



ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE KI-67 EN CARCINOMA BASOCELULAR PRIMARIO Y RECURRENTE



**“QUE PARA OBTENER EL GRADO O ESPECIALIDAD
EN DERMATOLOGÍA”**

PRESENTA:

DRA. LIRIO ALEJANDRA LÓPEZ GARCÍA.



DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. MA. ELISA VEGA MEMIJE.
ADSCRITO AL DEPTO DE DERMATOPATOLOGÍA.
HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ.**

ASESOR:

**DR. CARLOS ORTIZ HIDALGO.
JEFE DEL DEPTO DE PATOLOGÍA DEL
CENTRO MÉDICO ABC.**

JUNIO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Hospital General Dr. Manuel Gea González en la sección de Dermopatología bajo la dirección de la Dra. Ma. Elisa Vega Memije y en el Centro Médico ABC en la sección de Patología bajo la dirección del Dr. Carlos Ortiz Hidalgo.

Este trabajo de Tesis con **No. PROT 06-07-2009**, presentado por el alumno López García Lirio Alejandra se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis y la División de Investigación Clínica que se encuentran a cargo de la Dra. Ma. Elisa Vega Memije con fecha del 30 de junio del 2009 para su impresión final.

Tutor principal y División de Investigación Clínica.

Dra. Ma. Elisa Vega Memije.

Autorización.

Dr. Octavio Sierra Martínez.

Director de Enseñanza e Investigación.

Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Dr. Luciano Domínguez Soto.

Jefe de la División de Dermatología.

Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Dra. Ma. Elisa Vega Memije.

Médico adscrito de la División de Dermatología.

Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Análisis comparativo de la expresión de Ki-67 en carcinoma basocelular primario y recurrente.

Colaboradores:

Nombre: Dra. Ma. Elisa Vega Memije.

Firma: _____

INDICE

1. Glosario IV.....	pag 7
2. Antecedentes.....	
2.1. Generalidades.....	
3. Justificación.....	
4. Hipótesis.....	
5. Objetivos.....	
6. Material y Métodos.....	
6.1. Tipo de estudio.....	
6.2. Criterios de selección de la muestra.....	
6.3. Variables.....	
6.4. Tamaño de la muestra.....	
6.5. Procedimiento.....	
7. Resultados.....	
8. Discusión.....	
9. Conclusiones.....	
10. Bibliografía.....	
11. Anexos.....	

1. GLOSARIO

- Carcinoma basocelular (CBC): tipo de cáncer de piel.
- Recurrencia tumoral: Reparación del mismo tumor después de recibir, el tratamiento de elección.
- Inmunohistoquímica: Estudio histopatológico que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, previamente marcado mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo (anticuerpos antiproteínas de la mitosis) para formar un complejo con el antígeno. El complejo antígeno – anticuerpo, permite ser localizado e identificado dentro de las muestras tisulares o citológicas, logrando la identificación de marcadores antigénicos característicos de distintas líneas de diferenciación y funcionalismo celular, con lo que se determina el tipo de célula involucrado en la muestra.
- Ki-67: Proteína nuclear que interviene en el mantenimiento del ciclo celular y se encuentra en todas las fases de la mitosis. La identificación de esta proteína nos permite obtener la cuantificación de la proliferación celular de un tejido.

2. ANTECEDENTES.

El carcinoma basocelular (CBC) es el cáncer de piel más frecuente. Generalmente cursa con buen pronóstico ya que su invasión es local y su diseminación es muy lenta. Sin embargo, un porcentaje de éstos puede tener un comportamiento agresivo presentando invasión local extensa, múltiples recurrencias y en ocasiones metástasis, aun después de tratamientos quirúrgicos amplios.¹ Por lo que tiene importante repercusión en el paciente a nivel funcional, físico y social.²

En estadísticas de poblaciones de raza blanca se informa una incidencia en aumento de 10% por año,³ con un predominio por el sexo masculino en una proporción de 1.3 a 1.9:1. Si bien en la población mexicana se ha observado un mayor predominio por el sexo femenino entre la sexta y octava década de la vida, algunos casos pueden presentarse en niños asociados a genodermatosis como el xeroderma pigmentoso con riesgos de recurrencia hasta del 18%.^{4, 5} Cabe recalcar que la edad de presentación está cambiando y actualmente encontramos mayor incidencia de ésta neoplasia en gente joven, siendo la edad de presentación menor en el sexo femenino y fumadores.^{6,7}

Recurrencia en CBC.

Algunos autores definen recurrencia tumoral a la reaparición del mismo tumor después de recibir el tratamiento de elección. Se ha demostrado que 2/3 de los CBCs recurren dentro de los 3 primeros años de seguimiento y hasta un 18% recurren de 6 a 10 años después del tratamiento por lo que es importante el seguimiento a largo plazo de estos tumores.^{8,9}

Dentro de los factores de riesgo para presentar recurrencia en un CBC se encuentran una larga evolución, tamaño, sobretodo tumores mayores a 2 cm, lesiones previamente tratadas, antecedente de radiación previa y localización en áreas periorificiales de la cara, región temporal, preauricular y auricular y piel cabelluda.⁹⁻¹³ Existen múltiples teorías que apoyan la recurrencia de esta neoplasia dentro de las cuales, se ha propuesto que: a) los planos de fusión embriológica; así como la proximidad al periostio y al pericondrio de la dermis contribuyen en parte a éste comportamiento y b) zonas como la región nasal que además poseen una mayor densidad de glándulas sebáceas podrían ofrecer sitios de escondite para el tumor y favorecer su recurrencia.¹⁰

Así mismo, es importante si la variedad histológica es mixta o agresiva como la morfeiforme, infiltrativa, metatípica, con extensión perianexial, perivascular o perineural o si tiene un componente multicéntrico.^{16,17} Además, debe tomarse en cuenta el espesor tumoral, presencia de ulceración, reacción directa con estroma fibroblástico/miofibroblástico reactivo o estroma amiloide. Se calcula que más del 40% de CBCs recurrentes tenían características histológicas mixtas.

En relación con las tasas de recurrencia del CBC, las estadísticas difieren mucho entre los autores.

²⁰ Los índices de recurrencia a cinco años para el tratamiento de los CBC oscila entre el 1% para la cirugía micrográfica de Mohs a una media de 8.7% para el curetaje o la electrocoagulación, 10%

para la excisión quirúrgica, 8.7% para la radioterapia y la criocirugía,⁹ 14% para la terapia fotodinámica¹⁷ y 3% con el uso interferón alfa 2b.²² El porcentaje de nueva recurrencia de acuerdo al tratamiento establecido, oscila entre el 5.6% a 7.8% para la cirugía de Moh's, 15% al 20% en tratamientos convencionales y del 5.7% hasta el 40% con curetaje o electrocoagulación sobretodo en los sitios de alta recurrencia cuando no se lleva adecuadamente el procedimiento.^{9, 16,23}

Aunque la extirpación quirúrgica es el tratamiento estándar, éste tiene también algunas desventajas. Procedimientos quirúrgicos utilizados para tratar CBCs superficiales y nodulares tienen un riesgo de recurrencia entre 10% y 67% a 5 años si no se realiza la extirpación completa o se dan los márgenes adecuados.²⁵

El comportamiento biológico y el tratamiento adecuado para los CBCs recurrentes son controvertidos; en algunos estudios se sugiere que el tumor se vuelve más agresivo con cada recurrencia mientras que otros estudios indican que la mayoría son agresivos desde el principio.^{11,25} otros consideran que solo debe reintervenirse si se localizan en sitios de mal pronóstico ya que el riesgo de recurrencia es baja.²⁸⁻²

Algunos estudios han demostrado que lesiones resecaadas de forma incompleta, no recurren dentro de los siguientes 5-10 años a diferencia de otras publicaciones realizadas en donde se concluye que el pico de recurrencia es dentro de los siguientes 2 años;²⁷ aquellos autores que sugieren la conducta de "esperar y ver" deben valorar todos los factores pronósticos ya mencionados¹⁸ además de tomar en cuenta que debido a las características de lento crecimiento de los CBC que duplican su tamaño en 6 meses y que son relativamente asintomáticos, es difícil que los pacientes puedan identificar signos tempranos de recurrencia por lo que no deben perderlos de vista.

Los pacientes con el antecedente de un CBC aumentan el riesgo de desarrollar otros CBCs durante su seguimiento, siendo éste de un 25% a un 70% según la serie revisada en los 3 primeros años.²⁹⁻³⁶ A diferencia del riesgo de desarrollar un carcinoma epidermoide que es del 1 al 19% con un promedio del 6%.³²

Según Levine y Bailin la región perinasal es el factor mas importante en la identificación de CBC con alto riesgo de recurrencia las cuales son más difíciles de tratar y frecuentemente conllevan a malos resultados cosméticos y funcionales.^{14,15}

Bouilinguez y colaboradores reportaron que el 24% de las lesiones estudiadas fueron más agresivas durante la recurrencia, sobretodo aquel que se localizaban en zonas perinasaes o perioculares.¹⁸

Kumar et al reportan un porcentaje de recurrencia del 1% en 3 años cuando la resección se realiza de manera adecuada, porcentaje que se eleva cuando se realiza incompletamente dentro de los primeros 3-6 meses después del evento quirúrgico. El porcentaje de resección incompleta varía desde 0.7% hasta 15.4% siendo más frecuente en los tumores de localización central en la cara.⁸

Apoptosis:

La apoptosis es uno de los principales tipos de muerte celular programada (PCD). Como tal es un conjunto de reacciones bioquímicas que ocurre en las células de un organismo pluricelular, encaminadas a producir la muerte de la célula de manera controlada, a diferencia de la necrosis.
40,41

La apoptosis puede tener dos motivos fundamentales, como parte del desarrollo de estructuras corporales o bien para eliminar células que supongan una amenaza para la integridad del organismo. Se caracteriza por hipereosinofilia y retracción citoplasmática con fragmentación nuclear (cariorrhexis), desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. Estas señales pueden originarse en la célula misma o de la interacción con otras células.

La apoptosis es un fenómeno biológico fundamental, permanente, dinámico e interactivo. Existen mecanismos pro- o anti-apoptóticos, regulados genéticamente, que actúan de forma activa (consumen energía) y equilibrada.

Como función necesaria para evitar la sobreproducción celular se sospechaba de su existencia, pero es un proceso ordenado y "silencioso" que no produce reacción tisular y por ello es difícil de captar. La apoptosis puede estar frenada, en equilibrio o estimulada.

Mecanismo de apoptosis.

Dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular. En el ciclo celular hay cuatro fases: mitosis (M), fase de control celular G1, síntesis de ADN (S) y fase de control G2.

La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G1 para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la replicación del ADN y en la fase G2 para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis.

Los motores del ciclo celular son complejos proteicos formados por subunidades llamadas ciclinas y kinasas dependientes de ciclinas (CDK), sintetizados por genes específicos. La síntesis de estos complejos es constante porque son altamente inestables, de ahí que el nivel de ellos varíe de acuerdo al momento evolutivo de la fase a que están asignados. Así en el avance de la fase G1 a la S actúa la ciclina D asociada a las kinasas ciclinodependientes 2, 4 y 6 (cdk 2 4 6).

En la fase G1 se han podido determinar dos puntos importantes: G0 (en la mitad de la fase) donde el ciclo puede detenerse y la célula bloquea su crecimiento pero se mantiene metabólicamente activa y un punto de restricción en que, se puede detener el ciclo para corregir defectos celulares (en el ADN), lo que si no consigue induce el mecanismo de muerte celular.^{40,41,42} En la fase G2 también existen elementos de detección de inmadurez celular que inducen la apoptosis cuando la célula no está capacitada para entrar en mitosis. De esta manera, durante el ciclo celular se determina cuándo la célula debe entrar en el proceso de autodestrucción o continuar el ciclo y dividirse. Se ejerce así un balance entre mitosis y apoptosis, regulando la población celular de cada tejido.

En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, de los cuales uno de los más importantes y mejor estudiados es el complejo de cisteinil-aspartato proteasas (caspasas). Se han descrito 11 caspasas en células humanas que provocan una degradación proteica bien definida hasta llegar a la formación de cuerpos apoptóticos. Algunas caspasas son "iniciadoras" y otras "efectoras" del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN.

La activación de las caspasas, que existen en calidad de pro-caspasas inactivas, se produce por diversas vías en que participan varios complejos moleculares.

Vía extrínseca.

La vía extrínseca o de "receptores de muerte" establece conexiones con el espacio extracelular, recibiendo señales pro-apoptóticas desde el exterior y de las células vecinas.

Dos familias de receptores se han identificado con estas características: la proteína Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF).

Vía intrínseca o mitocondrial.

Otra vía de inducción de apoptosis es la vía llamada mitocondrial. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembrana; entre ellas, el citocromo c.

Funciones de la apoptosis.

a) Eliminación de tejidos dañados o infectados.

La apoptosis puede ocurrir, por ejemplo, cuando una célula se halla dañada y no tiene posibilidades de ser reparada, o cuando ha sido infectada por un virus. También condiciones de

stress como la falta de alimentos, así como el daño del ADN provocado por tóxicos o radiación, pueden inducir a la célula a comenzar un proceso apoptótico.

b) Desarrollo.

La muerte celular programada es parte integral del desarrollo de los tejidos y no provoca la respuesta inflamatoria característica de la necrosis.

c) Homeostasis.

En un organismo, la cantidad de células que componen un órgano o tejido debe permanecer constante, dentro de ciertos límites. Las células de la piel, por ejemplo, son constantemente renovadas por sus respectivas células progenitoras. Por lo tanto, esta proliferación de nuevas células tiene que ser compensada por la muerte de otras células (homeostasis u homeocinesis).

La homeostasis se logra cuando la relación entre la mitosis y la muerte celular se encuentra en equilibrio. Si este equilibrio se rompe, pueden ocurrir dos cosas:

- Las células se dividen más rápido de lo que mueren, desarrollando un tumor.
- Las células se dividen más lentamente de lo que mueren, produciéndose un grave trastorno de pérdida celular.

Ambos estados pueden ser fatales o potencialmente dañinos.

Patologías vinculadas con la apoptosis.

1. Enfermedades asociadas a inhibición de apoptosis:

- a) Cáncer: linfoma no Hodgkin folicular (Bcl-2 +), carcinoma (p53 +), tumores hormono-dependientes ^{43, 44, 45}
- b) Enfermedades autoinmunitarias: lupus eritematoso sistémico, glomerulonefritis autoinmunitaria.
- c) Infecciones virales: herpes virus, poxvirus, adenovirus.

1. Enfermedades asociadas a aumento de apoptosis:

- a) Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (SIDA).
- b) Enfermedades neurodegenerativas: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, degeneración cerebelosa.
- c) Síndromes mielodisplásicos (MDS): anemia aplásica.

- d) Daño isquémico: infarto al miocardio, apoplejía, daño por reperfusión, daño hepático por alcoholismo.

Inmunohistoquímica:

Entre los métodos para obtener la cuantificación de la proliferación celular de un tejido, está el análisis inmunohistoquímico, que utiliza para dicho fin, anticuerpos antiproteínas de la mitosis (Ki-67, Bcl-2, entre otras).

La inmunohistoquímica se realiza con dos fines: diagnóstico y pronóstico.

Ki-67.

Ki-67 es una proteína nuclear que interviene en el mantenimiento del ciclo celular y se encuentra presente en todas las fases de la mitosis.

El anticuerpo monoclonal Ki-67 detecta al antígeno nuclear (ki-67) que se expresa exclusivamente en las células que entran al ciclo celular (fases G1, S, G2 y mitosis) pero no en G0, por lo tanto, el anticuerpo monoclonal Ki-67 permite la detección inmunohistoquímica de células que completan un ciclo y su expresión proporciona una medida directa de la fracción de crecimiento del tejido; por lo que, el antígeno Ki-67 es considerado como un marcador de la proliferación celular y se ha descrito una elevada correlación entre el índice Ki-67 y el grado de malignidad de las neoplasias.

2.1. GENERALIDADES.

El CBC recurrente así como el metastásico son relativamente raros y es considerado por algunos autores como una complicación del tratamiento de rutina y una falla en el seguimiento de los pacientes. Se han realizado múltiples estudios con el objeto de distinguir entre un CBC con comportamiento agresivo vs comportamiento no agresivo, sin embargo hasta la fecha, no existen pautas clínicas, histopatológicas o inmunohistoquímicas consistentes, para poder realizar esta diferenciación. En el 2006 Ionescu analizó 4 casos de CBCs metastásicos y 14 casos de CBCs no metastásicos, a los cuales les realizó inmunotinciones (Ki-67, p 53 y bcl-2) con el propósito de encontrar patrones morfológicos o inmunohistoquímicos que permitieran la identificación entre CBCs con comportamiento agresivo vs no agresivos. En los CBCs metastásicos la tinción para Ki-67 presentó un porcentaje de expresión más alto en los sitios de metástasis que en el sitio primario (63% y 51%, respectivamente), p53 se expresó en 3 de 4 sitios primarios y en 2 de 4 sitios metastásicos y Bcl-2 fue positivo en ambos sitios tanto primario como metastásico en 3 de 4 casos. En los 14 casos de CBC con comportamiento no agresivo, la tinción para Ki-67 fue del 38%, p53 fue positivo en 11 casos y Bcl-2 en 13 casos. Concluyéndose que, a pesar del tamaño de la muestra, los marcadores de inmunohistoquímica para Ki-67, p53 y Bcl-2 no distinguen entre CBC metastásico o agresivo vs no metastásico o no agresivo.⁴⁶

Se ha discutido en diversos estudios, el papel que juega la topografía del tumor, como factor de riesgo para las recurrencias del mismo, esto se debe al impacto de la radiación ultravioleta en la etiopatogenia del cáncer de piel, por lo que en el 2006, Conscience I, realizó un estudio en donde observó una sobreexpresión de P16, una proteína supresora, reguladora del ciclo celular tumoral, en cáncer de piel no melanoma (CEC y CBC) en áreas fotoexpuestas. La sobreexpresión de P16 fue asociada con un alto porcentaje de expresión del antígeno ki67 en las células tumorales (23/57) en cáncer de piel no melanoma (40%). Ambos marcadores fueron negativos en 7/57 casos (12%). Se presentó una sobreexpresión de P16 en 68% de los tumores localizados en áreas fotoexpuestas vs 23% de los localizados en áreas no fotoexpuestas ($p=0.02$). Este estudio demostró que la expresión de P16 y Ki67 está asociada al cáncer de piel no melanoma. No se observó diferencia en cuanto al tipo histológico, lo que sugiere que la expresión de P16 y Ki67 no correlaciona con el grado de proliferación y malignidad. Dentro del cáncer de piel no melanoma, la sobreexpresión de P16 se encontró asociada de forma significativa con la localización del tumor, áreas fotoexpuestas, lo que sugiere una probable inducción de la expresión de P16 por la radiación UV.⁴⁷

Janisson-Dargau, en el 2008 publicó un artículo "Aneuploidy, but not Ki-67 or EGFR expression, is associated with recurrences in basal cell carcinoma" en donde señala que los factores de riesgo clásicos (clínicos e histológicos) para predecir recurrencia tumoral son todavía limitados.⁴⁸ Se

compararon tumores primarios, en 20 pacientes que presentaron recurrencia local contra 20 controles pareados sin recurrencia. En dicho estudio, no se presentó diferencia en cuanto al porcentaje de expresión del EGFR y del antígeno Ki-67 entre ambos grupos vs lo observado al comparar los grupos para determinar el porcentaje de aneuploidia, concluyéndose que, la aneuploidia es un factor de riesgo para recurrencias. En el mismo año Son KD realizó un estudio en 94 casos de CEC y 108 casos de CBC, para, determinar la correlación entre la expresión de ki-67, p53, EGFR, CD44v6, MMP-1 y MMP-3 y el grado de invasión y de diferenciación histológica. En este estudio se observó que, la expresión de CD44v6 y MMP-1 en células tumorales, son marcadores significativos asociados al grado de invasión tumoral en cáncer de piel no melanoma, por lo que sugieren en el mismo que medir la expresión de estos marcadores puede ser de utilidad para determinar el grado de invasión tumoral. Y en cuanto a la expresión de ki-67 solo se observó, correlación con el grado de diferenciación celular para CEC.⁴⁹ Y a mediados del mismo año, Segerbäck realizó un estudio en donde midieron dos dímeros de pirimidina ciclobutano (TT=C y TT=T) en el DNA de pacientes con CBC y en controles, observándose que los pacientes con CBC poseen una capacidad disminuida para reparar lesiones en el DNA inducidas por la radiación UV.⁵⁰

3. JUSTIFICACION.

El cáncer de piel es considerado dentro de los tres primeros lugares en frecuencia a nivel mundial. En muchos países este tipo de cáncer es un problema de salud pública, sobre todo el carcinoma basocelular, que es el más común (70 a 80%). Este, por lo general cursa con un excelente pronóstico, sin embargo, un porcentaje de éstos puede tener un comportamiento agresivo presentando invasión local extensa, múltiples recurrencias y en ocasiones metástasis, aun después de tratamientos quirúrgicos amplios las recurrencias son frecuentes. El valor de los factores pronósticos clínicos e histológicos clásicos para predecir las recurrencias son todavía limitados, por lo que consideramos necesario el investigar nuevas técnicas como la inmunohistoquímica, con especial énfasis en la determinación de ki67, marcador de proliferación celular y que, en algunos estudio se ha relacionado con un mayor grado de malignidad de las neoplasias.

Sabemos de antemano que la mortalidad que causa este tumor es baja comparada con su alta incidencia, sin embargo, la morbilidad que ocasiona este padecimiento implica que el paciente sufra múltiples operaciones y tratamientos, lo que le provoca importantes defectos estéticos y funcionales y por ende tiene un gran impacto en la calidad de vida del mismo.

4. HIPOTESIS.

El carcinoma basocelular primario por lo general presenta datos histológicos de menor grado de malignidad en comparación con los CBCs recurrentes, y el antígeno Ki 67 es un marcador de proliferación celular, entonces, las recurrencias de los CBCs en comparación con los primarios, van a presentar un mayor índice de expresión de Ki 67.

5. OBJETIVO GENERAL.

Comparar el índice de expresión del antígeno Ki-67 en carcinomas basocelulares primarios y sus recurrencias.

6. MATERIAL Y METODOS.

6.1. Tipo de Estudio.

Observacional, comparativo, prolectivo, transversal y ciego.

6.3 Criterios de Selección de la Muestra.

Criterios de Inclusión.

- Pacientes mayores de 18 años de edad.
- Diagnóstico histológico de CBC en cualquiera de sus formas histológicas y que presentaron recidiva, del cual se tenga material histológico que lo confirme.
- Expediente completo dentro del servicio de dermatopatología (ver hoja de datos del servicio).
- Biopsia fijadas previamente en formalina bufferada al 10% y que fueron o serán procesadas con alcoholes ascendentes para su deshidratación, e incluidas en parafina, sin exceder los 60 C para no alterara los antígenos del tejido.
- Bloque o tejido suficiente para la realización de tinciones.
- Fotos clínicas.

Criterios de Exclusión.

- Pacientes con antecedentes de síndromes asociados a cáncer de piel no melanoma.

6.4. Variables.

Variable(s) Independiente(s).

- Sexo: Condición biológica que distingue a las personas entre mujer y hombre.
- Edad: Número de años cumplidos desde la fecha de nacimiento hasta la fecha de la entrevista (intervalo: años).
- Tipo histológico de Carcinoma basocelular: Tipo de cáncer de piel no melanoma.
- Topografía: Localización de la lesión.
- Ocupación: Trabajo, empleo, oficio o cuidado que impide emplear el tiempo en otra cosa.
- Tiempo de evolución. Magnitud física que permite ordenar la secuencia de los sucesos, estableciendo un pasado, un presente y un futuro (intervalo: meses).

- Recurre: Que vuelve a ocurrir o a aparecer, especialmente después de un intervalo (intervalo: meses).
- Seguimiento: Observar el curso de un evento (intervalo: meses).

Variable(s) Dependientes.

- Índice de expresión del antígeno de Ki-67: marcador de ciclo celular y se expresa en porcentajes.

6.5. Tamaño de la Muestra.

Se incluyeron todos los pacientes con diagnóstico histológico de carcinoma basocelular y con recurrencia del mismo, documentada en el archivo del Departamento de Dermatopatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González en un periodo comprendido entre 1994 al 2008.

6.6. Descripción Operativa del Estudio.

Se realizó la revisión de los casos con el diagnóstico clínico e histopatológico de carcinoma basocelular, que se encontraron registrados dentro de la base de datos del servicio de Dermatopatología del Hospital General Dr. Manuel Gea González, a partir de 1994 hasta el 2008. Se realizó una base de datos que contenía a las siguientes variables: sexo, edad, número(s) de biopsia(s), tiempo de evolución, topografía, morfología, características histológicas, tiempo entre la excisión primaria y la recurrencia, tiempo de seguimiento de los pacientes, tiempo promedio de aparición de otros CBCs. Se vaciaron los datos a una hoja de Excel y se obtuvo, únicamente la información correspondiente a aquellos pacientes que presentaron recurrencia del CBC. Se formaron dos grupos de estudio a) los bloques de tejido correspondientes a tumor primario y b) los bloques de tejido correspondientes a la recurrencias, esta información fue únicamente, conocida por el dermatólogo clínico.

Para la selección del bloque, que fue enviado a inmunotinción al Centro Médico ABC, se revisaron las laminillas correspondientes a cada caso (dermatopatólogo) y se obtuvo el bloque que cumpliera con los siguientes requisitos:

- a) se hayan encontrado o se encuentren fijadas en formalina bufferada al 10% y que fueron o serán procesadas con alcoholes ascendentes para su deshidratación, e incluidas en parafina, sin exceder los 60 C para no alterara los antígenos del tejido.
- b) bloque o tejido suficiente para la realización de tinciones.

Para las tinciones y marcadores de inmunohistoquímica se empleó, la técnica de Avidina-Biotina con anticuerpos monoclonales primarios para el antígeno de proliferación celular Ki- 67 (clona

PCNA) con sus respectivos controles. Se observó la expresión del marcador de inmunohistoquímica, por parte del patólogo (Centro Médico ABC), que desconocen si se trata de tumor primario o recurrencia del mismo. Para estimar el índice de proliferación celular, se realizó el conteo por computadora de las células marcadas (núcleo color marrón) de cuatro campos elegidos al azar (40x) y se obtuvo un promedio de los mismos que correspondió al índice final.

Una vez obtenidos los datos del índice de expresión del Ki 67, se tomarán fotos para documentar los hallazgos y, el dermatólogo clínico se encargará del vaciamiento de los datos obtenidos en una hoja de cálculo de Excel (paquetería de Office Vista) y se procederá a la codificación de los datos para que posteriormente puedan ser leídos por un programa estadístico para el cálculo correspondiente.

7. RESULTADOS.

Se estudiaron en total 14 bloques de CBCs, de los cuales 7/14 correspondieron a casos de CB's primarios y el resto a las recurrencias de los mismos (7/14). Se observó en el estudio: una relación mujer:hombre de 4:3 respectivamente y con unos rangos de edad de 59 a 88 años (media de 73 años), y con respecto al tiempo de evolución se apreciaron rangos que iban de 6 a 120 meses (media de 38.5 meses) y de 12 a 36 meses (media de 15 meses) tanto para los casos de CBC's primarios y sus recurrencias, respectivamente. Fig 1. Panorámica de corte histológico CBC. Tinción H&E (10x).

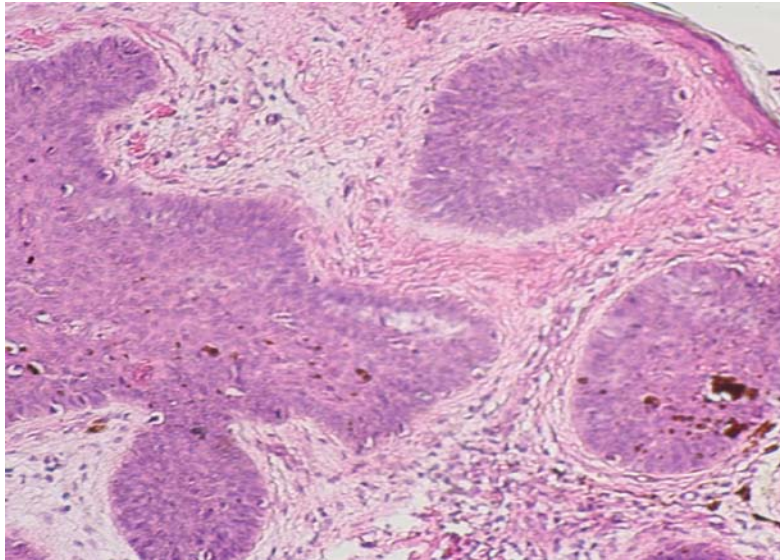


Fig 1. Corte histológico en donde se observa neoformación constituida por células epiteliales de aspecto basaloide, con empalizada periférica dispuestas en islotes. Estroma fibromixoiide con retracción p eriferica. (Caso 1 CBC primario)

La mayoría de los casos se presentaron en cara (6/7) con excepción del caso número 1 que se localizó en tronco. Todos los casos fueron tratados quirúrgicamente en conjunto con fotoprotección mecánica (7/7) y/o tópica (6/7), así como retinoides tópicos (5/7). Tabla 1. Características demográficas.

Tabla 1. Características Demográficas de los casos estudiados. CBCs primarios y sus recurrencias

Caso	Sexo	Edad (años)	Tiempo de Evolución Primario (meses)	Tiempo de Evolución Recurrencia (meses)	Topografía
1	H	79	24	12	Tronco posterior línea media
2	H	75	48	12	Frontal derecho
3	M	74	48	36	Sien izquierda
4	M	68	12	12	Dorso nasal derecho
5	H	59	120	12	Infraorbitario derecho
6	M	88	6	12	Ala nasal izquierda
7	M	72	12	6	Preauricular derecho

H: hombre / M: mujer

Al realizar la comparación entre el tipo histológico y el porcentaje de expresión del ki-67 (Fig 2), se observó que en 4/7 casos estudiados se presentó una menor expresión del antígeno nuclear Ki-67 en las primarios vs las recurrencias, y que, en estos últimos el grado de malignidad era mayor según el tipo histológico que presentaron. Tabla 2. Características histológicas e inmunohistoquímicas de CBC's primarios vs recurrencias.

Tabla 2. Características histológicas e inmunohistoquímicas de CBC's primarios vs recurrencias

Caso	Patrón Histológico Primario	ki-67 (%)		Patrón Histológico Recurrencia	ki-67 (%)
1	CBC nodular y micronodular	11.97		CBC superficial	11.54
2	CBC noduloquístico	23.40		CBC nodular	15.28
3	CBC superficial pigmentado	17.28		CBC nodular mal diferenciado	23.44
4	CBC nodular mal diferenciado	34.15		CBC adenoideo-quístico	27.53
5	CBC nodular ulcerado	31.06		CBC infiltrante	51.62
6	CBC nodular	16.77		CBC adenoideo-quístico	25.34
7	CBC superficial, pigmentado	22.6		CBC nodular	25.7

CBC= Carcinoma basocelular

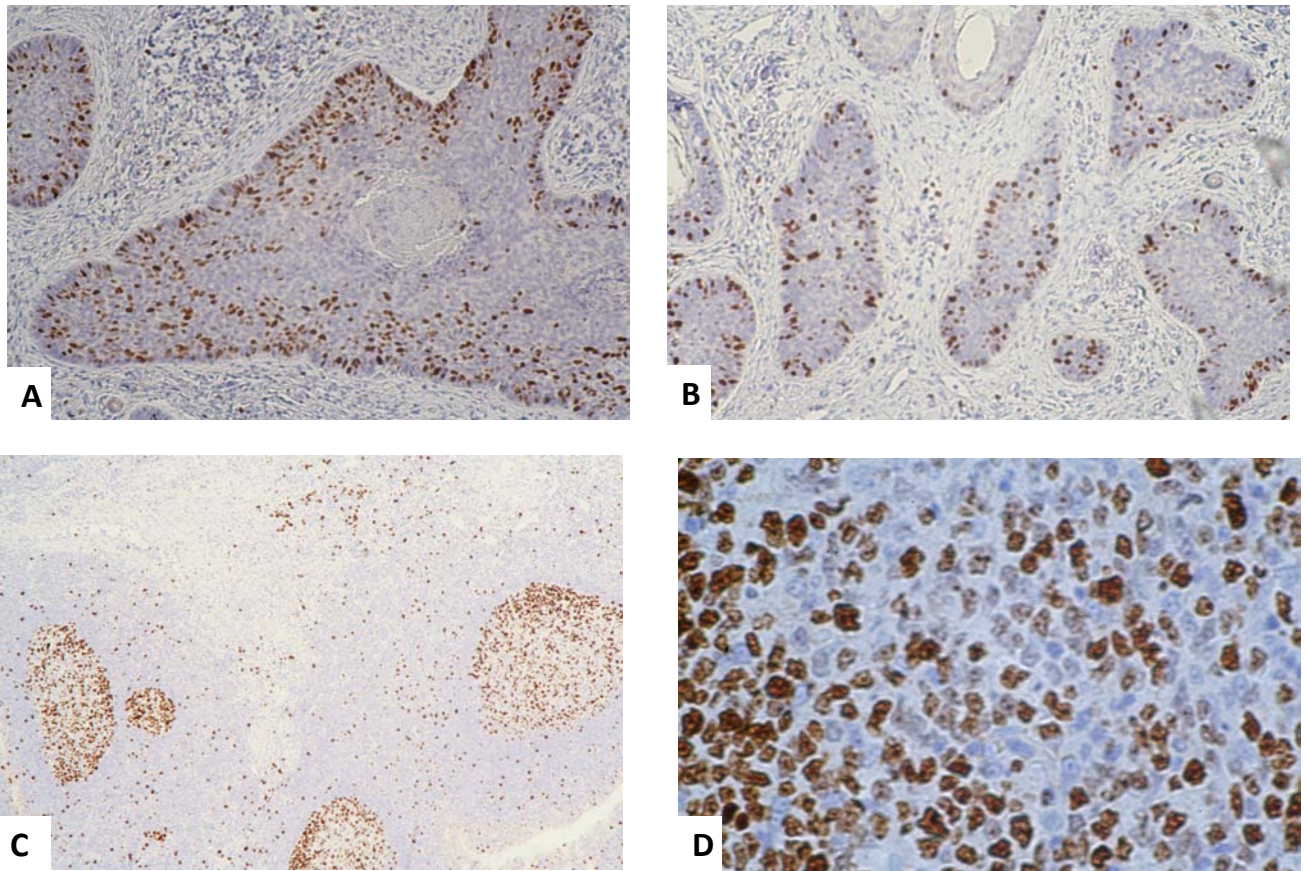


Fig 2. Expresión de Ki-67 por inmunohistoquímica. A y B Se observa expresión periférica de Ki-67 (caso 1 CBC primario). C y D tinción testigo, con expresión intensa y homogénea de ki-67.

La edad de los bloques vario entre 1 a 14 años, todos de forma rutinaria fueron fijados en formalina e incluidos en parafina. La calidad de la tinción no varía según la edad de los bloques. (Fig. 3 y 4)

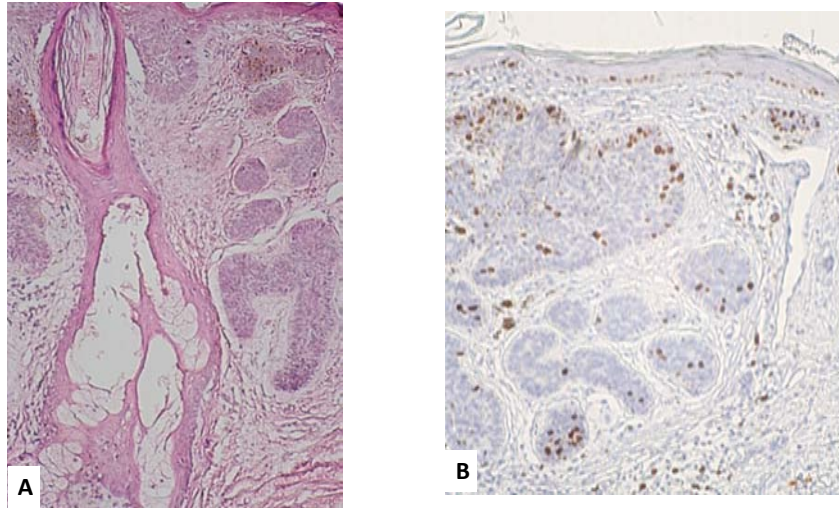


Fig 3. Caso 1 recurrencia tumoral. (A) tinción de H&E 40x. (B) tinción por inmnohistoquímica con expresión de predominio periférico del antígeno nuclear ki-67

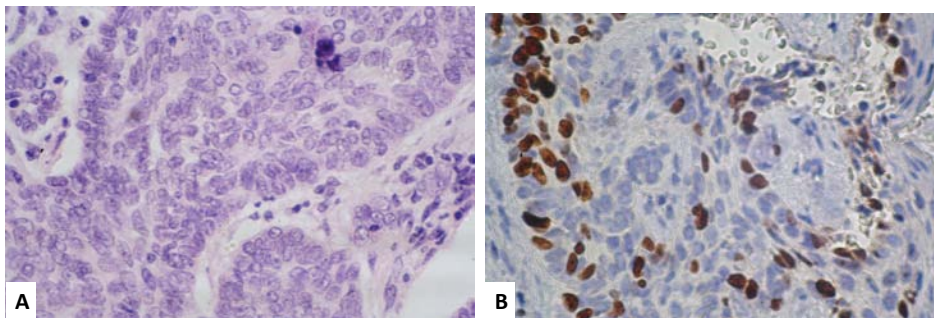


Fig 4. Caso 5 CBC primario. (A) tinción de H&E 50x. (B) tinción por inmnohistoquímica con expresión de predominio periférico de ki-67

Se observó una tinción uniforme de los núcleos celulares ($n=14$), con un patrón periférico en 7/4 y homogéneo en 4/7. La muestra que presento, en un promedio de 4 campos leídos, el mayor número de núcleos teñidos (660 núcleos) correspondió al CBC primario del caso 6. (Fig. 5 y 6)

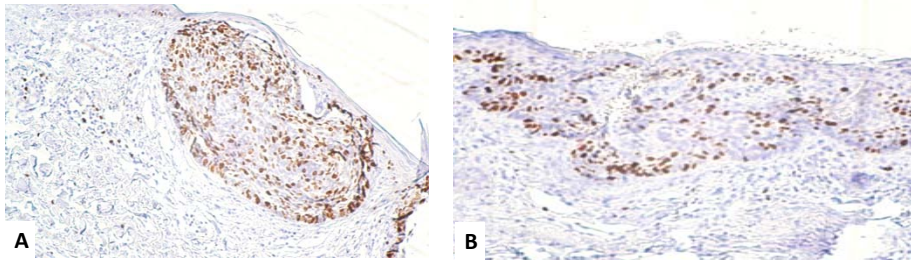


Fig 5. Tinción por inmunohistoquímica para ki-67. (A) Corresponde a la recurrencia del caso 2 con expresión homogénea del antígeno nuclear. (B) Corresponde al primario del caso 5 con expresión periférico de ki-67

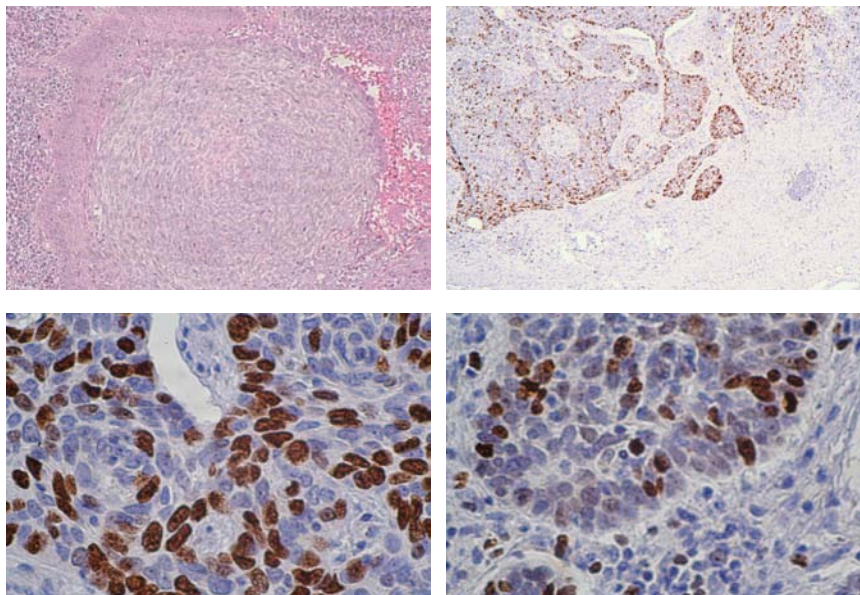


Fig 6. Tinción con H&E y por inmunohistoquímica para ki-67. Caso 6 CBC primario

8. DISCUSION.

Una de las limitantes mas importantes en este estudio fue el numero de casos analizados , ya que no nos permitió realizar una análisis estadístico para poder determinar el papel del la expresión del antígeno nuclear ki-67 como factor pronóstico para las recurrencias de los carcinomas basocelulares, sin embargo a pesar de tener un escaso numero de pacientes si se observó una tendencia en que el porcentaje promedio de expresión fue mayor en CBC recurrentes que en los primarios, lo cual correlaciona con lo descrito en estudios previos.

Este trabajo nos abre las puertas a nuevas rutas de estudio del cáncer de piel no melanoma y nos lleva a cuestionarnos acerca de algunas observaciones realizadas durante el mismo:

A diferencia de lo observado en estudios previos, en donde al compararse el porcentaje de inmunotinción positiva entre diversos canceres de piel no melanoma para ki 67 el porcentaje de positividad siempre es mayor en los carcinomas espinocelular sobre los CBCs. En nuestra serie todos los CBC incluidos, fueron positivos para la inmunotinción, pero no necesariamente fue mayor en las recidivas como lo esperábamos y como se muestra en la tabla 2; en donde el caso 1 presentó un porcentaje de expresión del antígeno ki-67 del 11.97% para el tumor primarios vs 11.54% para la recurrencia, en los casos 2 y 4, tanto para primarios vs sus recurrencias, se observó la siguiente tendencia 23.40% vs 15.28 y 34.15% vs 27.53% respectivamente.

Otro punto importante fue el análisis de los diferentes patrones y/o subtipos histológicos y la expresión del antígeno ki-67 en los mismos. Solo 4 de los 7 casos estudiados presentaron un comportamiento mas agresivo al comparar el caso primario con su recurrencia: caso 3 (superficial pigmentado vs nodular mal diferenciado), caso 5 (nodular ulcerado vs infiltrante), caso 6 (nodular vs adenoideo-quístico) y caso 7 (superficial pigmentado vs nodular), estos hallazgos concuerdan con los reportado en la literatura en relación al comportamiento histológico y la expresión del antígeno ki-67 que fue mayor en la recurrencia debido al comportamiento mas agresivo del tumor. (Tabla 2).

En los casos 1, 2 y 4 en donde no se apreció este mismo comportamiento, al compararse los subtipos histológicos y la expresión del antígeno ki-67 tanto para el tumor primario como para su recurrencia esto, se puede deber, a que los casos analizados no sean realmente recurrencias sino tumores independientes. Hay que recordar que durante la reconstrucción quirúrgica del área tratada, sobre todo en los casos del cierre primario y los colgajos se emplea la misma piel fotodañada del paciente, la cual podría presentar cambios histológicos que pudieran propiciar la formación de un cáncer de piel, previos a la reconstrucción.

Todos los casos estudiados recibieron tratamiento con fotoprotección mecánica (caso 1 CBC en tórax) y/o fotoprotección con bloqueadores. Algunos recibieron tratamiento con retinoides tópicos con excepción de los casos 1 y 6. Kopan y cols en 1998, realizaron un estudio en donde demostraron que los queratinocitos que crecen in vitro con bajas concentraciones de retinoides muestran un incremento en el porcentaje de proliferación de los mismos, mientras que, con concentraciones elevadas de retinoides, se inhibe la proliferación de los queratinocitos. Por lo tanto los retinoides presentan un efecto supresor en la diferenciación terminal de los queratinocitos. Estas observaciones y las documentadas en estudios previos por Swisshelm cols en 1994; Hu y cols en 1991 y Hu & Gudas en 1990, en relación a las alteraciones de los receptores del ácido retinoico (RAR) nos podrían llevar a la suposición, de que la falta de tratamiento con retinoides tópicos o una alteración a nivel de los RAR explicarían el alto porcentaje de expresión del antígeno nuclear ki 67 en los casos primarios 2 y 4 vs sus recurrencias y el por que, en el caso 6 (no recibió tratamiento con retinoides tópicos) se observo el mayor porcentaje de positividad del antígeno sin obtener correlación con el grado de malignidad de la neoplasia.

9. CONCLUSIONES

En este estudio se logro observar una clara tendencia en cuanto al porcentaje de expresión del antígeno nuclear ki 67 a favor de las recidivas tumorales, sin embargo no se logro correlacionar, esta mayor expresión con un mayor grado de malignidad tumoral en todo los casos estudiados.

Es conveniente el seguimiento de los pacientes que presentan un carcinoma basocelular, y valorar específicamente el uso de protección solar, ya sea mecánica y/o química, y la aplicación del ácido retinoico para evaluar su acción en la expresión del antígeno ki-67.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Leibovitch I, Huilgol S, Selva D, Richards S, Paver R, Basal cell carcinoma treated with Mohs surgery in Australia I. Experience over 10 years. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:458-63.
2. Chen T, Bertenthal DI, Sahay A, Predictors of Skin-Related Quality of Life After Treatment of Cutaneous Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma, *Arch Dermatol*. 2007;143(11):1386-1392
3. Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *British Journal of Dermatology* 2007; 157:47-51.
4. Griffin J, Cohen P, Tschien J, Mullans E, Schulze K, Martinelli P, Basal cell carcinoma in childhood: Case report and literature review *J Am Acad Dermatol* 2007;57:S97-102
5. Peniche J. Carcinoma Basocelular. En Programa de Actualización Continua para el Dermatólogo, Galderma México; 2002. p. 32-39
6. Christenson L, Borrowman T, Vachon C, Incidence of Basal Cell and Squamous Cell Carcinomas in a Population Younger Than 40 Years, *JAMA*. 2005;294:681-690
7. Karagas M, Occurrence of cutaneous basal cell and squamous cell malignancies among those with a prior history of skin cancer. The skin cancer prevention study group *J Invest Dermatol*, 1994; 102: 10S-13s
8. Leibovitch I, Huilgol S, Selva D, Richards S, Paver R, Basal cell carcinoma treated with Mohs surgery in Australia II. Outcome at 5-year follow-up. *J Am Acad Dermatol* 2005;53:452-7.
9. Randle H, Basal Cell Carcinoma. Identification and Treatment of the High-Risk Patient. *Dermatol Surg* 1996;22: 255-61
10. García L, Nagore E, Llombart B, et als, Basal cell carcinoma of the nasolabial fold: an apparently "benign" tumour that often needs complex surgery. *J Eur Acad Dermatol Venereal* 2006; 20: 926-930
11. Su S, Giorlando F, Ek E, Incomplete Excision of Basal Cell Carcinoma: A Prospective Trial *Plastic & Reconstructive Surgery* 2007; 120(5):1240-1248.
12. Dubin N, Kopf A, Multivariate risk score for recurrence of cutaneous basal cell carcinomas. *Arch Dermatol*. 1983 May; 119 (5):373-7.
13. Nemet A, Deckel Y, Martin P, Management of Periocular Basal and Squamous Cell Carcinoma: A Series of 485 Cases. *Am J Ophthalmol* 2006;142:293-297
14. Metze K, Bedin V, Adam R, Macedo de Souza E, Cintra, Recurrent basal cell carcinomas may represent new primary neoplasias: differences between aggressive and nonaggressive histologic subtypes. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2007;60(4):451-3

15. Kaur P, Mulvaney M, Carlson J, *Basal cell carcinoma progression correlates with host immune response and stromal alterations: a histologic analysis. Am J Dermatopathol. 2006;28(4):293-307.*
16. Ducasse A, Pluot M, Gotzamanis A, Brugniart C, Leccia L, Rossi P, *Facteurs de récidence des carcinomes baso-cellulaires de la paupière et des canthus, J Fr. Ophtalmol, 2002; 25, 5, 512-516*
17. Leibovitch I, Huilgol S, Selva D, Richards S, Paver R, *Basal cell carcinoma treated with Mohs surgery in Australia III. Perineural invasion. J Am Acad Dermatol 2005; 53:458-63.*
18. Boulinguez S, Grison.Tabone C, Lamant L, Valmary S, Viraben R, Bonnetblanc J, et al, *Histological evolution of recurrent basal cell carcinoma and therapeutic implications for incompletely excised lesions, Br J Dermatol 2004; 151:623-6*
19. Hutcheson A, Fisher A, Lang P, *Basal cell carcinomas with unusual histologic patterns J Am Acad Dermatol 2005;53:833-7.*
20. Tamez R, Rangel J, Chávez A, Vázquez H, *Carcinoma basocelular y epidermoide en pacientes con reporte histopatológico de "tumor en bordes quirúrgicos" Cir Plast 2003; 13(2):61-3.*
21. Rhodes L, de Rie M, Leifsdottir R, *Five-Year Follow-up of a Randomized, Prospective Trial of Topical Methyl Aminolevulinic Photodynamic Therapy vs Surgery for Nodular Basal Cell Carcinoma Arch Dermatol. 2007; 143(9):1131-1136.*
22. Tucker S, Polasek J, Perri A, Goldsmith E, *Long-term follow-up of basal cell carcinomas treated with perilesional interferon alfa 2b as monotherapy, J Am Acad Dermatol 2006;54:1033-8.*
23. Rodriguez-Vigil T, Vázquez-López F, Perez-Oliva N, *Recurrence rates of primary basal cell carcinoma in facial risk areas treated with curettage and electrodesiccation, J Am Acad Dermatol 2007;56:91-5*
24. Pichardo-Velázquez P, Domínguez-Cherit J, Vega-Memije ME, *Surgical option for nonmelanoma skin cancer. Int J Dermatol. 2004 Feb; 43(2):148-50.*
25. Dixon A, Saing L, McGregor D, *Histologic Evolution of Basal Cell Carcinoma Recurrence. Am J Dermatopathology 1991, 13(3):241-247.*
26. Ceilley R, Del Rosso J, *Current modalities and new advances in the treatment of basal cell carcinoma. Int J Dermatol. 2006; 45(5):489-98.*
27. Farhi D, Dupin N, Palangie, *Incomplete Excision of Basal Cell Carcinoma: Rate and Associated Factors among 362 Consecutive Cases, Dermatol Surg 2007; 33:1207–1214.*
28. Lovatt T, Lear J, Bastrilles J, Wong C, Griffiths C, *Associations between ultraviolet radiation, basal cell carcinoma site and histology, host characteristics, and rate of development of further tumors. J Am Acad Dermatol. 2005;52:468-73*
29. Czarnecki D, *The prognosis of patients with basal and squamous cell carcinoma of the skin, Int J Dermatol 1998; 37:656-8.*

30. van Iersel C, van de Velden H, Kusters C, Prognostic factors for a subsequent basal cell carcinoma: implications for follow-up. *Br J Dermatol* 2005; 153:1078-80.
31. Silverman M, Kopf A, Grin C, Recurrence Rates of Treated Basal Cell Carcinomas, *J Dermatol Surg Oncol* 1991; 17:713-718.
32. Marcil I, Stern R, Risk of Developing a Subsequent Nonmelanoma Skin Cancer in Patients with a History of Nonmelanoma Skin Cancer. *Arch Dermatol* 2000; 136:1524-30.
33. Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2007, 157 (Suppl. 2), 47–51
34. Paavilainen V, Tuominen J, Aho V, Long-term results after treatment of basal cell carcinoma of the eyelid in South-Western Finland *Eur J Ophthalmol.* 2007 Jul-Aug; 17(4):494-500.
35. Veien K, Veien N, Risk of Developing subsequent Nonmelanoma Skin Cancers, *Arch Dermatol* 2001; 137: 1250-1.
36. Tiftikcioglu Y, Karaaslan O, Aksoy H, Aksoy B, Kocer U, Basal cell carcinoma in Turkey. *J Dermatol.* 2006; 33(2):91-5.
37. Lovatt T, Lear J, Bastrilles J, Associations between ultraviolet radiation, basal cell carcinoma site and histology, host characteristics, and rate of development of further tumors. *J Am Acad Dermatol* 2005; 52:468-73
38. Robinson J, Fishe S, Recurrent Basal Cell Carcinoma after Incomplete Resection, *Arch Dermatol.* 2000; 136:1318-1324.
39. Dixon A, Hall R, Managing skin cancer 23 golden rules, *Aus Fam Phys* 2005; 34 (8):669-671.
40. Horvitz HR. A first insight into the molecular mechanisms of apoptosis *Cell.* 2004 Jan 23;116(2 Suppl):S53-6
41. Lawen A. Apoptosis-an introduction. *Bioessays.* 2003 Sep; 25(9):888-96.
42. Yuan J, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans* *Cancer Res.* 1999; 59(7 Suppl):1701s-1706s.
43. Alarcon-Vargas D, Ronai Z. p53-Mdm2--the affair that never ends *Carcinogenesis.* 2002 Apr; 23(4):541-7.
44. Levine AJ, Finlay CA, Hinds PW. P53 is a tumor suppressor gene *Cell.* *Cell* 2004; 116(2 Suppl):S67-9.
45. Wei CL, Wu Q, Vega VB, Chiu KP, Ng P, Zhang T, Shahab A, Yong HC, Fu Y, Weng Z, Liu J, Zhao XD, Chew JL, Lee YL, Kuznetsov VA, Sung WK, Miller LD, Lim B, Liu ET, Yu Q, Ng HH, Ruan Y. A global map of p53 transcription-factor binding sites in the human genome. *Cell.* 2001; 124(1):21-3.
46. Ionescu DN. Metastatic basal cell carcinoma: four case reports, review of literature, and immunohistochemical evaluation. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130(1): 45-51

47. Conscience I. *P16 is overexpressed in cutaneous carcinomas located on sun-exposed areas.* *Eur J Dermatol* 2006; 16(5): 518-22.
48. Janisson-Dargaud D. *Aneuploidy, but not Ki-67 or EGFR expression, is associated with recurrences in basal cell carcinoma.* *J Cutan Pathol* 2008; 35(10): 916-21
49. Son KD. *Comparative analysis of immunohistochemical markers with invasiveness and histologic differentiation in squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma of the skin.* *J Surg Oncol* 2008; 97(7): 615-20
50. Segerbäck D. *Repair of UV dimers in skin DNA of patients with basal cell carcinoma.* *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17(9): 2388-92

11. ANEXOS.

ANEXO 1

Nombre	Iniciales	No Bx
Fecha	Registro	
Teléfono		
Edad	Sexo	
L Origen	Residente	
Ocupación		
Topografía		
Morfología		
Evolución		
Datos clínicos y tratamiento		
Diagnóstico clínico		
Diagnóstico histológico		
Nota		
Tipo de biopsia	Margen	
Recurrencia	Año	
Diagnóstico histológico		
Topografía		
Tx previos		
Seguimiento		
(meses)		
Nota		
Tipo de biopsia	Margen	

En fin, creo que por fin, veo el fin y no se imaginan como he deseado verlo.... al fin

Gracias a los que me apoyaron en este proyecto:

Dra. Elisa Vega-Memije.

Dr. Luciano Domínguez.

Dra. Ma. Teresa Hojyo.

Estela de Arenas.

Dra. Verónica Narváez..... Gracias por compartir tus ideas conmigo.

Frida Asz.

Alejandro Asz.

Dr. Daniel Asz.

A todo el equipo de Micología (Bati-cueva).

En la tesis anterior (Medicina Interna) puse a las Marías de mi corazón que solo me quedaba una pues ahora ya no tengo a ninguna pero..... Las llevo en mi corazón.

No me digan lo siento por que yo no lo siento, si la extraño y mucho, pero la vida es sabia y justa y, era hora de partir. Una palmada, un abrazo es mas que suficiente y a veces necesario. Sin tristeza y con flores de colores te despedí.

En memoria de María Martínez (30/05/2009)

A MI MAESTRO Dr. Roberto Arenas Guzmán.

A MI FAMILIA..... que cada día es más grande que sin ellos y su apoyo y, sobre todo su TOLERANCIA.... las piedras en el camino, sería mas que eso.

De psiquiatras, psicólogos y otros locos..... Dr. Campos