de c-Kit en forma global fue del 50% y de VEGF fue de 50% Independientemente del tipo de lesión. Con una p 0.528 y 0.378 sin obtener diferencia significativa respectivamente.

Con respecto al nivel de Breslow el grupo predominante fue el trupo intermedio 1-4mm 7 pacientes y Breslow mayor de 4mm 8 pacientes. Con una p 0.650 para VEGF y P.036 para c-Kit. Sin obtener diferencia alguna .

De la disección complementaria se obtuvieron lo siguientes resultados 14 pacientes (77.8%) resultaron hiperplasicos y solo 4 (22.2%) resultaron positivos.

## DISCUSION.

Con el tratamiento actual no efectivo en melanoma metastásico, existe un interés en el desarrollo de nuevas modalidades de terapias blancas encaminadas a bloquear señales de transducción entre las células normales y malignas.

En los estudios analizados en los que la mayoría refiere pérdida de expresión del C-Kit conforme hay mayor invasión o progresión.

Posterior a la introducción del trastuzumab ( Herceptin) para el tratamiento en cáncer de mama Her2neu., Imatinib representa otro ejemplo para tumores que expresan c-Kit (GIST) ambos aprobados por la FDA.

Actualmente mas de 25 estudios investigan el efecto del Imatinib en tumores con C-Kit positivo, (<http://www.clinicaltrials.gov>). A pesar de estas investigaciones la búsqueda intencionada de c-Kit ha no se ha establecido de rutina.

Datos recientes han sugerido que la respuesta a imatinib puede no ser debido a los niveles de expresión primario del c-Kit si no que la respuesta es basada en el porcentaje de mutación del C.kit, la localización y el tipo de mutación, así los tumores que tienen mutación del exón 11 responden mejor a los que poseen mutación del exón 9, mientras que la respuesta es mínima o nula en tumores sin mutación.

Por lo tanto concluimos que el papel de. C-Kit y VEGF en ganglio centinela positivo de pacientes por melanoma aun no se ha definido,

La expresión del C-Kit ha sido reportada en nevos melanocíticos y en melanoma no así en ganglio centinela positivo.

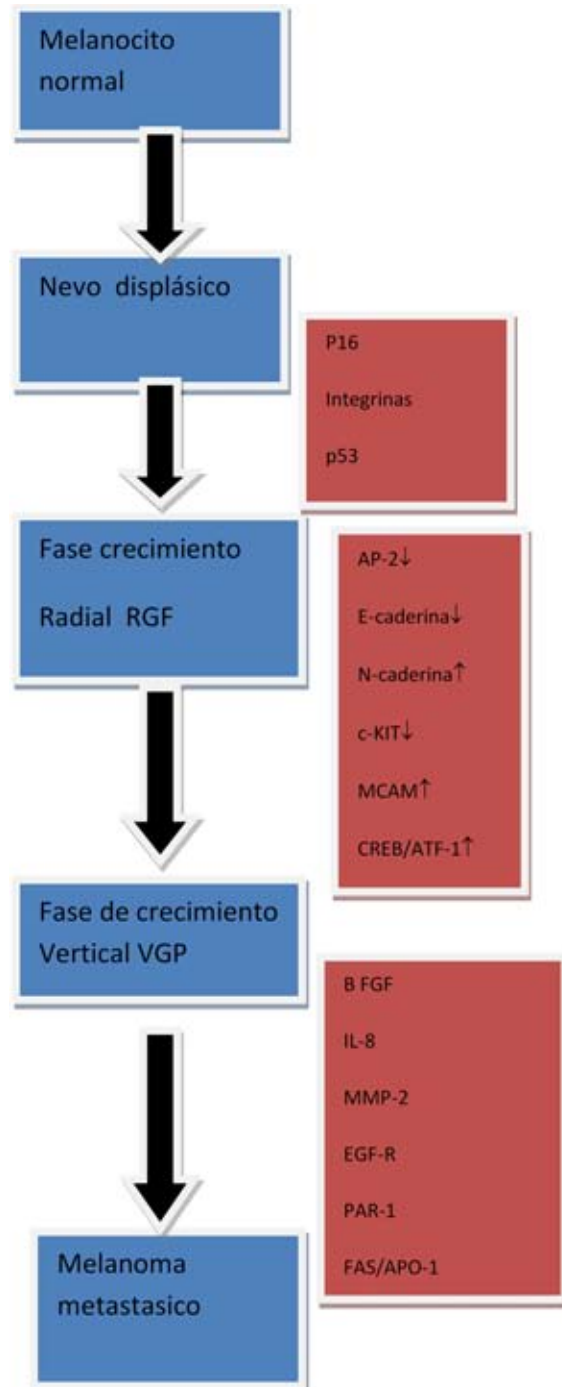
## CONCLUSION.

La expresión del .Kit es observada en una significativa proporción de ganglios centinelas positivos, sin embargo la implicación pronóstica aun no se ha identificado.

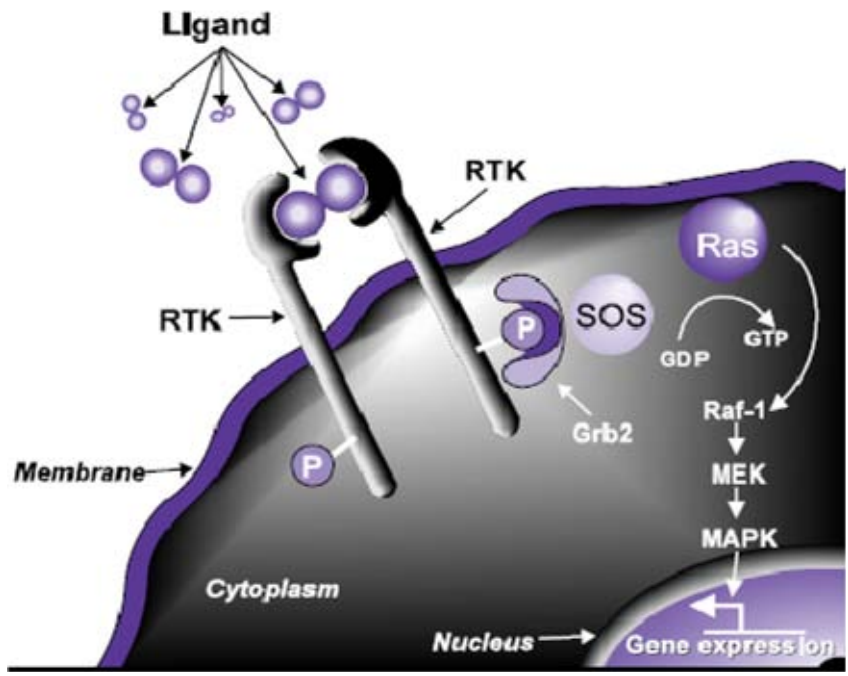
La asociación de la expresión observada entre VEGF y c-Kit en melanoma ofrece una nueva comprensión el el desarrollo del melanoma particularmente en el factor de transcripción I AP2. Estudios mayores con más casos son necesarios en orden de establecer el grado exacto de correlación.



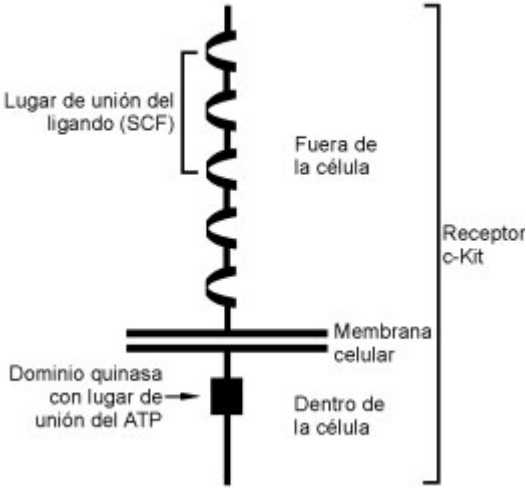
TABLAS E IMÁGENES.



*Cambios moleculares asociados con la progresión del melanoma.*



C-KIT Y LIGANDOS..



ESTRUCTURA ESQUEMATICA DEL C-KIT

**sexo**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	masc	8	44.4	44.4	44.4
	feme	10	55.6	55.6	100.0
	Total	18	100.0	100.0	

**local**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	extre	15	83.3	83.3	83.3
	dorso	3	16.7	16.7	100.0
	Total	18	100.0	100.0	

**Estadísticos descriptivos**

	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
edad	18	23.00	81.00	55.8333	13.87868
N válido (según lista)	18				

**tipo\_histol**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	acral	12	66.7	70.6	70.6
	nodular	4	22.2	23.5	94.1
	12.00	1	5.6	5.9	100.0
	Total	17	94.4	100.0	
Perdidos	Sistema	1	5.6		
Total		18	100.0		

**Breslow**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	<1	1	5.6	5.6	5.6
	1-4	7	38.9	38.9	44.4
	>4	8	44.4	44.4	88.9
	noclas	2	11.1	11.1	100.0
	Total	18	100.0	100.0	

**c\_kit**

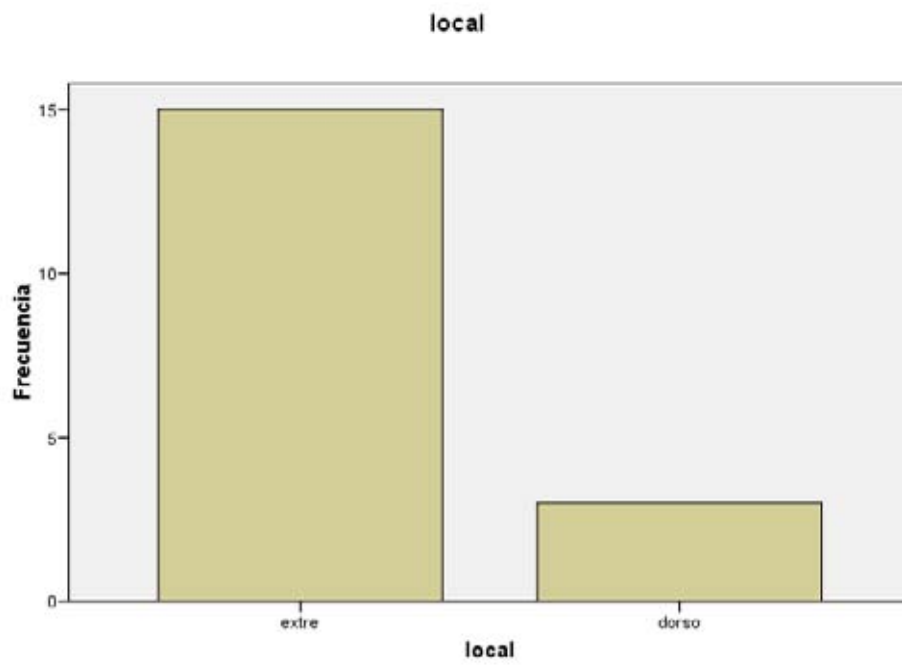
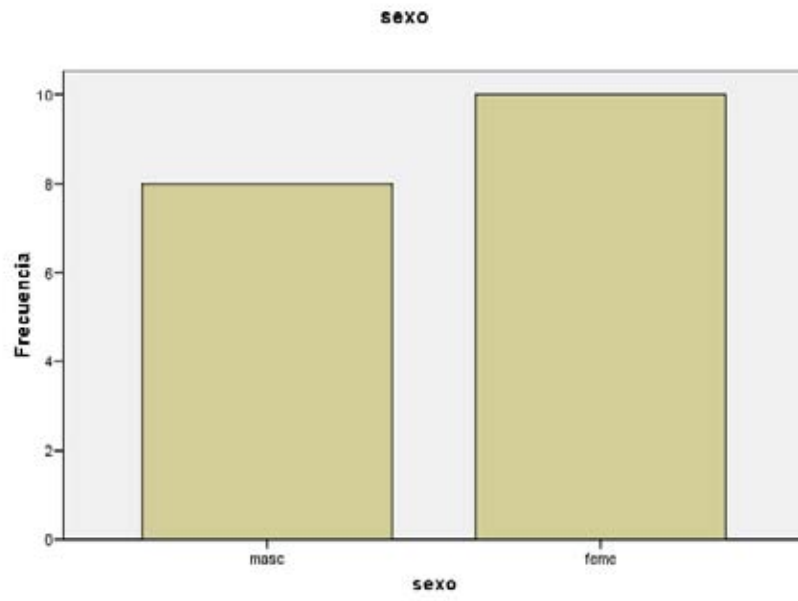
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	negativo	9	50.0	50.0	50.0
	positivo	9	50.0	50.0	100.0
	Total	18	100.0	100.0	

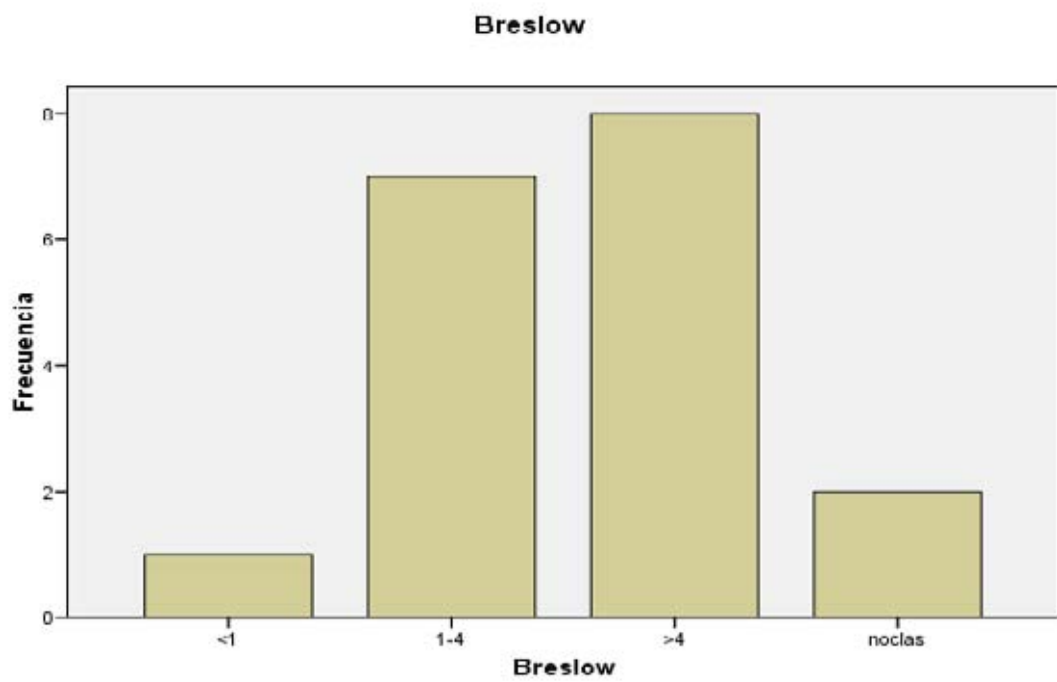
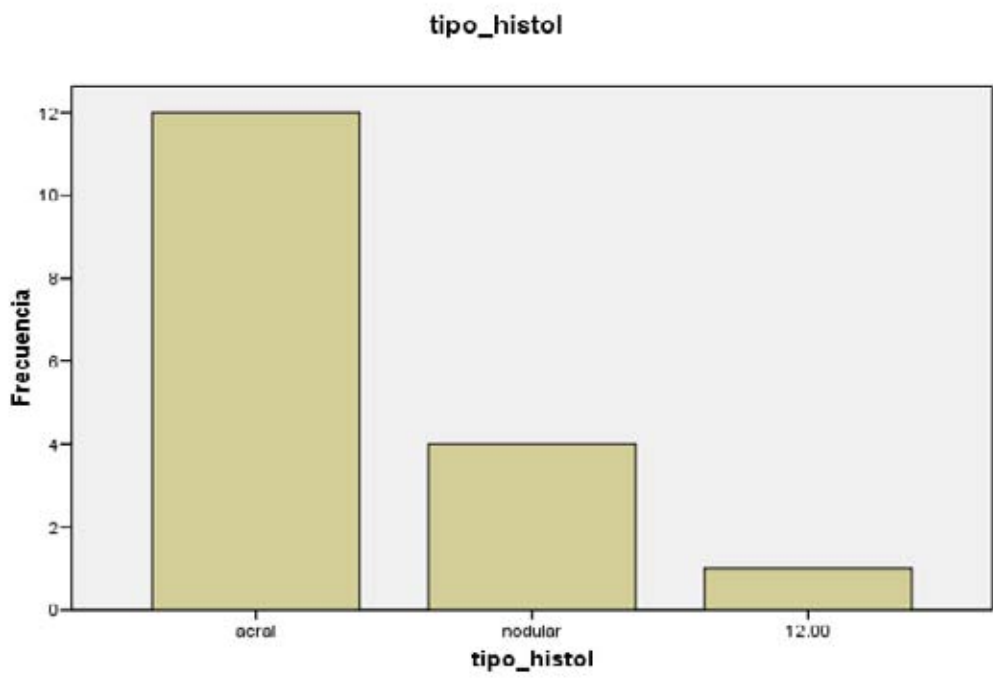
**vegf**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	negativo	9	50.0	50.0	50.0
	positivo	9	50.0	50.0	100.0
	Total	18	100.0	100.0	

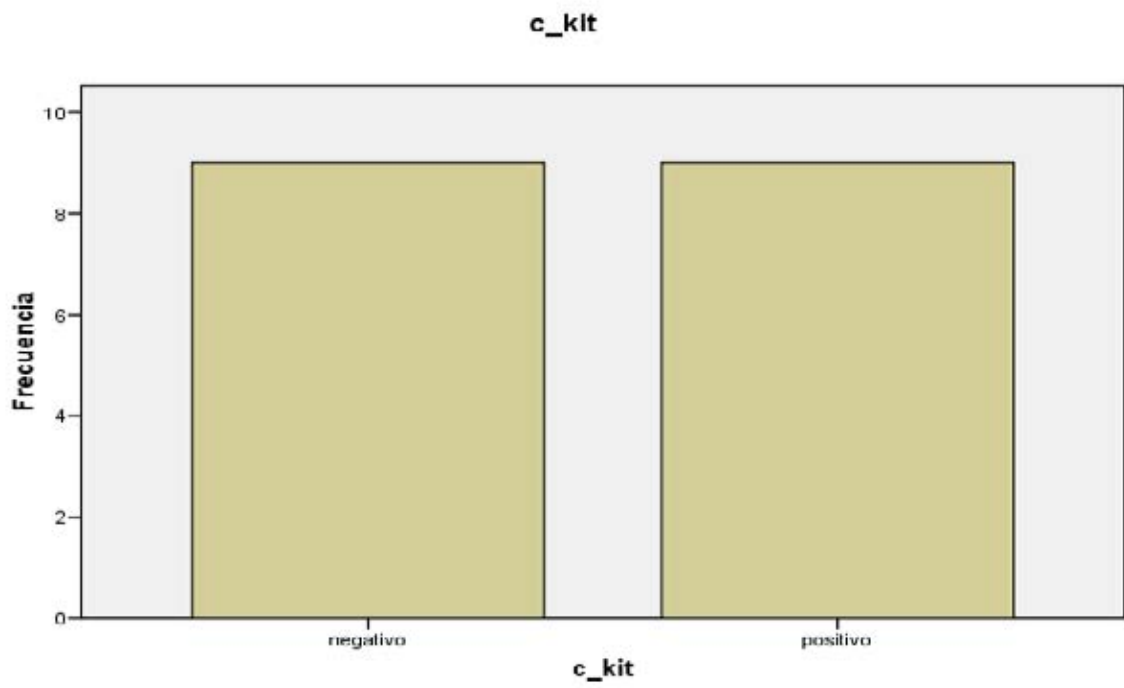
**GGcomple**

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	hiperpla	14	77.8	77.8	77.8
	positivo	4	22.2	22.2	100.0
	Total	18	100.0	100.0	

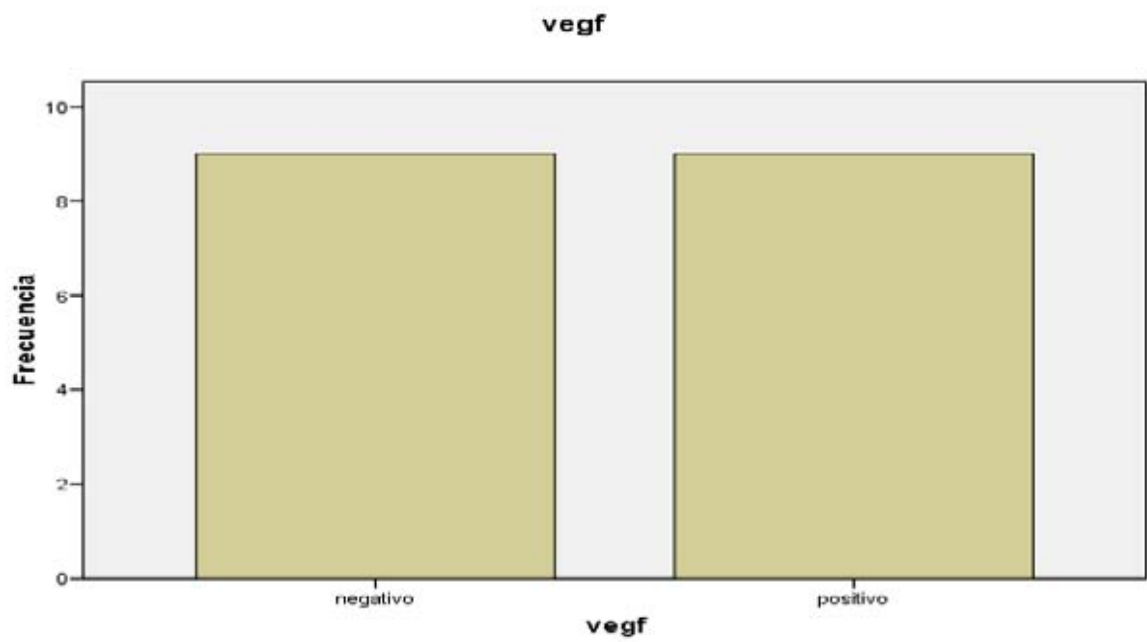




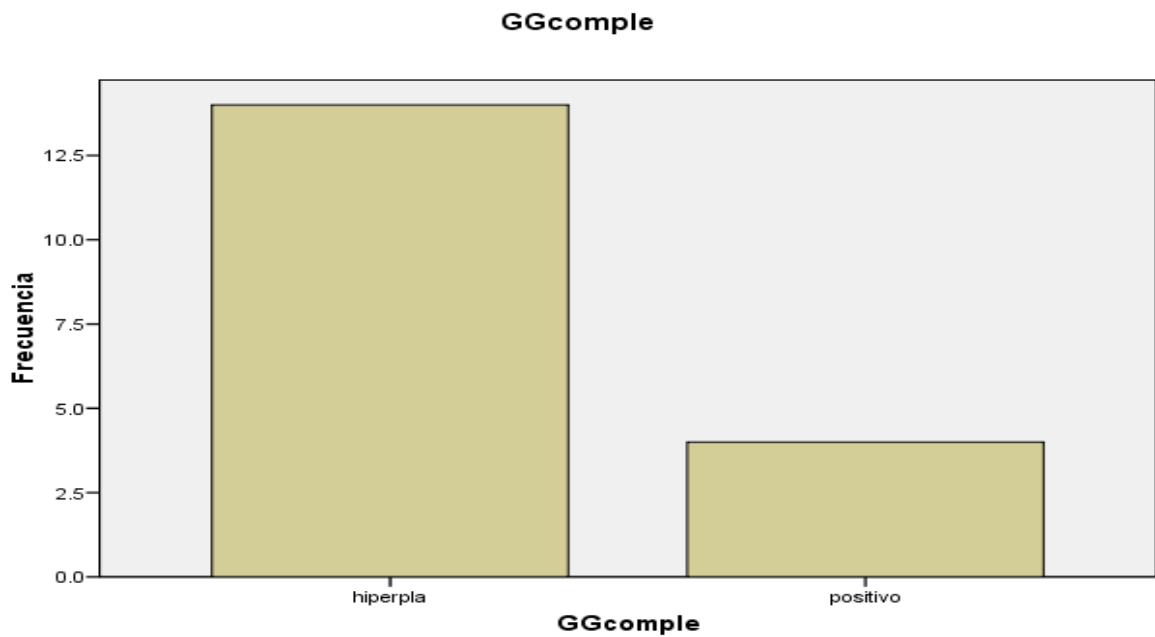
NIVEL DE BRESLOW



PORCENTAJE DE EXPRESION DEL C-KIT



PORCENTAJE DE EXPRESION DEL VEGF



RESULTADOS DE DISECCION COMPLEMENTARIA.

**Tabla de contingencia**

Recuento

		c_kit		Total
		negativo	positivo	
tipo_histol	acral	5	7	12
	nodular	2	2	4
	12.00	1	0	1
Total		8	9	17

RECUESTO HISTOLOGICO.

**Tabla de contingencia**

P=0.528

Recuento

		vegf		Total
		negativo	positivo	
tipo_histol	acral	6	6	12
	nodular	1	3	4
	12.00	1	0	1
Total		8	9	17



P=0.3

78

**Tabla de contingencia**

Recuento

		c_kit		Total
		negativo	positivo	
tipo_histol	acral	5	7	12
	nodular	2	2	4
	12.00	1	0	1
Total		8	9	17

P=0.528

**Tabla de contingencia**

Recuento

		vegf		Total
		negativo	positivo	
tipo_histol	acral	6	6	12
	nodular	1	3	4
	12.00	1	0	1
Total		8	9	17

P=0.378

**Tabla de contingencia**

Recuento

		vegf		Total
		negativo	positivo	
sexo	masc	2	6	8
	feme	7	3	10
Total		9	9	18

P=0.058 aquí hay una tendencia mujeres negativo

**Tabla de contingencia**

Recuento

		c_kit		Total
		negativo	positivo	
sexo	masc	3	5	8
	feme	6	4	10
Total		9	9	18

**Tabla de contingencia**

P= 0.343

Recuento

		vegf		Total
		negativo	positivo	
Breslow	<1	1	0	1
	1-4	4	3	7
	>4	3	5	8
	noclas	1	1	2
Total		9	9	18

P= 0.650 no hay diferencia

**Tabla de contingencia**

Recuento

		c_kit		Total
		negativo	positivo	
Breslow	<1	1	0	1
	1-4	6	1	7
	>4	2	6	8
	noclas	0	2	2
Total		9	9	18

P= 0.036

**Tabla de contingencia c\_kit \* vegf**

Recuento

		vegf		Total
		negativo	positivo	
c_kit	negativo	6	3	9
	positivo	3	6	9
Total		9	9	18

## AGRADECIMIENTO

DR. Héctor Martínez Said

Jefe del Servicio de Clínica de Melanomas

Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Delia Pérez Montiel.

Adscrita al servicio de Patología

Instituto Nacional de Cancerología.

Dra. Verónica Villavicencio

Jefa de Enseñanza

Instituto Nacional de Cancerología.

Dr. Ángel Herrera Gómez

Jefe de la División de Cirugía

Instituto Nacional de Cancerología

## BIBLIOGRAFIA..

- 1.- 1.-Early diagnosis Of. cutáneo melanoma JAMA 2004 DEc 8 292(22)2771.
- 2.-(peptide.targered radionuclide therapy for melanoma critical Reviews in Oncology/hematology 2008)
3. -Desmons RA, Soong SJ, Epidemiology of malignant melanoma. Surg Clin North Am 2003;83:1:29
- 4.- Mtz Said. El primer Consenso Nacional de Expertos en Melanoma. Gaceta Mexicana de Oncologia vol 4 suplemento 2, 2005
- 5.-Parada Ramón Jacobo, Melanoma maligno cutáneo perfil epidemiológico en México. Pp 17-20
- 6.-Reed RJ New Concepts of surgical Pathology of the Skin . Histopathology New York 1976 :27 147
- 7.-Stanley PL. Cutaneous Malignant Melanoma . Sur Clin North Am. Vol 76 Dec 1996: 1223-1225-
- 8.-Clark WHr. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma , Hum Pathol 1984 15: 1147, 1165.
- 9.-Albino AP Fountain JW, oncogenes and tumor suppressor genes in cutaneous malignant melanoma. Photochem and Photobiol 1996:63, 412-418
- 10.-Hinds PW, Weiberg RA tumor supresor genes Curr Opin Genet Dev 1994: 4135-141.
- 11.-Baserga R. Oncogenes and the strategy of growth factors. Cell 1994: 79; 927.930
- 12.-Fountain JW Genetic of melanoma In cáncer Surveys: Advances and Prospects in Clinical, Epidemiological and Laboratory Oncology (Edited by LM Franks 1990 pp 645-671
- 13.-Koprowsky H. Expression of the receptor for epidermal growth factor correlates with increased dosages of chromosome 7 in malignant melanoma, Somat Cell Mol Genet 1985 11: 297-302
- 14.-lahti JM Valentine Alterations in the PITSLRE protein kinase gene complex in chromosome1p36. Nuture Genet 1994: 15: 1-11
- 15.-Rosen CF Fitzpatrick . A comparison of the melanocyte response to narrow band UVA and UVB exposure in vivo . J Invest Dermatol 1987\_88 774-779
- 16.-El-Deiry Ws WAF1 a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 1993: 75:817-825

17. Vidal MJ. Mutation in the WAF1 tumor suppressor gene occur infrequently in sporadic and familial malignant melanoma. *Melanoma Research* 1995; 5; 243-250
18. Laure L, Dougherty N, Porter S. Spontaneous malignant transformation of melanocytes explanted from Wf/WF mice with a Kit Kinase domain mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7816-7820.
19. Potti Anil et al. Immunohistochemical determination of Her2/neu over expression in malignant melanoma reveals no prognostic value, while c-Kit (CD117) over expression exhibits potential therapeutic implication. *Journal of carcinogenesis* 2003 2:8
20. Menashe Bar-eli, *Cáncer metástasis related genes chapter 8. Gene Regulation in Melanoma Metastasis* 2002 PP 145.
21. Heinrick MC. Biology and genetic aspect of GIST : kit activation and cytogenetic alteration. *Human Pathol* 2002: 33:484-95
22. Ashman LK. The biology of Stem Cell Factor and its receptor C-kit. *Int J biochem cell Biol* 199. 37-1037-51
23. Tsuru preferential localization of C-Kit product in tissue mast cell, basal cell of the skin, epithelial cell of breast, small cell lung carcinoma, and seminoma/dysgerminoma in humans: immunohistochemical study of formalin-fixed, paraffin embedded tissues. *Virchow's Arch* 1994:131-141
24. Maeda H, Nishikawa. Requirements of c-Kit for development of intestinal pacemaker system: development 1992 116: 369-74
25. Giehl, U, Nagele Protein expression of melanocyte growth factors (b FGF, SCF) and their receptors (FGFR\_1, c-Kit) in nevi and melanoma. *J. Cutan Pathol* 2007; 34:7-14
26. Leslie A, Fecher, Staci D, Cummings, Toward a molecular classification of melanoma *JCO* Vol 25, Number 12 April 2007.
27. Flip Janku, Jan Novotny Kit receptor is expressed in more than 50% of early stage malignant melanoma ; a retrospective study of 261 patients. *Melanoma research* 2005 vol 15 no 4.
28. Ohashi A, C\_KIT receptor expression in cutaneous malignant melanoma :and benign melanotic naevi. *Melanoma Research* 1996 Feb 6(1) 25-30
29. Batistatou Anna, Immunohistochemical Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and C-KIT in cutaneous melanocytic lesions. *Int J Surg Pathol* 2004. 12\_133

30.-Pamela M, Guerriere-Kovach MD, primary melanoma of the skin and cutaneous melanomatous metastases comparative histologic features and immunophenotypes. Am J. Clin Pathol 2004, 122:70-77

31.- Kit expression in malignant melanoma janku et al melanoma research 2005 15: 251-256

32.- Potti Anil. Et al. Immunohistochemical determination of Her2/neu over expression in malignant melanoma reveals no prognostic value, while c-KIT over expression exhibits potential therapeutic implications Journal of carcinogenesis.2003. 2:8