



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
“DR. EDUARDO LICEAGA”

EXPRESIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR E ÍNDICE PROLIFERATIVO Ki67 EN MELANOMA MALIGNO NODULAR

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN DERMATOPATOLOGÍA
PRESENTA:

Dra. Kathya Guisell Chinchilla Castañeda

Directora de tesis:

Dra. Patricia Mercadillo Pérez

Profesora Titular del curso:

Dra. Patricia Mercadillo Pérez



DR. EDUARDO LICEAGA

México, D.F. Julio del 2015



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.

ÍNDICE

RESUMEN	3
MARCO TEÓRICO	5
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
ESTUDIOS PREVIOS	25
JUSTIFICACIÓN	27
OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	30
DISEÑO DEL ESTUDIO	
UNIVERSO	
MUESTRA	
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	
CRITERIOS DE NO INCLUSIÓN	
VARIABLES	31
PROCEDIMIENTO	33
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
RECURSOS	35
DIFUSIÓN	36
ASPECTOS ÉTICOS	36
RESULTADOS	37
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	64
BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	72

RESUMEN

El melanoma es una neoplasia derivada de melanocitos, los cuales se localizan mayormente en la unión dermoepidérmica pero también se encuentran en matriz del pelo, epitelio de la retina, úvea y oído interno. Su incidencia se ha incrementado a través de los años en la mayoría de países occidentales. De acuerdo con el reporte de la Organización Mundial de la Salud, cada año ocurren cerca de 57,000 muertes relacionadas con el melanoma. La incidencia de melanoma en México es aproximadamente de 1 por cada 100,000 habitantes, menor que en EE.UU. (16 casos por cada 100,000 habitantes).

Es la forma menos frecuente de cáncer de piel, sin embargo es el responsable de más del 75% de las muertes por neoplasias cutáneas en todo el mundo. Este tumor, es reconocido por su comportamiento agresivo, capacidad de metástasis tempranamente y por lo tanto, su mal pronóstico una vez que ocurre la metástasis. Por ello, la comprensión de sus características biológicas y sus factores pronósticos es de suma importancia. En México, aún no se han realizado estudios que determinen la expresión de biomarcadores en el melanoma maligno, solo se han realizado estudios sobre la incidencia de dicha neoplasia.

El objetivo de este estudio, es realizar la medición semicuantitativa de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular e índice proliferativo ki67 en los casos de melanoma nodular revisados en el Servicio de Dermatopatología del Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" en el período de enero del 2010 a diciembre del 2014.

Se estudiaron 51 casos de melanoma maligno nodular. La frecuencia del sexo femenino fue de 68.6% y la del sexo masculino 31.4%. La media de edad al momento del diagnóstico fue de 62 años. La localización más frecuente encontrada en las mujeres fue la extremidad inferior en un 31.4% de los casos así como en los hombres con un 17.6%. La mayoría de las lesiones presentaban un nivel de Clark IV (58.8%).

El 100% de los casos expresaron algún porcentaje de VEGF. La media de expresión fue de 61.6%. La media de expresión del ki67 fue de 30.2%. Se encontró que a mayor expresión de VEGF el tumor tiene una capacidad más alta de realizar la replicación celular ($P < 0.006$). La expresión del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) resultó ser independiente de la invasividad ($P < 0.665$) y el tamaño de las lesiones ($P < 0.759$). La correlación entre la expresión del índice proliferativo Ki67 y el número de mitosis por campo de alta resolución mostró una significancia alta ($P < 0.00000$).

Este estudio servirá como piloto para el estudio del melanoma maligno en todas sus variedades clínico-patológicas, tomando en cuenta determinaciones inmunohistoquímicas y de biología molecular. Es necesaria la integración de una clínica multidisciplinaria para el estudio, diagnóstico, tratamiento y prevención del melanoma maligno.

MARCO TEÓRICO

DEFINICIÓN E HISTORIA

El melanoma es una neoplasia derivada de melanocitos, los cuales se localizan mayormente en la unión dermoepidérmica pero también se encuentran en matriz del pelo, epitelio de la retina, úvea y oído interno. Se trata de una palabra derivada del griego “*melas*” que significa oscuro y “*oma*” que significa tumor. Las primeras descripciones de melanoma datan del siglo V A.C. en las escrituras de Hipócrates de Cos, posteriormente por el físico griego Rufus de Éfeso. La evidencia física más temprana que se tiene de este tumor, proviene de las múltiples metástasis melanóticas encontradas en los esqueletos de momias precolombinas de Chancay y Chingas en Perú.¹

Durante los años de 1650 y 1760, la literatura médica europea; incluyendo los trabajos de Highmore (1651), Bonet (1651), y de Henrici y Nothnagel (1757), hicieron numerosas referencias de “tumores negros fatales con metástasis y fluido negro en el cuerpo”. El cirujano escocés John Hunter, quien trabajó en la escuela de medicina del Hospital Saint George en Londres, es acreditado por la primer extirpación quirúrgica de un melanoma en un paciente con el tumor localizado en región mandibular. Rene Laennec, fue el primer médico en identificar que el melanoma era una enfermedad distinta a los depósitos de carbón encontrados durante las autopsias, de forma incidental en pulmones de pacientes. En una lectura; dada en Paris en 1804 y publicada a continuación en 1806, fue este médico quien acuñó el término de “melanosis” para describir estos tumores. Jean Cruveilhier, en su libro “Anatomie Pathologique du Corps Humain” (publicado entre los años 1829 y 1842), fue el primero en describir melanomas en manos, pies y vulva.¹

William Norris en 1820, le dió seguimiento a un paciente de 59 años con melanoma. En su estudio, documentó tanto la progresión de la enfermedad como los hallazgos anatómicos encontrados en la autopsia del paciente. Durante los

siguientes años, Norris estudió más casos de melanomas en diferentes pacientes, él fue el primero en proponer la relación entre los nevos melanocíticos y el melanoma, así como la posible conexión entre el melanoma y algunos factores ambientales. Él hizo la observación que la mayoría de sus pacientes con melanoma poseían cabello claro y piel de complejión más clara que el resto de la población no afectada. Tiempo después, este médico describió que los melanomas podían ser tanto pigmentados como amelánicos y que estos tumores tenían la tendencia de diseminarse ampliamente en otros órganos.¹

Sir Robert Carswell; médico practicante distinguido de la patología en Londres, fue acreditado como la primer persona en utilizar la palabra “melanoma en 1838. En 1853, Sir James Paget, cirujano consultante del Hospital de San Bartolomeo en Londres, presentó un reporte de 25 casos de melanoma, en el cual se describe la transición del crecimiento radial del melanoma a una fase de crecimiento vertical.¹

En la actualidad, estos conceptos siguen siendo utilizados para el mejor entendimiento de este tumor. Se sabe que el melanoma es un tumor derivado de la proliferación de melanocitos atípicos con o sin la capacidad de producir pigmento, caracterizado por su gran capacidad de dar metástasis, que se presenta principalmente en la piel pero se puede encontrar en otros órganos.²

EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de piel en México ocupa el segundo lugar de las neoplasias malignas, con una frecuencia de 13.6%.² En las tres últimas décadas el melanoma ha aumentado su frecuencia hasta en un 400% en varios lugares del mundo, con una tendencia a la estabilización durante los últimos años.³ El melanoma es el tercer cáncer de piel después del carcinoma basocelular y del epidermoide, con frecuencia menor a 10%, no obstante 75% de las muertes por cáncer cutáneo se debe a esta neoplasia.⁴

La incidencia global de este tumor corresponde a 160,000 nuevos casos por año, con 48,000 muertes por año.⁵ La más alta incidencia se observa en Queensland, Australia (56 casos por cada 100,000 habitantes por año en varones y 41 casos por cada 100,000 habitantes al año en mujeres). En la población caucásica no hispánica en EUA la incidencia anual es de 19 casos por cada 100,000 habitantes al año en varones y 14 casos por cada 100,000 habitantes en mujeres.⁶ En Europa, las tasas de incidencia varía según la región sin embargo coinciden en el ascenso en el número de casos. Es así, que las tasas más altas de incidencia se observan en Suiza (15.3 casos por cada 100,000 habitantes en hombres y 15.5 casos por cada 100,000 habitantes en mujeres), Austria (21.5 casos por cada 100,000 habitantes en hombres y 17.5 casos por cada 100,000 habitantes en mujeres) y Noruega (16.1 casos por cada 100,000 habitantes en varones y 15.7 casos por cada 100,000 habitantes en mujeres).⁷

En América Latina, no existen estadísticas fidedignas sobre la incidencia de Melanoma; las estimaciones de la *International Agency for Research on Cancer* arrojan una incidencia de melanoma en América Latina variable que va de 0/100.000 habitantes en Belice hasta 7,6/100.000 habitantes en Uruguay.⁸ En México, según las estadísticas del Instituto Nacional de Cancerología, la incidencia de melanoma maligno ha aumentado hasta en un 500% en los últimos años y de acuerdo a un estudio retrospectivo basado en los datos del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas la incidencia global de melanoma calculada fue de 1,01/100,000 habitantes.²

ETIOPATOGENIA

El aumento en la incidencia del melanoma se ha asociado tanto a factores genéticos como ambientales. A continuación se enumeran algunos de estos factores:

1. La exposición a la radiación ultravioleta (RUV) y el melanoma. Información reciente muestra el rol mutagénico directo de la RUV en la patogénesis del melanoma. Se han observado sitios de transición en las bases nitrogenadas de pirimidina con la conversión de bases C a T así como de bases G a A. Otras mutaciones descritas debido a la RUV se han encontrado en los genes STK19, FBXW7 y IDH1.⁹ La mayor razón de incremento en la incidencia podría deberse al aumento de la exposición, sobretodo intensa e intermitente, de fototipos claros de piel a la RUV.⁶
2. Aproximadamente el 10% de los melanomas cutáneos ocurren en un escenario familiar con dos o más relativos afectados, lo cual indica el involucro de genes con una baja prevalencia pero con alta penetrancia.^{10,11} Los alelos de riesgo elevado y alta penetrancia son expresados usualmente en grupos de familias en un patrón autosómico dominante.⁶ el descubrimiento de las mutaciones en el oncogén BRAF en el melanoma (Davies et al. 2002), es una de las afirmaciones más poderosas sobre la caracterización del potente sistema transformativo en el genoma de este cáncer. Hay evidencia que sugiere mutaciones en la vía del gen del retinoblastoma, la cual sirve para regular la cinasa N2A dependiente de ciclina (CDKN2A). Se ha identificado con los años que estas mutaciones existen en familias con aumento en la ocurrencia tanto de melanomas como de nevos atípicos. Mutaciones recurrentes en el CDK4, el cual conlleva a una progresión en el ciclo celular, se han reportado en familias con alta incidencia de melanomas.¹¹
3. Aumento en el diagnóstico o cambios en los criterios diagnósticos, con un mayor índice de sospecha tanto en la población general como en los trabajadores de la salud, resultando en mayores índices de detección de melanoma o en la detección de melanomas en etapas más tempranas.²

4. La inmunosupresión es considerado un factor de riesgo para desarrollar melanomas, como fue demostrado en un estudio realizado en pacientes post-transplantados de riñón.¹²

CLASIFICACIÓN

En 1912, Dubreuilh; un dermatólogo francés, proporcionó el primer sistema de clasificación del melanoma, de acuerdo a la lesión precursora de este tumor. Es decir, aquellos originados de un nevo, aquellos que se originaban de lesiones pigmentadas en piel que surgían en la vida adulta y aquellos que aparecían de piel sana.¹³ Sin embargo, en el año 2006 la Organización Mundial de Salud determinó la siguiente clasificación, basándose tanto en características clínicas como histopatológicas; actualmente, esta clasificación es utilizada de forma universal:

- Melanoma de extensión superficial: En la literatura mundial representa el 70% de los melanomas; en México, representa tan solo del 7 al 20% de estos tumores.² Presenta crecimiento horizontal por un tiempo variable antes de volverse invasivo. Ocurren en pacientes jóvenes (5ta década). Usualmente afectan áreas de exposición solar. Se presentan en la mayoría de los casos como máculas hiperpigmentadas, con diferentes tonalidades de pigmento, de crecimiento lento en una forma radial. Posteriormente, cuando sobreviene la etapa de crecimiento vertical, se traduce clínicamente en zonas elevadas de la lesión (Fig. 1).¹³
- Melanoma nodular: En México, representan la variedad más frecuente del melanoma con un 32% a un 49%.² tiende a ocurrir en pacientes de mayor edad (7ma década de la vida). Pueden ocurrir en cualquier localización anatómica y usualmente se presentan como nódulos con rápido crecimiento y extensión. Pueden mostrar ulceración y hemorragia al momento del diagnóstico. Clínicamente, pueden ser confundidos con otros tumores cutáneos, si se trata de la variedad amelanica (Fig. 2).¹³

- Melanoma lentigo maligno: Representan aproximadamente el 5% de los melanomas.² Involucra usualmente áreas de exposición crónica a la radiación solar, como ser cabeza y cuello. Se presentan como máculas de diferentes pigmentos y bordes irregulares en personas ancianas (8va década). Su evolución es larga antes de presentar crecimiento vertical y metástasis, sin embargo, su riesgo de producir metástasis es igual al de otros tipos de melanoma cuando se ajusta de acuerdo al índice de Breslow (Fig. 3).¹³
- Melanoma acral lentiginoso: En México representan del 24% al 31% de los melanomas, en la Literatura mundial representan el 8% de estos tumores. Son melanomas más comunes en personas de piel oscura, en los que predomina el componente de extensión radial. Por definición, involucran áreas acrales (manos, piés y región subungueal). Cuando se presenta en mucosas es de mal pronóstico ya que tiene rápido acceso a la circulación linfática (Fig. 4).^{2,13}
- Melanoma desmoplásico: Descrito en 1971 por Conley, es un melanoma caracterizado por la presencia de células fusiformes separadas por un estroma desmoplásico (fibroso). Se presenta como una placa de bordes mal definidos o como un nódulo sin pigmento, principalmente en cabeza y cuello característicamente surge en el contexto de un lentigo maligno asociado.²
- Melanoma nevoide: se trata de melanomas que histológicamente simulan a los nevos melanocíticos en bajas magnificaciones. Se dividen en dos tipos, aquellos de células pequeñas que simulan nevos melanocíticos comunes y Spitzoides que simulan nevos de Spitz.¹³
- Melanoma congénito e infantil: es aquel que se desarrolla durante el primer año de vida. Es muy raro, desde 1925 solo se han reportado 23 casos en la literatura en lengua inglesa. Se presenta en productos de madres con melanoma y representa transmisión placentaria del tumor.²

- Melanoma que emerge de un nevo congénito: los nevos melanocíticos congénitos gigantes se presentan en un 0,00005% de los neonatos, miden más de 10 cm, pueden malignizarse en 3,8% a 8,5% de los casos, sobre todo durante la primera década de la vida. Aún cuando se ha estimado un riesgo de malignización durante la vida del 5 al 40% (Fig. 5) .²
- Melanoma que emerge de un nevo azul (Fig. 6).
- Melanoma recurrente: es el que se desarrolla dentro de los 5cms de la cicatriz operatoria del tumor primario, sin signos de actividad regional o a distancia del melanoma, fuera de esos 5 cms. Deben distinguirse de los melanomas con recurrencia local, debido a metástasis local.¹⁴

HISTOGÉNESIS

Toda discusión sobre la tumorigénesis del melanoma debe tomar en cuenta las siguientes observaciones clínicas: (1) la asociación entre los nevos precursores y el melanoma en aproximadamente el 30% de los casos. (2) el rol de la RUV en la patogénesis del melanoma. (3) el fenotipo pigmentario de los pacientes en los que se desarrolla el tumor y (4) el historial familiar de melanoma y otros factores genéticos.¹⁶

Se han sugerido 5 estadios de la transformación maligna y la progresión del tumor en los melanocito, basándose en propiedades clínicas, histopatológicas, inmunopatológicas y citogénicas in vitro: (1) nevo melanocítico benigno (2) nevo atípico (3) melanoma primario con fase de crecimiento radial (4) melanoma primario en fase de crecimiento vertical y finalmente (5) melanoma metastásico. Se cree que en cada paso de la tumorigénesis, un nuevo grupo clonal de las células tumorales, emerge con ventajas de crecimiento en el tejido circundante, resultando en una “expansión clonal”.¹⁶

Se ha postulado que un paso crítico en la progresión del melanoma pueda ser la transición de crecimiento radial a vertical. La fase de crecimiento radial consiste en la proliferación intraepidérmica de las células tumorales, así como la invasión de la dermis papilar por un número pequeño de células que han adquirido ventajas de crecimiento. Estas células se caracterizan por la presencia de E-caderina, una molécula de adhesión que interactúa con los queratinocitos e impide la migración de estas células fuera de su localización intraepidérmica.¹⁶

La fase de crecimiento vertical está caracterizada por la propiedad de crecimiento de agregación y no de proliferación (Fig 7). Esto resulta en la formación de nidos o masas de agregación de células tumorales. Dentro las principales características de las células tumorales en esta etapa, se encuentra la pérdida de expresión de la E-caderina y la alta expresión de la N-caderina, una molécula que interactúa con los macrófagos, fibroblastos y células endoteliales.¹⁶

Los melanomas nodulares son un subtipo distintivo de melanoma cutáneo, mostrando una menor fase de crecimiento radial y una fase de crecimiento vertical más pronunciada. Además, existen diferencias importantes entre los melanomas nodulares y los de extensión superficial. Dentro de ellas, encontramos que los oncogenes importantes BRAF y BRAS, el factor de crecimiento endotelial y el factor inducido por la hipoxia 1 (HIF-1) se encuentran con más mutaciones o mayormente expresados en los melanomas nodulares. Esto podría explicar el comportamiento más agresivo de este subtipo.¹⁵ El gen NRAS se activa más frecuentemente en melanomas nodulares y en los melanomas asociados a mayor exposición de radiación solar.⁶

HISTOPATOLOGÍA

Ackerman y cols. Propusieron un sistema para el diagnóstico histopatológico de los melanomas, basándose tanto en las características arquitectónicas como

citológicas propias de la lesión. Las características arquitectónicas del melanoma incluyen: asimetría, lesiones poco circunscritas, la presencia melanocitos distribuidos irregularmente ya sea solos o en nidos, melanocitos ocupando la epidermis (distribución pagetoide), en anexos o en dermis.¹⁷ Los melanocitos individuales o en nidos, presentan falta de maduración. Adicionalmente, la melanina está distribuida de forma irregular en la lesión tanto en la epidermis como en la dermis y en las estructuras anexiales. Las características citológicas incluyen la presencia de melanocitos atípicos, necróticos o que se encuentran en fase de mitosis.¹⁸

Todos los subtipos de melanomas pueden progresar e involucionar a una etapa vertical de crecimiento, sin embargo el melanoma nodular presenta invasión a la dermis en estadíos tempranos, en contraste a otros subtipos que se confinan a la epidermis y presentan crecimiento más lento.^{18,19}

Los siguientes son los datos histológicos esenciales que deben ser valorados en el las lesiones y son factores pronósticos en el melanoma cutáneo primario incluidos en la clasificación de la American Joint Committee on Cancer (AJCC):

- Índice de Breslow: En 1970, Alexander Breslow evaluó la relación entre la profundidad histológica del melanoma y su pronóstico. Se realiza medición desde la capa granulosa hasta la porción más profunda de la dermis ocupada por las células tumorales. Existen situaciones especiales que modifican la toma de medida de este índice. Por ejemplo, si la lesión se encuentra ulcerada debería tomarse la medida iniciando desde la célula tumoral viable más cerca de la capa granulosa, algunos autores prefieren no utilizar este índice en estos casos.²⁰
- Nivel de Clark: En 1969, Clark and cols. Propusieron un esquema para describir los melanomas según su involucro de profundidad histológica. Estos niveles son los enumerados a continuación:

- I—Células tumorales confinadas a la epidermis (in situ) (Fig. 8).
- II—Extensión a la dermis papilar, con muy pocas células de melanoma en la dermis papilar , sin ocuparla completamente (Fig. 9).
- III—Extensión a la dermis papilar, ocupándola completamente y dirigiéndose a la dermis reticular, sin invadirla (Fig. 10).
- IV—Invasión a la dermis reticular (Fig. 11).
- V—Invasión del tejido celular subcutáneo (Fig. 12).

- Índice mitótico por campo de gran aumento: reportado como el número máximo de mitosis observadas en un milímetro cuadrado (Fig.13 y Fig.14). El comité de estadificación para el melanoma del AJCC recomienda realizar la cuantificación de las mitosis presentes en las “zonas calientes” (áreas del tumor que contienen mayor cantidad de mitosis) o “hot spots”. En esta técnica, los tejidos teñidos en hematoxilina y eosina son revisados hasta encontrar la región del tumor donde se encuentren más figuras mitóticas.²⁰
- Ulceración: definida histológicamente como la pérdida total de la epidermis y cierta cantidad de dermis (Fig. 7).¹⁷
- Regresión del tumor: definido histológicamente como la destrucción de células tumorales con el reemplazo de tejido fibroso. Pueden observarse melanófagos, grados variables de infiltrado inflamatorio y aumento en la vasculatura. Aproximadamente el 10% al 35% de los melanomas muestran regresión histológica.¹⁷
- Infiltración linfocitaria del tumor: en 1989, Clark and cols. Demostraron que la infiltración tumoral por linfocitos era un factor predictor de supervivencia a 8 años (Fig. 15 y Fig.16). El patrón de infiltración por linfocitos se describe como: “enérgico, no enérgico o ausente”. El patrón enérgico, implica un denso infiltrado de linfocitos tanto dentro de la neoplasia como en su periferia y está asociado a un mejor pronóstico.¹⁷

- Metástasis satelitales histológicas: Day y cols. Las definieron como nidos tumorales discretos mayores de 0.05mm de diámetro, separadas del tumor primario por fibras normales de colágeno o por tejido subcutáneo.¹⁷
- Otras características importantes: otros factores importantes que podrían influir en el pronóstico del melanoma y que deben ser evaluados en la histopatología fueron descritos en el año 2011 por Tejera-Vaquerizo y cols. Éstos incluyen linfangiogénesis tumoral, hiperplasia epidérmica paratumoral, invasión vascular (Fig. 17), neurotropismo, atipia celular y nevo melanocítico asociado. Sin embargo son factores no incluidos en la clasificación de la AJCC.²¹

Linfoangiogénesis tumoral

Hoy en día existe evidencia de que el melanoma puede inducir la formación de nuevos vasos linfáticos y de que esta linfoangiogénesis está relacionada con una mayor incidencia de metástasis en el ganglio centinela y con una menor supervivencia libre de enfermedad. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por Vascular Endotelial Growth Factor), liberado por las células del melanoma y por los macrófagos asociados al tumor, probablemente representa el mayor factor linfoangiogénico no sólo en el melanoma, sino también en muchos otros tumores. La mayoría de los melanomas cutáneos metastatizan a través de los ganglios linfáticos regionales como primera localización metastásica. Se sabe que la linfoangiogénesis inducida por el tumor desempeña un papel activo en la génesis de las metástasis linfáticas regionales. El proceso se produce a través de la formación de un “nicho premetastásico” inducido por la expresión de VEGF en el melanoma primario.²¹ En un análisis multivariante la linfoangiogénesis tumoral fue el factor pronóstico independiente con una mayor capacidad para predecir la positividad del ganglio centinela, incluso por delante del grosor tumoral.²²

INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica (IHQ) constituye en la actualidad una herramienta diagnóstica fundamental en dermatopatología. Se trata de un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o los tejidos utilizando anticuerpos marcados. Estas técnicas se basan en la capacidad de los anticuerpos para unirse específicamente a los correspondientes antígenos, y la reacción se hace visible solo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o produce coloración.²³

En las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas capaces de hacer cambiar de color un sustrato incoloro. Por ejemplo, las enzimas más frecuentemente utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina, y los sustratos más comunes son la diaminobenzidina (color marrón), el aminoetilcarbazol (color rojo) y el nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden unirse (conjugarse) directamente al anticuerpo primario, o indirectamente mediante otros anticuerpos (secundarios) o sustancias como biotina o proteína A.²³

El melanoma maligno se tiñe positivamente para los siguientes marcadores de inmunohistoquímica:

- Proteína S-100: continúa siendo el marcador más sensible para lesiones melanocíticas (sensibilidad de 97-100% para el melanoma). El nombre de S-100 deriva de la observación que esta proteína que se une al calcio de 21 kD es soluble 100% en solución de sulfato de amonio. La especificidad de esta proteína no es tan alta para el melanoma ya que se expresa en otras células como ser: células de la vaina nerviosa, mioepiteliales, adipocitos, condrocitos y todas las células derivadas de ellas (Fig. 18).¹⁷

- Melan-A: es un componente de la membrana del premelanosoma, producto del gen MART-1 (Fig. 19). Es un antígeno de diferenciación melanocítica, reconocido por células T citotóxicas, que se expresa tanto en melanocitos normales como en las células proliferantes de nevos melanocíticos y melanomas. También se expresa en células de la retina, la corteza suprarrenal, el ovario y las células de Leydig del testículo. Junto con la proteína S-100 este marcador es el más utilizado para demostrar la estirpe melanocítica de una neoplasia. Su tinción es más difusa, pero más intensa que la de la proteína S-100. Las únicas neoplasias melanocíticas que no son identificables con el Melan-A son el melanoma desmoplásico y algunos melanomas de células fusiformes. Este marcador resulta también útil en el protocolo de estudio histopatológico del ganglio centinela del melanoma.²³
- HMB-45: marcador más específico pero menos sensible para el melanoma. Este marcador tiñe la proteína citoplasmática premelanosómica gp100. La sensibilidad para el melanoma varía desde 69% hasta 93%, siendo mayor para melanomas primarios que para melanomas metastásicos. Sin embargo es específico para lesiones melanocíticas pues se encuentra ausente en un 100% de lesiones no melanocíticas (Fig. 20).¹⁷
- MiTF-1 (*Microphthalmia transcription factor 1*): es una proteína nuclear implicada en el desarrollo embriológico de los melanocitos y la regulación de la síntesis de melanina. Se expresa en la mayoría de las proliferaciones melanocíticas, aunque posee poca especificidad, ya que también es positiva en macrófagos, linfocitos, fibroblastos, músculo liso y células de Schwann. Se trata de un marcador nuclear, lo que facilita su interpretación. Se ha observado positividad para MiTF-1 hasta en un 88% de las metástasis de melanoma.²³
- Sox-10: es un factor de transcripción de la cresta neural que parece ser crucial para la diferenciación, maduración y mantenimiento de estas células

pluripotenciales hacia la formación de células de Schwann y de melanocitos. El anticuerpo anti-Sox-10 se expresa en todo tipo de neoplasias melanocíticas benignas y malignas. Su expresión nuclear, hace que sea más fácil su interpretación que la inmunotinción con proteína S-100, Melan A o HMB-45. Además de su gran sensibilidad, resulta más específica que la proteína S-100 como marcador de melanocitos ya que algunos melanomas desmoplásicos negativos para la proteína S-100 han resultado ser Sox-10 positivos.²³

Descripción del índice proliferativo Ki67

Es una proteína nuclear implicada en la regulación de la proliferación celular, que únicamente se expresa en las células que están en fase de proliferación o de mitosis, principalmente es células epiteliales y en mucha menor medida en las células inflamatorias. Se identifica durante todas las fases del ciclo celular, excepto en el G0 e inicialmente en el G1. Se expresa más concretamente en las fases proliferativas G1 tardía, S, G2 y M.²⁴ El índice Ki67 ha demostrado correlación con la progresión, potencial metastásico y disminución en la supervivencia del melanoma. Así mismo hay evidencia que lo relaciona con el grosor del tumor.²⁵

La primera descripción de esta proteína fue realizada por Gedes et al, (1983) quienes describieron un anticuerpo monoclonal de ratón, el Ki-67, que reaccionaba con un antígeno nuclear de células en proliferación activa. Sus estudios experimentales en células estimuladas con mitógenos demostraron que el anticuerpo reconocía un antígeno presente en todas las fases del ciclo de división celular (G1, S, G2, M).²⁶

La inmunotinción con Ki-67 revelaba una actividad nuclear en varios linajes de células humanas en división celular activa (células corticales del timo, células germinales del centro de folículos corticales, células de la región del cuello de la mucosa gástrica, espermatogonias indiferenciadas) y por el contrario, carecía de efecto en las células bien diferenciadas (linfocitos, monocitos, hepatocitos, células renales, células parietales de la mucosa gástrica y células cerebrales). La

expresión del antígeno reaparecía en linfocitos tras ser estimulados con un mitógeno (fitohematoglutina) y desaparecía en las células HL-60 inducidas a diferenciarse a macrófagos maduros por exposición a ésteres de forbol. Estos hallazgos sugirieron la posibilidad de utilizar el antígeno Ki-67 para valorar la fracción de crecimiento, es decir, la proporción de células que se están dividiendo en un tumor.²⁶

Estudios con doble inmunofluorescencia han confirmado que durante la mayoría de la interfase el antígeno Ki-67 se localiza dentro del nucléolo. En la fase G1 precoz se sitúa en un gran número de focos repartidos en el nucleoplasma que se extienden hasta la envoltura nuclear. Durante la mitad de la fase G1 precoz, el antígeno se encuentra asociado con el nucléolo en unas regiones distintas a los dominios que contienen los mayores antígenos nucleolares (fibrilarina y RNA polimerasa I). En el nucléolo ya maduro el Ki-67, se localiza en los dominios que contienen fibrilarina o B23/nucleofosmina y está ausente en regiones que poseen RNA polimerasa I. Cuando se induce la ruptura del nucléolo se observa la translocación del antígeno a focos nucleoplásmicos carentes de fibrilarina o RNA polimerasa I. Así, aparentemente el Ki-67 se encuentra en regiones del componente fibrilar denso del nucléolo deficientes en fibrilarina.²⁶

En general, las neoplasias melanocíticas malignas muestran positividad para el Ki67 en más del 5% de las células neoplásicas (entre el 13-30% en el melanoma maligno) y es frecuente observar positividad nuclear en muchas de las células de las áreas profundas de la lesión (Fig. 21).²³

Descripción del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF): un fuerte mitógeno específico para células endoteliales. Estimula la migración y reorganización de estas células. Es producido por una variedad de tumores en el ser humano, incluyendo el melanoma, en el cual se cree posee un rol muy importante.²⁷

El crecimiento y la expansión de un tumor dependen principalmente de la angiogénesis, la formación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos pre-existentes. Los tumores que carecen de vascularidad no pueden crecer más allá de un tamaño máximo (1 a 2 mm³) sin neovascularización y pueden ser eliminados por el sistema inmune. La angiogénesis requiere la estimulación de las células endoteliales vasculares a través de la liberación de factores angiogénicos. De éstos, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el regulador más crítico en el desarrollo del sistema vascular y como ya se mencionó con anterioridad, se sobre expresa comúnmente en una variedad de tumores sólidos humanos, incluyendo melanoma. Las células neoplásicas se encuentran bajo mayores índices de hipoxia y de estrés oxidativo que las células normales. Los radicales de oxígeno y la hipoxia cooperan para promover la angiogénesis del tumor, haciendo que la activación de HIF- 1 estimule la expresión del VEGF. Además, los radicales de oxígeno activan el NFκB que también aumenta la expresión de VEGF.²⁸

La familia VEGF consta de cinco isoformas, VEGF-A (conocido como VEGF), VEGF-B, VEGF -C, VEGF-D, y factor de crecimiento placentario. El VEGF-A, también conocido como factor de permeabilidad vascular o VEGF, se describió como un mitógeno de células endoteliales potente que estimula la proliferación y migración de células endoteliales.²⁹

Diversos estudios han examinado la expresión de miembros de la vía de señalización del VEGF en el melanoma. La secreción del VEGF se produce durante la progresión de las lesiones melanocíticas cutáneas tempranas, con una baja expresión del VEGF en nevos benignos, aumentando significativamente en los nevos displásicos y más aún en el melanoma maligno. La transición de melanomas en fase de crecimiento radial a las fases de crecimiento vertical agresivos también está marcada por un aumento en la producción y expresión del VEGF (Fig. 22).²⁹

TRATAMIENTO

La extirpación quirúrgica completa con margen es el tratamiento de elección para el melanoma localizado. Una vez confirmado el diagnóstico y que se ha proporcionado una estadificación adecuada del tumor, una extirpación amplia y profunda es necesaria para asegurar una completa remoción. El principal propósito de la excisión de un melanoma sin importar el grosor es obtener márgenes libres de la proliferación para prevenir la recurrencia. Se recomiendan márgenes de 1-2cms clínicamente medidos alrededor del tumor.³⁰

El mapeo linfático con linfocintografía e inyección intraoperatoria de un radioisótopo o tinción azul, es utilizado para identificar el ganglio linfático más cercano al tumor primario. La examinación histológica del ganglio centinela identificado con esta técnica, es utilizada para identificar la presencia o ausencia de células metastásicas con un alto grado de precisión. Esta técnica debe realizarse en todo paciente con melanomas de más de 1mm de grosor.³⁰

En la actualidad, las nuevas terapias e incluso las que aún se encuentran en vías de investigación, van dirigidas hacia la determinación de biomarcadores que sirvan como factor pronóstico de metástasis o agresividad y que expliquen la rápida capacidad de metástasis de esta neoplasia (Expresión genética de mutaciones BRAF, RAS, CDKN2A y moléculas como el VEGF).

Las modalidades de tratamiento para las metástasis regionales a piel del melanoma maligno incluyen: excisión quirúrgica, radioterapia, perfusión aislada de la extremidad, hipertermia local, crioterapia, electrocirugía y curetaje, láser, terapia fotodinámica, quimioterapia local, inmunoterapia local con imiquimod, quimioterapia sistémica, inmunoterapia sistémica, terapia genética, entre otras.³¹

Actualmente existen pocos tratamientos aprobados por la FDA para tratar el melanoma metastásico, los cuales incluyen medicamentos biológicos y quimioterapéuticos comunes. Por desgracia, ninguno de los medicamentos

actuales altera el curso natural de la enfermedad. Por ejemplo, IFN-a2b (medicamento más utilizado en melanoma en etapa III), ha demostrado aumentar el periodo libre de enfermedad en un 10%-20%, sin un efecto claro en la mortalidad global.³²

En junio del 2011, Chapman y colaboradores publicaron un ensayo en fase III en el cual evaluaron la sobrevida global de pacientes tratados con un nuevo agente biológico, Vemurafenib, que interactúa con BRAF cuando existe una mutación puntual, la V600E (glutamato en lugar de valina en el codón 600). Actualmente este medicamento se encuentra aprobado por la FDA y está incluido en el panel de tratamiento de melanoma avanzado. Se estima que la población anglosajona es positiva para esta mutación en un 30-60%.³³

Uno de los fármacos antiangiogénicos que más se ha ensayado clínicamente es bevacizumab, un anticuerpo monoclonal contra VEGF. Se ha empleado en el melanoma como único fármaco o asociado a citostáticos (carboplatino + paclitaxel o temozolamida) o a interferón-alfa. En uno de los últimos ensayos fase II presentado en el congreso ECCO-ESMO de 2009 sobre 214 pacientes, en los que un grupo recibió carboplatino, paclitaxel y bevacizumab y otro grupo únicamente carboplatino, paclitaxel y placebo, se observó un mayor porcentaje de respuestas, de supervivencia global y de supervivencia a un año en el grupo que recibió bevacizumab.³⁴

Otros de los fármacos antiangiogénicos propuestos, son inhibidores multikinasa de los diferentes receptores de VEGF (VEGFR-1, 2 y 3) (sunitinib, sorafenib, semaxinib, axatinib etc.), derivados de la talidomida o fármacos antimoléculas de adhesión.³⁴

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El melanoma maligno nodular, en México, representan la variedad más frecuente del melanoma con un 32% a un 49%. Los melanomas nodulares son un subtipo distintivo de melanoma cutáneo, mostrando una menor fase de crecimiento radial y una fase de crecimiento vertical más pronunciada. Y es conocido su comportamiento agresivo, facilidad de producir metástasis, así como su peor pronóstico en comparación con otros subtipos de melanomas. Se han propuesto diversas teorías que expliquen este comportamiento agresivo de esta variedad de melanoma, y ya se han descrito hallazgos importantes, dentro de ellos encontramos que los oncogenes importantes BRAF y BRAS, el factor de crecimiento endotelial y el factor inducido por la hipoxia 1 (HIF-1) se encuentran con más mutaciones o mayormente expresados en los melanomas nodulares. El gen NRAS se activa más frecuentemente en melanomas nodulares y en los melanomas asociados a mayor exposición de radiación solar.

Por ello, la comprensión de sus características biológicas y sus factores pronósticos es de suma importancia. Ningún biomarcador pronóstico ha sido incorporado a los protocolos clínicos de diagnóstico, pronóstico y tratamiento del melanoma. Sin embargo, diversos estudios se realizan en la actualidad para demostrar la eficacia de terapia biológica dirigida en contra de muchos de estos biomarcadores (factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF por sus siglas internacionales en inglés) y sus respectivos receptores ya que el comportamiento ante la quimioterapia convencional y la radioterapia de este tumor es poco prometedora.

El número de posibles dianas terapéuticas en el melanoma ha ido aumentando a medida que se ha ido conociendo mejor la biología de este tumor y que se han ido sintetizando diversos fármacos contra alguna de las moléculas implicadas en favorecer su crecimiento.

En México, aún no se han realizado estudios que determinen la expresión de biomarcadores en el melanoma maligno, solo se han realizado estudios sobre la incidencia de dicha neoplasia. Por todo lo anteriormente descrito se plantea esta línea de estudio del melanoma, en el cual logremos identificar la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular en el melanoma nodular, y su implicación en la proliferación de este tumor, mediante la medición semicuantitativa del índice proliferativo ki67.

ESTUDIOS PREVIOS

Los reportes previos de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF por sus siglas internacionales en inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*) e índice proliferativo Ki67 en el melanoma nodular han sido publicados en los últimos 12 años. En el año 2002, Ben-Izhak y cols realizaron un estudio en el que se encontró una asociación entre el porcentaje de expresión del antígeno Ki67 y el tiempo de supervivencia de los pacientes con melanoma maligno anorrectal. Los autores incluyeron 30 pacientes en su estudio con cáncer anorrectal, en los cuales se les tomó biopsia y se determinó el índice proliferativo Ki67, las biopsias mostraron variaciones de expresión entre 18% hasta 80%, con una media de 45%. Se encontró que los pacientes cuya expresión fue menor al 40% mostraron una media de 60 meses de supervivencia ($P=0.0004$) en cambio, los que presentaban expresión mayor de 40% presentaron una media de 11 meses de supervivencia ($P=0.0004$).

En otro estudio, realizado en el año 2005 por Gimotty y cols, se determinó la expresión del Ki67 en biopsias tomadas de 396 pacientes con melanoma maligno cuyo espesor fuese menor de 1mm, durante un período de tiempo comprendido entre 1972 y 1991. Se encontró que los pacientes que expresaron más de un 20% de Ki67 presentaron peor pronóstico (metástasis regional, diseminada o múltiple), estos pacientes presentaron una incidencia de metástasis de 38.7% comparado con un 10.3% en los pacientes con una expresión menor del 20% del Ki67.

Ladstein y cols. (2010) realizaron un estudio para demostrar que la expresión del índice proliferativo Ki67 es superior al conteo de mitosis como factor pronóstico en melanoma nodular. Se incluyeron 202 pacientes en este estudio, se encontró que un alto índice mitótico y una elevada expresión del Ki67 se correlacionaba con un incremento en el grosor del tumor, presencia de ulceración y de necrosis, con un nivel alto en la escala de Clark y la presencia de invasión vascular. Sin embargo, el Ki67 resultó tener una P más significativa en todas estas asociaciones y como factor pronóstico de supervivencia. Por ejemplo, en la supervivencia a 10 años, un

índice mitótico mayor o igual a 1.7 por mm² mostró un porcentaje de supervivencia de 51% en 10 años con una P=0.008, en contraste una expresión de ki67 mayor de 16% mostró un porcentaje de supervivencia de 47% en 10 años con una P=0.0001. Esto demostró que este último indicador es superior como factor pronóstico en el melanoma nodular.

En cuanto a la expresión del VEGF en el melanoma maligno, El primer estudio reportado fue el de Dadrás et al. (2005) quienes realizaron la medición semicuantitativa VEGF, entre otros marcadores de linfoangiogénesis el melanoma maligno. Ellos encontraron una correlación del desenlace clínico y los hallazgos histológicos de 45 pacientes con melanoma. Los pacientes con melanoma metastásico mostraron mayor expresión del VEGF en comparación a los pacientes que no presentaban metástasis. La extensión de la linfoangiogénesis en los tumores, mostraron una sensibilidad de 83% y especificidad de 89% como factor pronóstico de metástasis a ganglios linfáticos en el melanoma maligno.

Mehnert y cols. en el año 2010, publicaron un estudio en el cual realizó la expresión cuantitativa del VEGF y sus receptores (VEGF-R1, VEGF-R2, and VEGF-R3) en el melanoma maligno. Los autores incluyeron 540 nevos melanocíticos y 468 melanomas en su estudio (198 primarios y 270 metástasis). Utilizando el Análisis Cuantitativo Automatizado (AQUA), se encontró que la expresión del VEGF y sus receptores fue significativamente mayor en los tejidos de los melanomas (P=0001) que en los de los nevos melanocíticos.

Anagnostopoulou y cols. (2011) realizaron un estudio que incluyó 95 biopsias de melanoma, 28 de nevos displásicos y 10 nevos intradérmicos como control. Estos autores encontraron que el VEGF se expresó únicamente en los melanomas (86.31%), especialmente en los de tipo nodular (P=0.01) y en los nevos displásicos (75%). En los nevos intradérmicos tenía muy poca expresión.

JUSTIFICACIÓN

Magnitud

Según los últimos reportes de la OMS, el melanoma maligno es la principal causa de mortalidad por neoplasias primarias cutáneas. Dentro de sus variedades clínico patológicas destaca el melanoma nodular por su comportamiento agresivo y capacidad de invasión. Es necesario establecer patrones de comportamiento biológico.

Trascendencia

Debido a las características biológicas rápidamente progresivas de esta neoplasia, produce metástasis tempranamente y por lo tanto la expectativa de vida de los pacientes afectados es muy corta. Este tumor tiene una pobre respuesta hacia la quimioterapia convencional y la radioterapia por ello, en la actualidad, las nuevas terapias e incluso las que aún se encuentran en vías de investigación, van dirigidas hacia la determinación de biomarcadores que sirvan como factor pronóstico de metástasis o agresividad (Ki67) y que expliquen la rápida capacidad de metástasis de esta neoplasia (VEGF). Con esto se pretende prolongar la vida de los pacientes, proporcionándoles mejor calidad de vida. En México no existen reportes previos ni acerca de la expresión de estos biomarcadores en el melanoma maligno por lo tanto no hay proyección terapéutica basada en estos hallazgos.

Vulnerabilidad

Este estudio cuenta con la expresión del VEGF y del Ki67 en el melanoma nodular de manera completa, ya que a cada uno de los casos se les realizó inmunohistoquímica con el antígeno contra el factor de crecimiento endotelial vascular A y el antígeno ki67.

Factibilidad

El servicio de Dermatopatología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” es un centro de referencia de tercer nivel para el diagnóstico de enfermedades cutáneas que cuenta con un gran acervo de especímenes de biopsia, suficiente número de casos por año y los recursos médicos y de laboratorio que permiten realizar estudios inmunohistoquímicos comparativos y clínico-patológicos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Medir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular e índice proliferativo ki67 en los casos de melanoma nodular revisados en el Servicio de Dermatopatología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” en el periodo de enero del 2010 a diciembre del 2014.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el número total de casos de melanoma nodular.
- Identificar el género, edad, localización, morfología, diagnóstico clínico y tiempo de evolución que presentaron los pacientes al momento de la toma de biopsia.
- Describir las variables histológicas de los casos como son: nivel de Clark, número de mitosis, ulceración, invasión vascular, entre ellos.
- Determinar la expresión en porcentaje del VEGF realizado en los casos de melanoma nodular.
- Determinar la expresión en porcentaje del Ki67 realizado en los casos de melanoma nodular.
- Correlacionar la expresión del VEGF y la expresión del índice proliferativo Ki67 en los casos de melanoma nodular.
- Correlacionar el número de mitosis por campo de alta resolución (40x) con la expresión del Ki67 en los casos de melanoma nodular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Observacional, descriptivo y transversal.

Universo

Pacientes con diagnóstico de melanoma nodular que fueron revisados en el servicio de Dermatología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.

Muestra

Pacientes con melanoma nodular diagnosticados en el Servicio de Dermatopatología de este hospital, en el periodo de enero del 2010 hasta diciembre de 2014.

Criterios de inclusión

- Pacientes cuyas laminillas, bloque y expediente se encuentre disponible para su revisión y realización de Ki67.

Criterios de no inclusión

- Pacientes cuyo expediente no se encuentre disponible para su revisión.
- Pacientes cuyo bloque tenga muestra insuficiente para la realización de inmunohistoquímica.
- Pacientes que hayan solicitado su bloque para ser referidos a otra institución.

Sede del estudio.- Servicio de Dermatopatología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.

VARIABLES

- **Variables independientes**

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN
Melanoma Maligno	Cualitativa, Nominal	Neoplasia que se deriva de los melanocitos en la piel, ojos, oído interno, meninges, tejido adiposo, corazón, pulmón, cartílago y huesos.	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo

- **Variables dependientes**

- Variables clínicas

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN
Sexo	Cualitativa Nominal Dicotómica	Propiedad según la cual puede clasificar a los organismos de acuerdo a su función reproductiva	<ul style="list-style-type: none"> • Femenino • Masculino
Edad	Cuantitativa discreta	Tiempo transcurrido desde el nacimiento	Años
Tiempo de evolución	Cuantitativa Discreta	Tiempo transcurrido desde la aparición de la lesión hasta el momento del diagnóstico, es referido por el paciente.	Meses
Localización del tumor	Cualitativa Nominal	Topografía en la que se encuentra la lesión	<ul style="list-style-type: none"> • Cabeza y Cuello • Tronco • Brazos • Manos • Glúteos • Genitales • Muslos • Piernas • Piés
Tamaño del tumor	Cuantitativa Contínua	Medida del diámetro mayor de la lesión	Centímetros

▪ Variables Histopatológicas

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN
Invasividad del tumor	Cualitativa Ordinal Politómica	Penetración que presenta la proliferación, ya sea limitada a la epidermis, dermis papilar, dermis reticular o tejido subcutáneo	<ul style="list-style-type: none"> • Clark I • Clark II • Clark III • Clark IV • Clark V
Profundidad del tumor	Cualitativa Ordinal Politómica	Medida en milímetros a través de un micrómetro ocular, a partir del estrato granuloso intacto hasta lo más profundo de compromiso tumoral	<ul style="list-style-type: none"> • Nivel de Breslow en mm.
Ulceración del tumor	Cualitativa Dicotómica Ordinal	Pérdida de sustancia del tejido	<ul style="list-style-type: none"> • Positivo • Negativo
Mitosis	Cuantitativa continua	Proceso de reproducción de una célula.	<ul style="list-style-type: none"> • Numérica
Expresión del VEGF	Cuantitativa Continua	Porcentaje de expresión del factor de crecimiento endotelial vascular mediante la técnica de inmunoperoxidasa	<ul style="list-style-type: none"> • Leve: 0-30% • Moderada: 31-60% • Alta: >60%
Expresión del Ki-67	Cuantitativa Continua	Porcentaje de expresión de la proteína Ki-67 mediante la técnica de inmunoperoxidasa.	0-100%

PROCEDIMIENTO

1. Se realizará una búsqueda exhaustiva de las laminillas y bloques de los 48 casos registrados de melanoma maligno nodular en el Servicio de Dermatopatología en el período de enero 2010 a diciembre de 2014.
2. Se realizará la descripción de las características clínicas (Sexo, edad, tiempo de evolución, tamaño del tumor, tratamiento aplicado, seguimiento y desenlace del paciente) e histopatológicas (Invasividad del tumor, ulceración del tumor e infiltración linfo-vascular).
3. Se realizará el conteo de mitosis típicas y atípicas, considerando el “hot spot” en 2 campos de alta resolución por cada biopsia de melanoma nodular.
4. Se realizará la medición semicuantitativa de la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) mediante técnica de inmunoperoxidasa, en porcentaje celular del melanoma nodular.
5. Se realizará la medición semicuantitativa de la expresión del índice proliferativo Ki67 mediante técnica de inmunoperoxidasa, en porcentaje celular del melanoma nodular.
6. Se analizaron los datos con medidas de tendencia central (media, mediana, moda), proporciones y de dispersión (desviación estándar).
7. Se presentan los resultados en forma de tablas y gráficas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados se analizaron estadísticamente de forma descriptiva con medidas de tendencia central (media y mediana) proporciones y medidas de dispersión (desviación estándar). La correlación entre la expresión del Ki67 y las variables desenlace del paciente, invasividad, grado de atipia y pleomorfismo, y grosor histológico se realizará mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Para la captura de datos se utilizó el programa de Excel de Microsoft Office y para el análisis estadístico el programa SPSS versión 22 de IBM. Los datos se presentan en tablas y gráficas.

RECURSOS

HUMANOS

- Tesista: Dra. Kathy Guisell Chinchilla Castañeda
- Directora de tesis: Dra. Patricia Mercadillo Pérez

MATERIALES

- Fuente de inclusión de participantes:
 - Base de datos del expediente del Servicio de Dermatología y de Oncología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.
- Microscopio Axiophot-2 Karl Zeiss.
- Computadora laptop HP g4-1066la
- Programa de Excel de Microsoft Office y programa SPSS versión 22 de IBM.

FINANCIEROS

- El costo de la realización de la inmunohistoquímica se cubrirá mediante los recursos del Servicio de Dermatopatología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga”.

DIFUSIÓN

El presente protocolo de tesis se realizó para la obtención de postgrado en Dermatopatología. Se pretende su difusión en congresos nacionales e internacionales, así como su publicación.

ASPECTOS ÉTICOS

Esta investigación está catalogada como sin riesgo, según el Artículo 17 del reglamento, en el Capítulo I del Título Segundo del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Por lo que no se realizó consentimiento informado.

RESULTADOS

GENERALIDADES

El presente estudio se realizó en el periodo comprendido del 1° de enero del 2010 al 31 de diciembre del 2014.

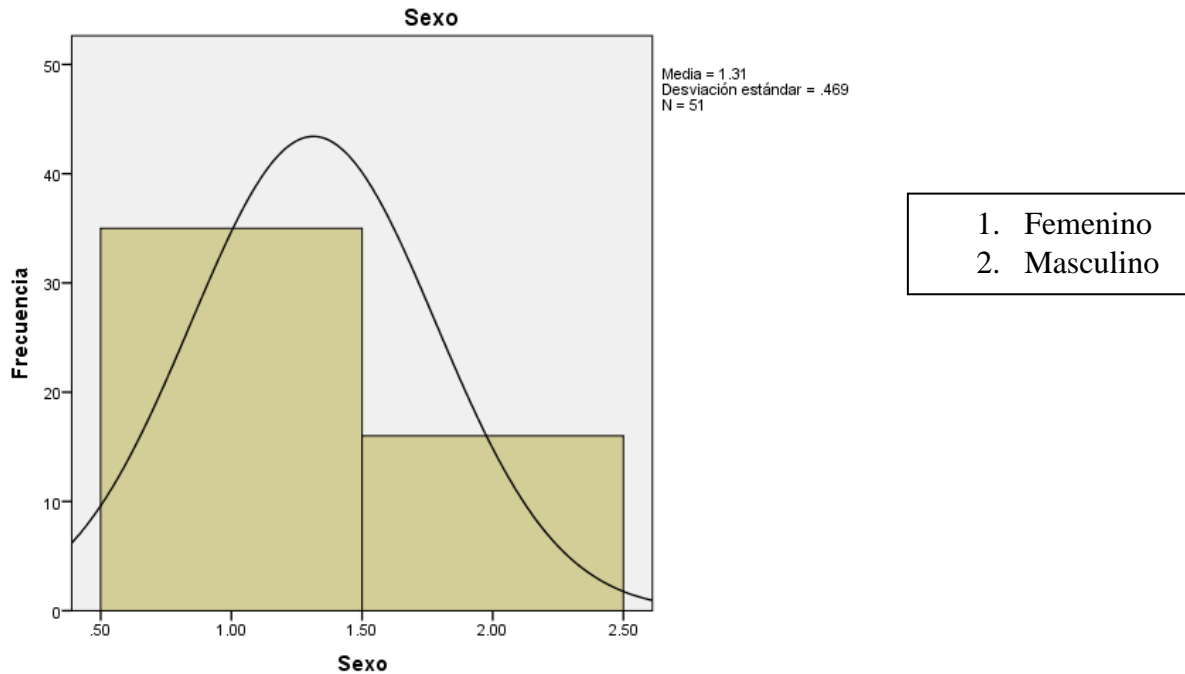
En el servicio de Dermatopatología del Hospital General de México “Eduardo Liceaga” se recibieron un total de 11,292 biopsias, de las cuales 157 se reportaron como melanoma maligno en todas sus variedades, lo que corresponde al 1.39% del total de biopsias recibidas. De ellos, 53 casos correspondían a melanoma maligno nodular, 33.76% del total de melanomas malignos.

El total de pacientes incluidos en el estudio fueron 51 ya que no se contaba con dos de los bloques de parafina de las biopsias, pues fueron retirados por los pacientes.

De los 51 pacientes 35 (68.6%) correspondían al sexo femenino y 16 (31.4%) al sexo masculino, como se muestra en la tabla y gráfica N°1.

Sexo		
	Frecuencia	Porcentaje
femenino	35	68.6
masculino	16	31.4
Total	51	100.0

Tabla N°1. Distribución por género.



Gráfica N°1. Distribución de frecuencia por género.

El rango de edad de presentación fue de 21 a 89 años y la edad media al momento del diagnóstico de 62 años y una mediana de 66 años.

En el rango de 15 a 25 años de edad se encontraba 1 paciente (1.96%).

En el rango de 26 a 35 años de edad se encontraban 0 pacientes (0.0%).

En el rango de 36 a 45 años de edad se encontraban 9 pacientes (17.65%).

En el rango de 46 a 55 años de edad se encontraban 8 pacientes (15.69%).

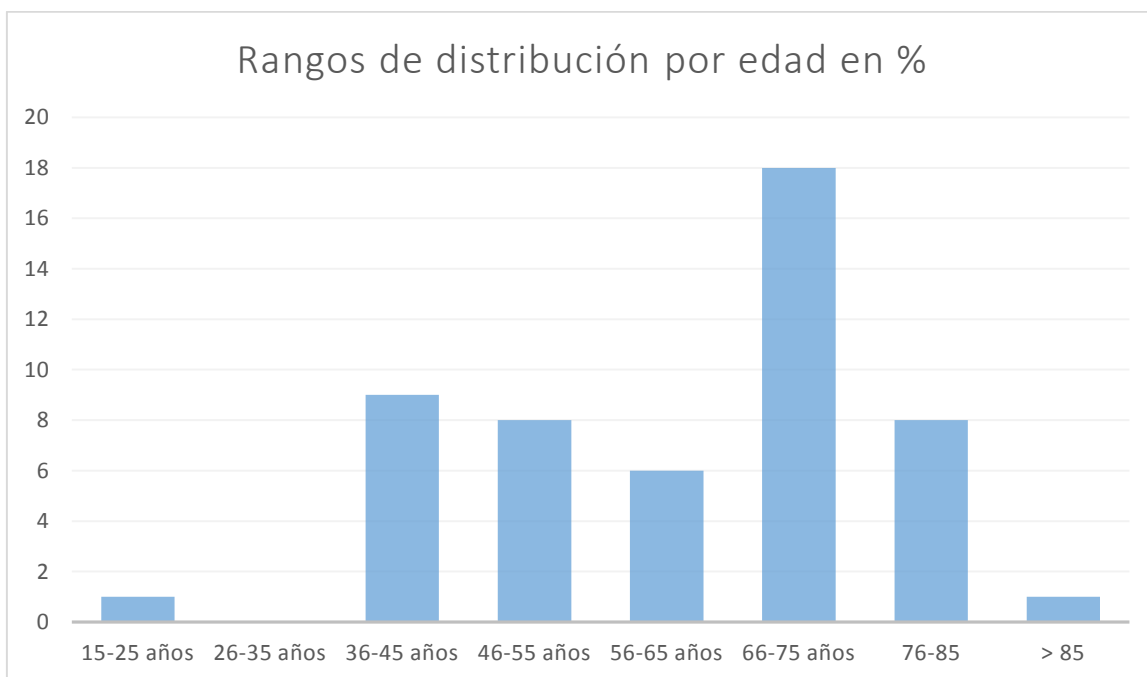
En el rango de 56 a 65 años de edad se encontraban 6 pacientes (11.76%).

En el rango de 66 a 75 años de edad se encontraban 18 pacientes (35.29%).

En el rango de 76 a 85 años de edad se encontraban 8 pacientes (15.69%).

En el rango de 85-95 años de edad se encontraba 1 paciente (1.96%).

Como se muestra en la gráfica N°2.



Gráfica N°2. Distribución de las edades de presentación al momento del diagnóstico.

En cuanto a la topografía de las lesiones la mayor parte de ellas, tanto en el sexo masculino como en el sexo femenino se localizaban en piés siendo 20 lesiones (39.2%), seguidas por las lesiones que afectaban cabeza y cuello con 10 lesiones (19.6%), en manos se encontraron 6 lesiones (11.8%), así mismo en brazos 6 lesiones (11.8%), en tronco 3 lesiones (5.9%), en piernas 3 lesiones (5.9%), en muslos se encontraron 2 lesiones (3.9%) y en glúteos 1 lesión (2%).

Como se muestra en la tabla N°2, tabla N°3 y en la gráfica N°3.

Topografía

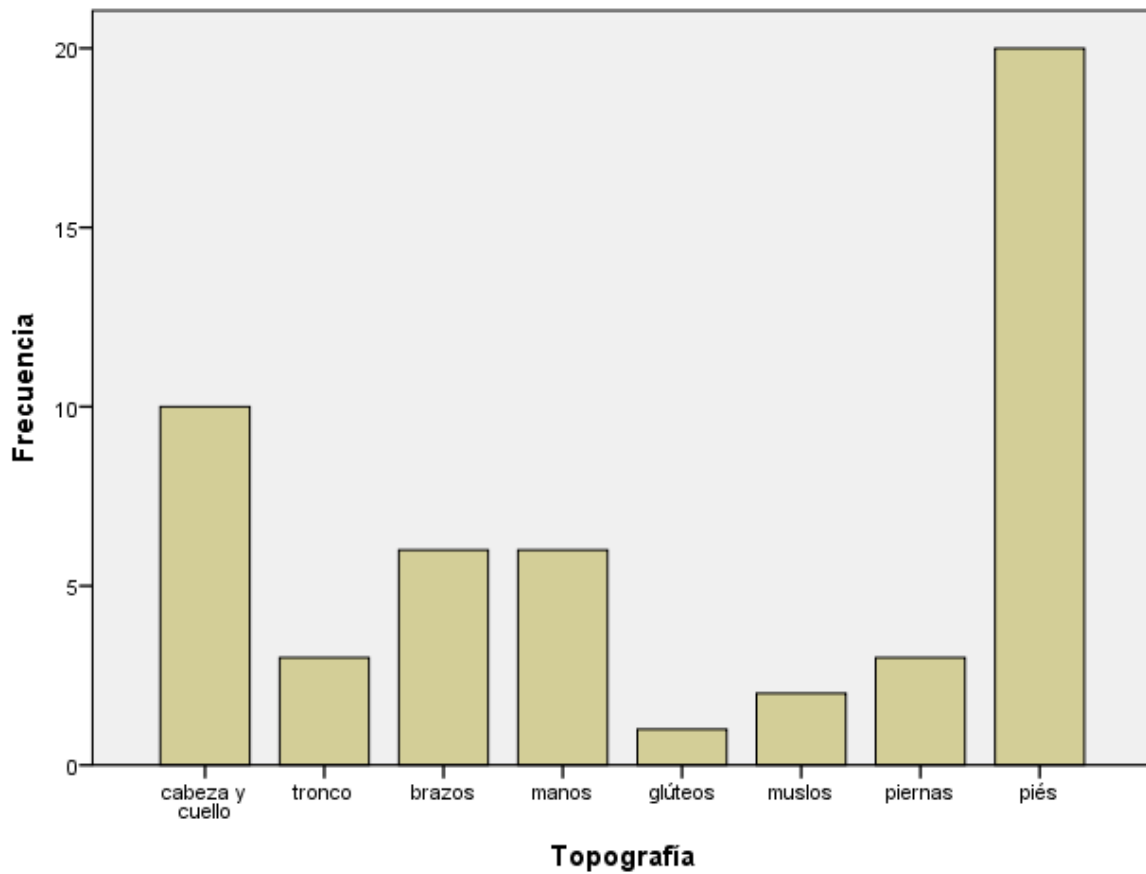
	Frecuencia	Porcentaje
cabeza y cuello	10	19.6
tronco	3	5.9
brazos	6	11.8
manos	6	11.8
glúteos	1	2.0
muslos	2	3.9
piernas	3	5.9
piés	20	39.2
Total	51	100.0

Tabla N°2. Distribución de las lesiones de acuerdo a la topografía.

	Topografía								Total
	cabeza y cuello	tronco	brazos	manos	glúteos	muslos	piernas	piés	
Sexo femenino	6	1	6	5	1	1	3	12	35
masculino	4	2	0	1	0	1	0	8	16
Total	10	3	6	6	1	2	3	20	51

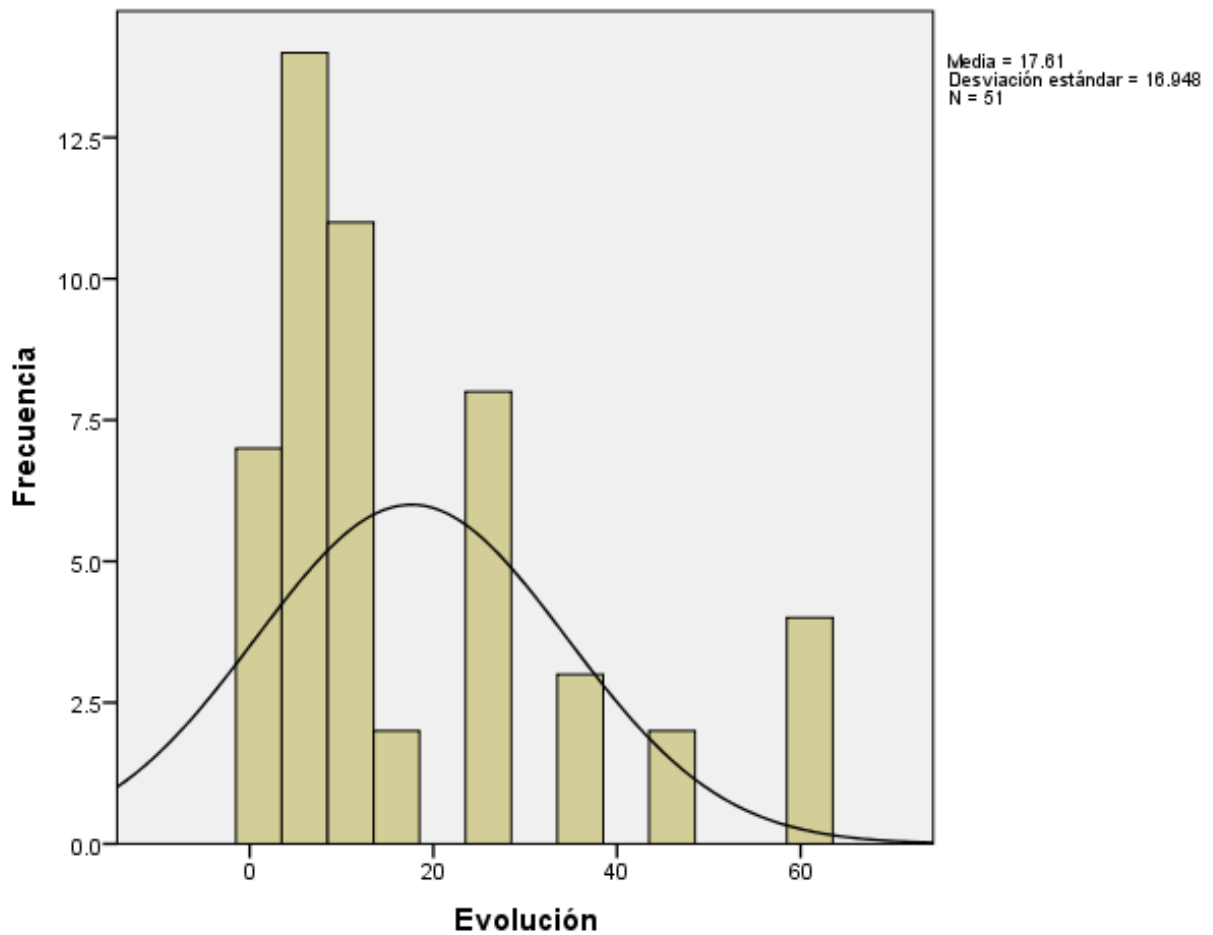
Topografía

Tabla N°3. Distribución de las lesiones de acuerdo al género.



Gráfica N°3. Distribución topográfica de las lesiones diagnosticadas como melanoma nodular.

Con respecto a la evolución referida en la historia clínica, reportada en meses. La evolución mínima fue de 1 mes, la máxima de 60 meses con una media de 17.6 meses al momento de diagnóstico de melanoma nodular. Como lo muestra la gráfica N°4.



Gráfica N° 4. Representación de la evolución del melanoma maligno nodular al momento del diagnóstico.

En relación al tamaño de las lesiones reportadas, la lesión de menor tamaño fue de 0.5 cm y la de mayor de 8 cm. Cabe mencionar que esta lesión de 8cm se localizaba en mano. Se encontró una media del tamaño de las lesiones de 2.76 cm, como lo muestran la tabla N°4 y la gráfica N° 5.

Tamaño de lesión

	Frecuencia	Porcentaje
.50	1	2.0
1.00	5	9.8
1.20	3	5.9
1.30	2	3.9
1.40	1	2.0
1.50	4	7.8
1.80	1	2.0
2.00	7	13.7
2.20	1	2.0
2.30	2	3.9
2.50	3	5.9
2.80	1	2.0
3.00	5	9.8
3.10	1	2.0
3.60	1	2.0
4.00	4	7.8
5.00	4	7.8
5.30	1	2.0
6.00	3	5.9
8.00	1	2.0
Total	51	100.0

Tabla N°4. Tamaño en centímetros, reportados en la historia clínica de las lesiones diagnosticadas como melanoma nodular.

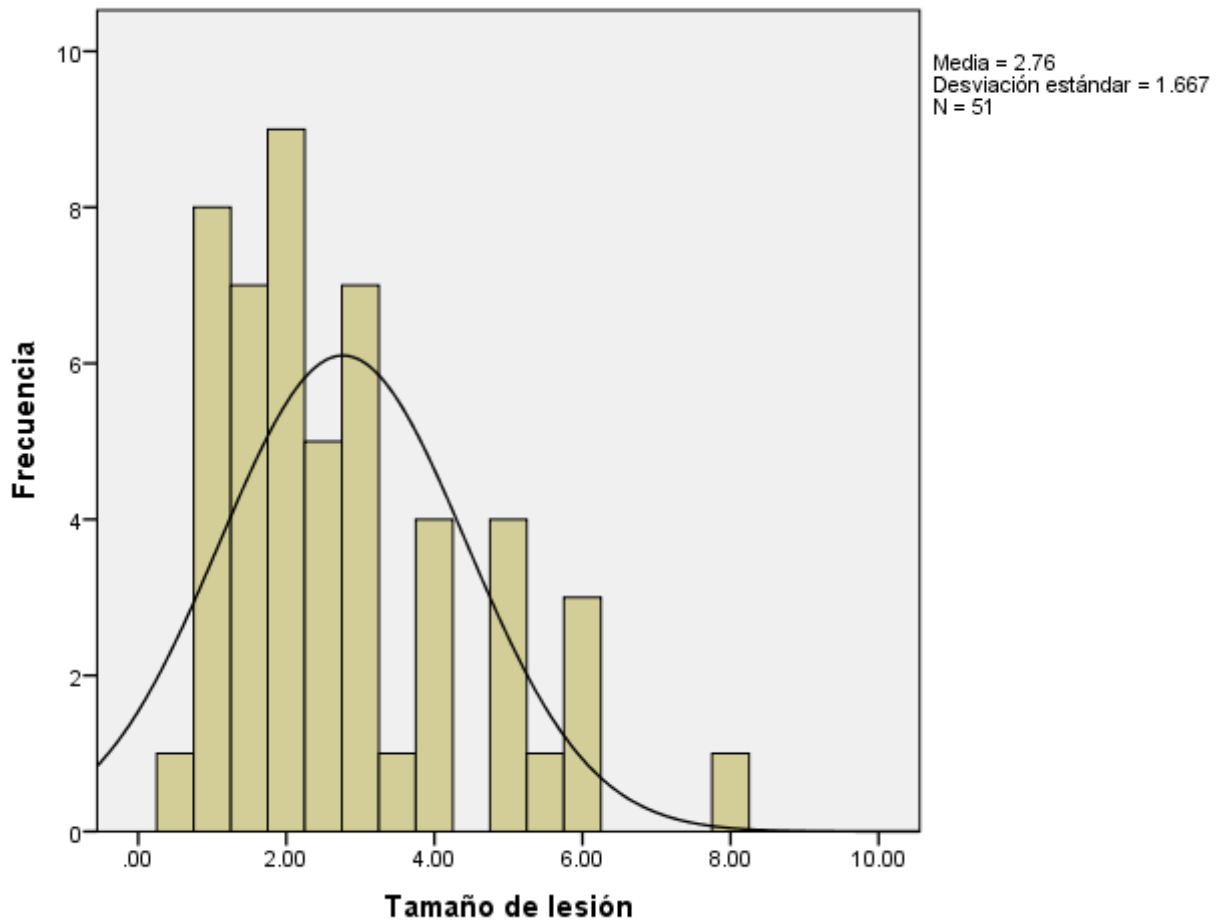


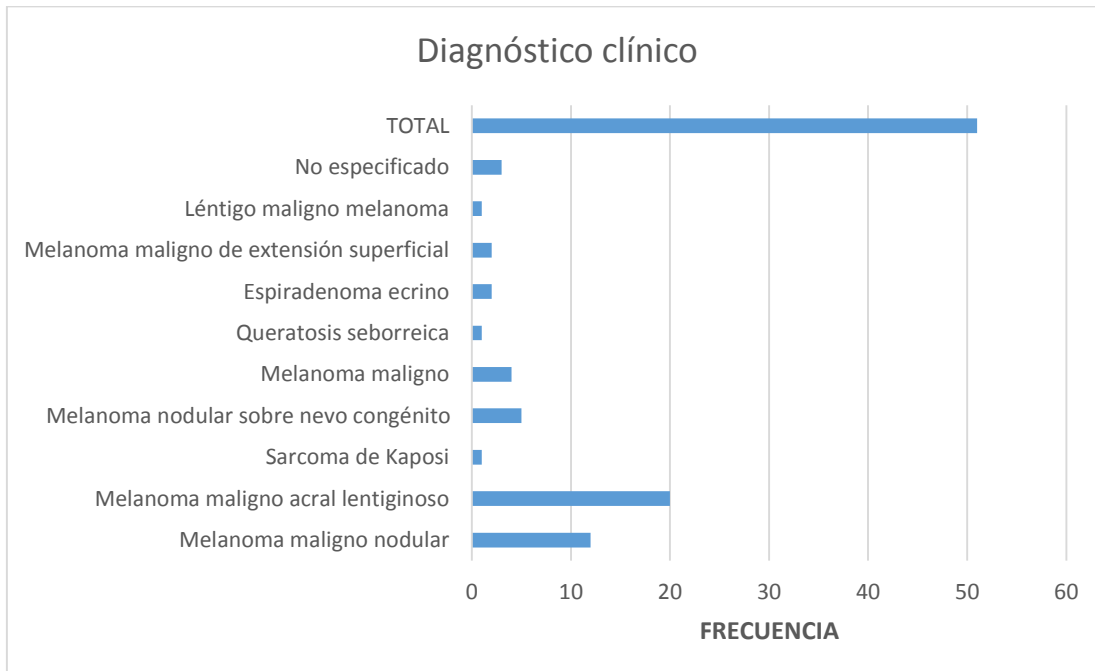
Gráfico N°5. Representación del tamaño de la lesión, descrito en centímetros en la historia clínica al momento del diagnóstico de melanoma nodular maligno.

De los 51 casos estudiados, 48 casos (94.1%) fueron enviados con diagnóstico clínico y 3 casos (5.9%) sin diagnóstico. Se encontró que el diagnóstico clínico más frecuente fue melanoma maligno acral lentiginoso con 20 casos (39.2%), seguido por orden de frecuencia Melanoma maligno nodular con 12 casos (23.5%), melanoma nodular sobre nevo congénito 5 casos (9.8%), melanoma maligno 4 casos (7.8%), Espiradenoma ecrino 2 casos (3.9%), melanoma maligno de extensión superficial 2 casos (3.9%), sarcoma de Kaposi 1 caso (1.9%), Queratosis seborreica 1 caso (1.9%) y lentigo maligno melanoma 1 caso (1.9%), como se muestra en la tabla N°5 y gráfica N°6

Diagnóstico clínico

	Frecuencia	Porcentaje %
Melanoma maligno nodular	12	23.53
Melanoma maligno acral lentiginoso	20	39.22
Sarcoma de Kaposi	1	1.96
Melanoma nodular sobre nevo congénito	5	9.80
Melanoma maligno	4	7.84
Queratosis seborreica	1	1.96
Espiradenoma ecrino	2	3.92
Melanoma maligno de extensión superficial	2	3.92
Léntigo maligno melanoma	1	1.96
No especificado	3	5.88
TOTAL	51	100

Tabla N°5. Diagnóstico clínico de las lesiones reportadas como melanoma maligno nodular.



Gráfica N° 6. Representación esquemática de los diagnósticos clínicos con los que fueron enviadas las lesiones reportadas histopatológicamente como melanoma maligno nodular.

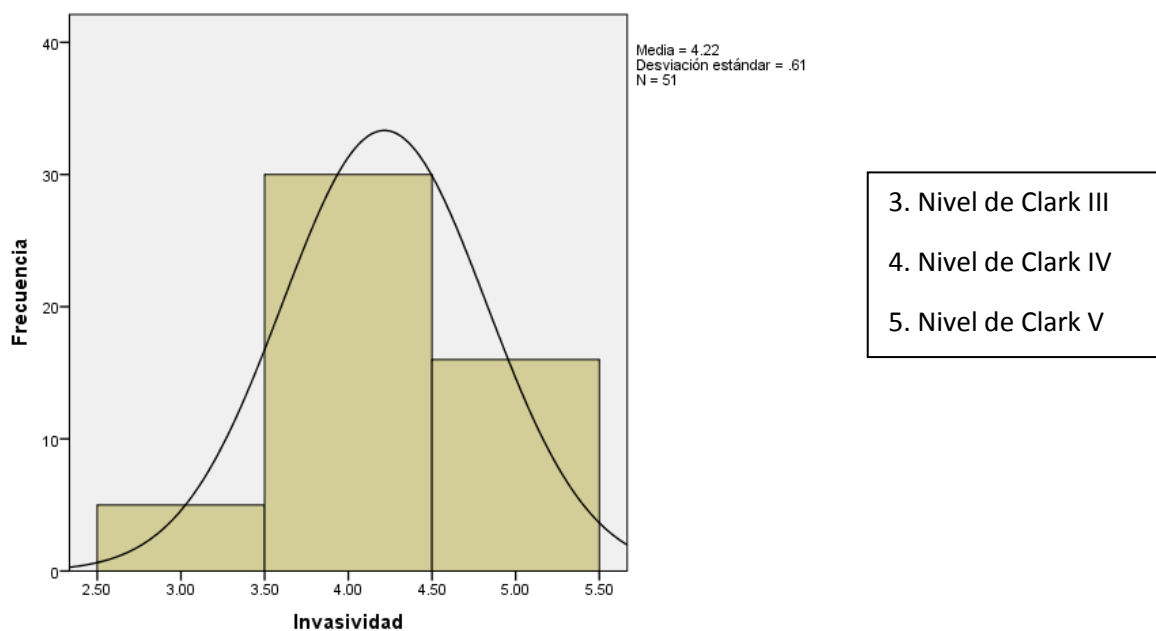
Datos histopatológicos

En cuanto a la invasividad del melanoma maligno nodular; dada por el nivel de Clark, dentro de los casos estudiados no se encontró ninguno que se encontrara dentro del nivel de Clark I o II. Se encontró que la mayoría de ellos presentaban un nivel de Clark IV con 30 casos (58.8%), seguido por el nivel de Clark V con 16 casos (31.4%) y el nivel Clark III 5 casos (9.8%). Como se describe en la tabla N°6 y la gráfica N°7.

Invasividad

	Frecuencia	Porcentaje %
Clark I	0	0
Clark II	0	0
Clark III	5	9.8
Clark IV	30	58.8
Clark V	16	31.4
Total	51	100

Tabla N°6. Niveles de Clark reportados en los casos reportados como melanoma maligno nodular.



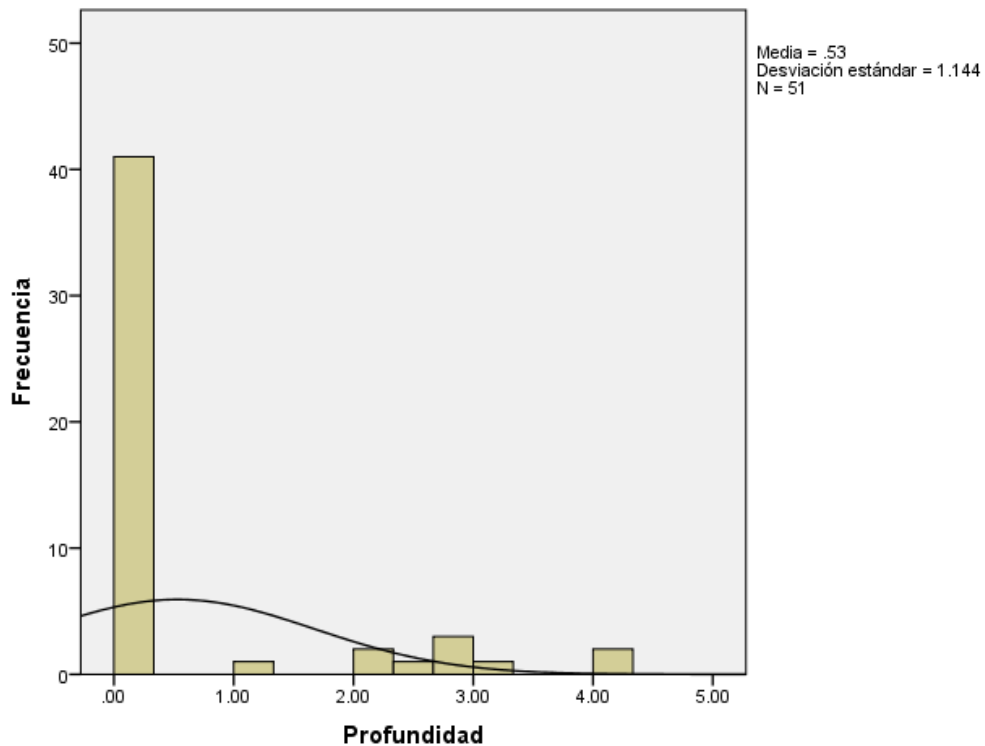
Gráfica N°7. Representación esquemática del Nivel de Clark de los casos reportados como melanoma maligno nodular.

En los casos estudiados de melanoma maligno nodular el nivel de Breslow fue valorable en 10 casos (20%). En el resto de las 41 lesiones (80%) no fue valorable este parámetro. El caso con el mínimo nivel obtenido fue de 1.2 mm en 1 caso (2.0%) y el máximo se encontró en 2 casos (3.9%) y fue de 4.0 mm. Estos datos se describen en la tabla N°7 y la gráfica N°8.

Profundidad

	Frecuencia	Porcentaje %
No valorable	41	80.4
1.20	1	2.0
2.00	1	2.0
2.25	1	2.0
2.40	1	2.0
2.70	3	5.9
3.10	1	2.0
4.00	2	3.9
Total	51	100

Tabla N°7. Nivel de Breslow (mm) reportado en los casos de melanoma maligno nodular.



Gráfica N°8. Representación esquemática de la profundidad a través del nivel de Breslow (mm) encontrado en los casos reportados como melanoma maligno nodular.

Se reportó ulceración en 32 casos (62.7%). No se encontraron ulcerados 19 casos (37.3%). Estos datos se detallan en la tabla N°8 y la gráfica N°9.

Ulceración

	Frecuencia	Porcentaje
si	32	62.7
no	19	37.3
Total	51	100.0

Tabla N°8. Ulceración reportada en los casos de melanoma maligno nodular.

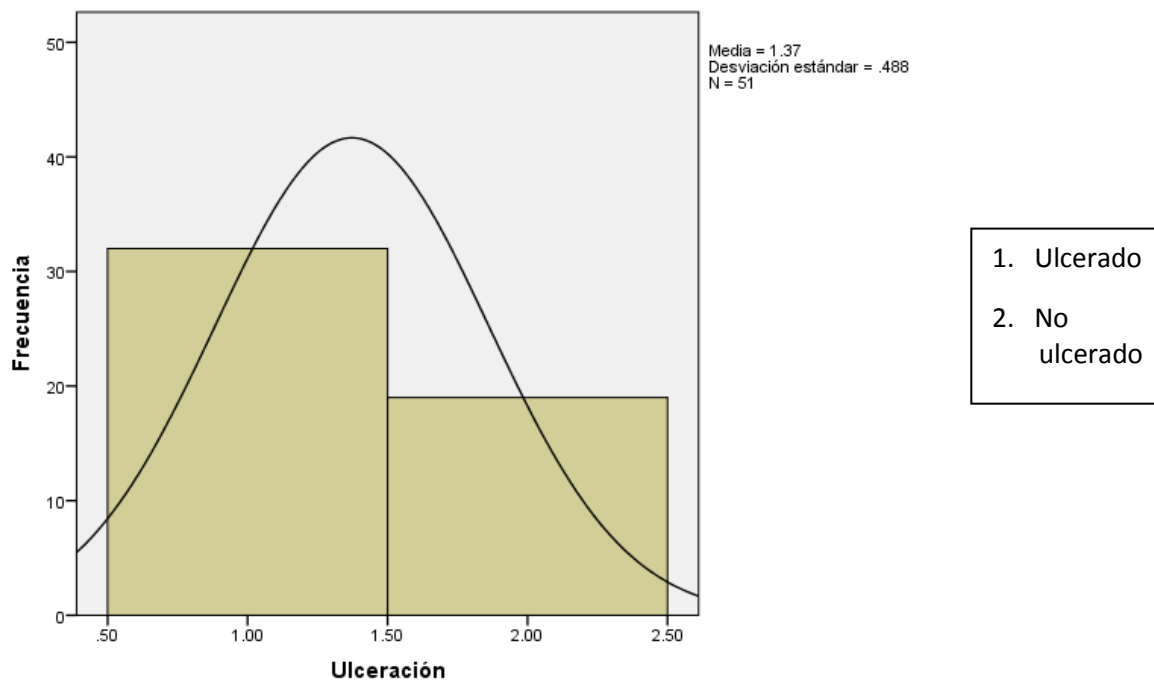
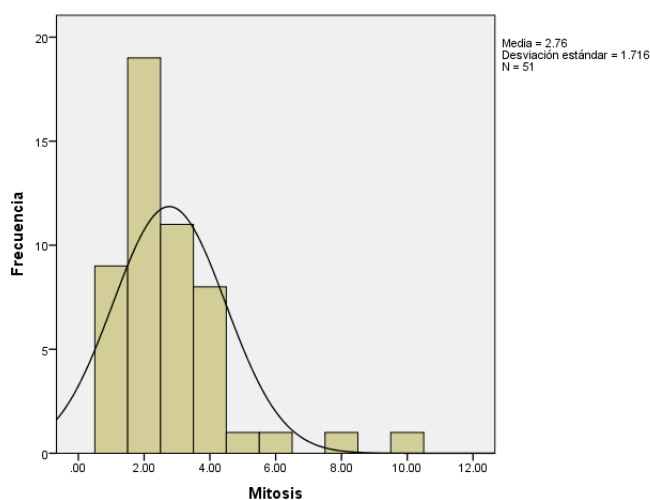


Gráfico N°9. Representación esquemática de ulceración en los casos de melanoma maligno nodular.

En cuanto a las mitosis típicas o atípicas reportadas por campo de alta resolución (40x) en los cortes de los casos de melanoma maligno nodular, encontramos que el mínimo encontrado fue de 1 mitosis por campo de alta resolución en 9 casos (17.6%) y el máximo fue de 10 mitosis por campo de alta resolución en 1 caso (2.0%), con una media de 2.76 mitosis por campo de alta resolución. Datos descritos en tabla N°9 y gráfica N°10.

Mitosis		
	Frecuencia	Porcentaje
1.00	9	17.6
2.00	19	37.3
3.00	11	21.6
4.00	8	15.7
5.00	1	2.0
6.00	1	2.0
8.00	1	2.0
10.00	1	2.0
Total	51	100.0

Tabla N°9. Número de mitosis encontradas por campo de alta resolución en los casos reportados de melanoma maligno nodular.



Gráfica N°10. Representación de número de mitosis encontradas por campo de alta resolución.

En cuanto a la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés de *Vascular Endothelial Growth Factor*), se encontró una mínima expresión de 10% en 1 caso (2.0%) y una máxima expresión 100% en 3 casos (5.9%). Se estratificaron los resultados en leve expresión (0-30%) de la cual se reportaron 9 casos (17.6%), expresión moderada (31-60%) con 19 casos (37.3%) y alta expresión (>60%) de la cual se reportaron 23 casos (45.1%). La media de expresión fue de 61.6%. Datos detallados en la tabla N°10, tabla N°11 y gráfica N°11.

Expresión de VEGF

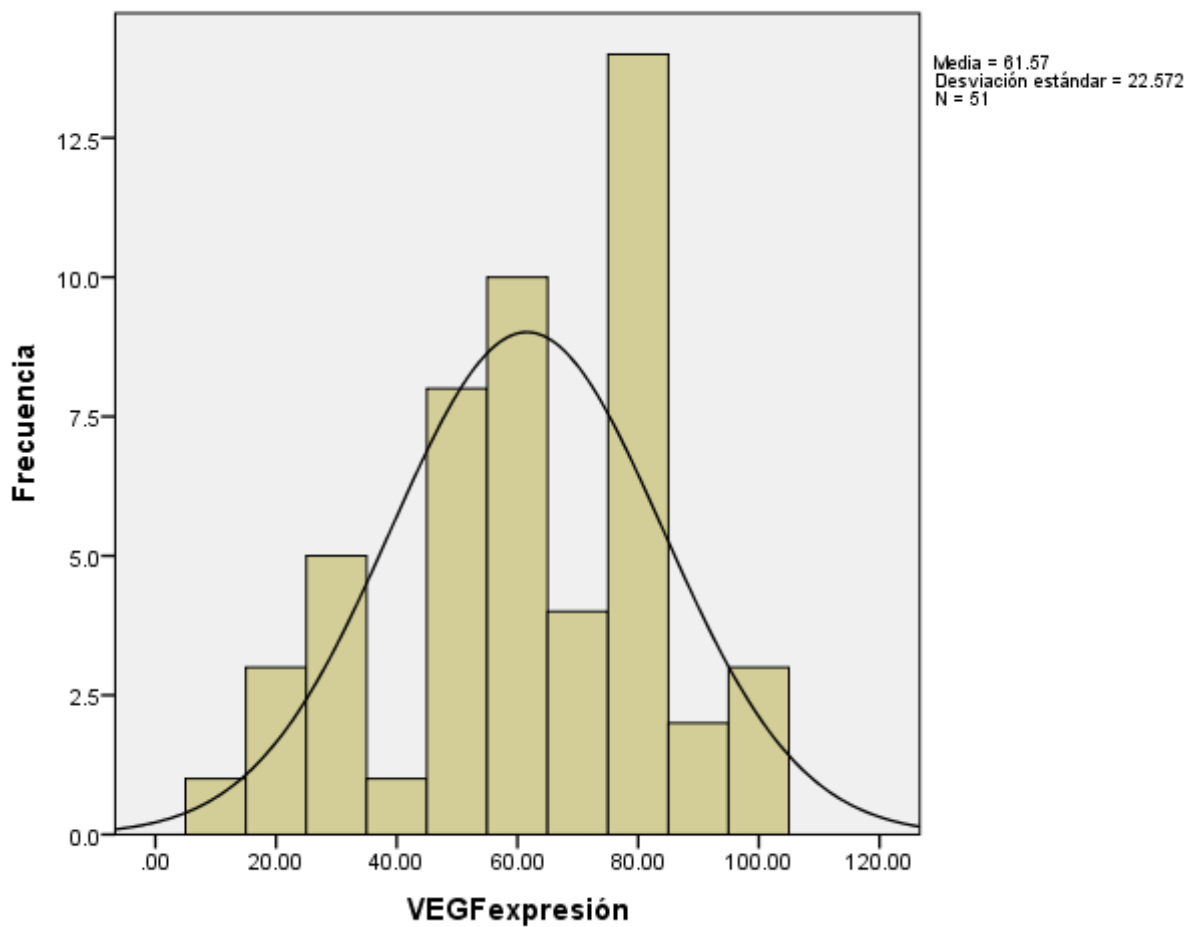
% de expresión	Frecuencia	Porcentaje de casos
10.00	1	2.0
20.00	3	5.9
30.00	5	9.8
40.00	1	2.0
50.00	8	15.7
60.00	10	19.6
70.00	4	7.8
80.00	14	27.5
90.00	2	3.9
100.00	3	5.9
Total	51	100.0

Tabla N°10. Frecuencia detallada del porcentaje del VEGF expresado en el melanoma maligno nodular.

Nivel de expresión

Nivel de expresión	Frecuencia de casos	Porcentaje de casos
Leve expresión	9	17.6
Moderada expresión	19	37.3
Alta expresión	23	45.1
Total	51	100.0

Tabla N°11. Niveles de expresión del VEGF en los casos de melanoma maligno nodular.



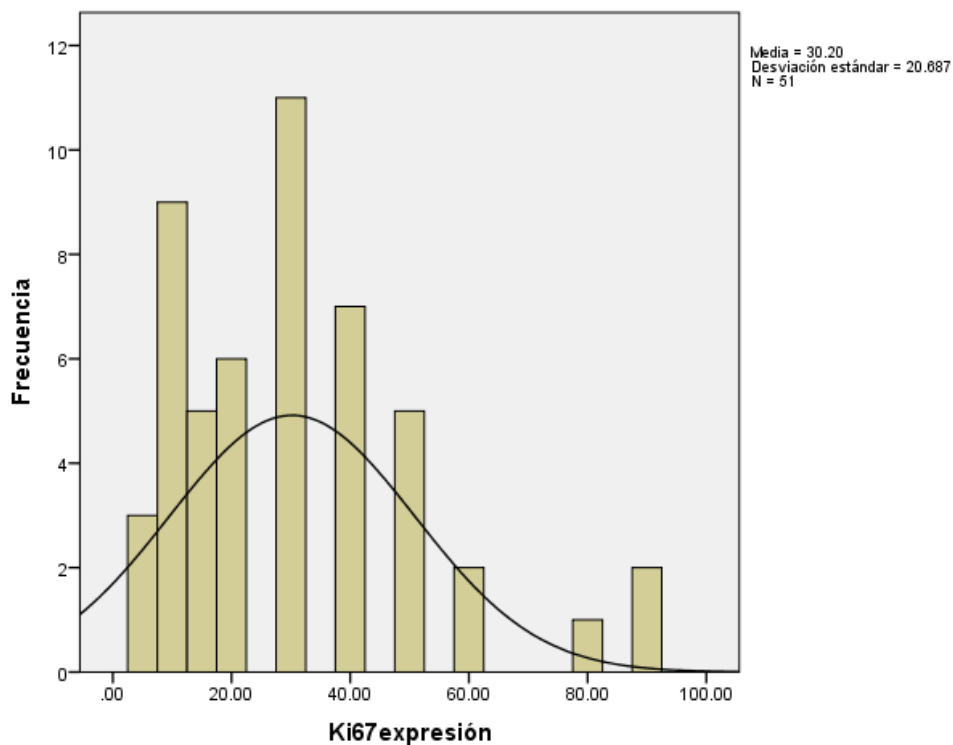
Gráfica N°11. Representación del porcentaje de expresión del VEGF en los casos reportados de melanoma maligno nodular.

Con respecto al índice proliferativo Ki67, se encontró una mínima expresión de 5% en 3 casos (5.9%) y una máxima de 90% en 2 casos (3.9%). Cabe mencionar que ambos casos con máxima expresión eran melanomas malignos que surgieron sobre Nevos melanocíticos congénitos. La media de expresión fue de 30.2%. Datos detallados en tabla N°12 y gráfica N°12.

Expresión de Ki67

Porcentaje de expresión	Frecuencia	Porcentaje de casos
5.00	3	5.9
10.00	9	17.6
15.00	5	9.8
20.00	6	11.8
30.00	11	21.6
40.00	7	13.7
50.00	5	9.8
60.00	2	3.9
80.00	1	2.0
90.00	2	3.9
Total	51	100.0

Tabla N°12. Porcentajes de expresión del índice proliferativo Ki67 en los casos reportados de melanoma maligno nodular.



Gráfica N°12. Representación de los diferentes porcentajes de expresión del Ki67.

Correlaciones

Al realizar por medio del método estadístico de Pearson la correlación entre la expresión total de VEGF y Ki67 para comparar el índice de reproducción celular con la posibilidad de crecimiento a través de vías que generen angiogénesis (VEGF), la significancia estadística bilateral demostró una $P < 0.006$.

Correlaciones			
		expresión VEGF	expresión Ki67
Expresión VEGF	Correlación de Pearson	1	.378**
	Sig. (bilateral)		.006
	N	51	51
Expresión Ki67	Correlación de Pearson	.378**	1
	Sig. (bilateral)	.006	
	N	51	51

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Mediante el método estadístico de Pearson la correlación entre la expresión total de Ki67 y el número de mitosis por campo de alta resolución para comparar el índice de reproducción celular con el número efectivo de figuras mitóticas en sus diferentes fases, la significancia estadística bilateral demostró una $P < 0.00000$.

		Mitosis	Expresión Ki67
Mitosis	Correlación de Pearson	1	.523**
	Sig. (bilateral)		.000
	N	51	51
Ki67expresión	Correlación de Pearson	.523**	1
	Sig. (bilateral)	.000	
	N	51	51

** . La correlación es significativa en el nivel 0,01 (2 colas).

Mediante el método estadístico de Pearson la correlación entre la expresión total de VEGF y la invasividad de acuerdo al nivel de Clark, para correlacionar ambos parámetros, la significancia estadística bilateral demostró una $P < 0.665$.

Correlaciones

		Invasividad	VEGFexpresión
Invasividad	Correlación de Pearson	1	.062
	Sig. (bilateral)		.665
	N	51	51
VEGFexpresión	Correlación de Pearson	.062	1
	Sig. (bilateral)	.665	
	N	51	51

Mediante el método estadístico de Pearson la correlación entre la expresión total de VEGF y el tamaño de las lesiones, para correlacionar ambos parámetros, la significancia estadística bilateral demostró una $P < 0.759$.

		Tamaño	VEGFexpresión
Tamaño	Correlación de Pearson	1	.044
	Sig. (bilateral)		.759
	N	51	51
VEGFexpresión	Correlación de Pearson	.044	1
	Sig. (bilateral)	.759	
	N	51	51

Al realizar análisis multivariado a través de ANOVA, comparando como variable independiente la expresión del VEGF y como variable dependiente la expresión de Ki67, la regresión lineal demostró una $P < 0.006$.

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	3063.655	1	3063.655	8.188	.006 ^b
	Residuo	18334.385	49	374.171		
	Total	21398.039	50			

a. Variable dependiente: Ki67expresión

b. Predictores: (Constante), VEGFexpresión

Mediante el análisis multivariado ANOVA, comparando como variable independiente la cantidad de mitosis por campo de alta resolución y como variable dependiente la expresión de Ki67, la regresión lineal demostró una $P < 0.000$.

ANOVA^a

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	5843.213	1	5843.213	18.407	.000 ^b
	Residuo	15554.826	49	317.445		
	Total	21398.039	50			

a. Variable dependiente: Ki67expresión

b. Predictores: (Constante), Mitosis

DISCUSIÓN

En el servicio de Dermatopatología del Hospital General de México “Eduardo Liceaga” se recibieron un total de 11,292 biopsias, de las cuales 157 se reportaron como melanoma maligno en todas sus variedades, lo que corresponde al 1.39% del total de biopsias recibidas. De ellos, 53 casos correspondían a melanoma maligno nodular, 33.76% del total de melanomas malignos, lo cual difiere de algunas series mexicanas ya que en estas, se reporta una incidencia de 17% para melanoma nodular.³

Se estudiaron 51 casos de melanoma maligno nodular. Encontramos que esta entidad se presentó con mayor frecuencia en el sexo femenino con 68.6% contra un 31.4% en el sexo masculino. Obteniendo una relación mujer: hombre de 2.1:1, lo cual concuerda con la bibliografía nacional en la cual ha sido reportada una relación de 2.1:1.³ Esta relación muestra una mayor proporción en comparación a los datos internacionales reportados por el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos de América (NCI por sus siglas en inglés), quien reporta una relación mujer: hombre hispánicos de 1:1.⁴ Egger y cols (2012), encontraron en su estudio que el melanoma nodular era más frecuente en hombres (59.6%) lo cual también muestran una diferencia significativa en relación a nuestro estudio.

La principal edad de presentación fue en los adultos mayores ya que la media de edad al momento del diagnóstico fue de 62 años, con una mediana de 66 años lo cual concuerda con lo reportado por la literatura internacional, en la que se reporta una mediana de edad al momento de diagnóstico de 63 años.⁵ Los pacientes en el rango de edad entre 66 y 75 años constituyeron el 35.29% del total de los sujetos. Este dato difiere con lo publicado en la literatura mundial en donde el rango de edad de mayor presentación es de 55-64 años (22.1%).⁵ Sin embargo, encontramos que los sujetos entre las edades de 60 a 80 años comprendían el 50.98% de los casos, lo cual es una incidencia alta y similar a lo reportado en la literatura nacional, que reporta un 43% de incidencia en este grupo de edad.³

En el rango de 36 a 45 años de edad se encontraron 9 pacientes, lo que representa un 17.65% del total de la muestra. Lo cual es más alto que en las series reportadas por el NCI para este grupo de edad en las que se ha encontrado un 8.9% y es similar a lo encontrado en las series mexicanas donde se ha registrado 14%.^{5,3} Sin embargo, este dato se encuentra muy por debajo de lo señalado en Australia, donde el melanoma maligno es la principal causa de cáncer en pacientes de 15 a 44 años.³⁵

En cuanto a la topografía, La localización más frecuente encontrada en las mujeres fue la extremidad inferior en un 31.4% de los casos así como en los hombres con un 17.6%. Esto coincide con las series mexicanas reportadas anteriormente, en las cuales la localización más frecuente para ambos sexos fue la extremidad inferior.³ Estos datos coinciden con la literatura internacional con respecto al sexo femenino sin embargo en el caso del sexo masculino difieren, ya que la localización anatómica más frecuentemente reportada es el tronco.³⁵

Con respecto a la evolución referida en la historia clínica, reportada en meses. La evolución mínima fue de 1 mes, la máxima de 60 meses con una media de 17.6 meses y una mediana de 12 meses al momento de diagnóstico de melanoma maligno nodular. Este dato concuerda con la literatura nacional reportada, en la cual la media de edad fue de 18 meses al momento del diagnóstico y la mediana de 13 meses.³⁶

En relación al tamaño de las lesiones reportadas, la lesión de menor tamaño fue de 0.5 cm y la de mayor de 8 cm con una media de 2.76 cm. Ruiz y cols. (1998) en su estudio sobre datos epidemiológicos del melanoma maligno en México, reportaron datos similares encontrados en nuestro estudio, en relación al tamaño de las lesiones. Ellos encontraron lesiones entre los límites de 0.5 a 15 cm con una media de 3.5 cm al momento del diagnóstico.³⁶

De los 51 casos estudiados, El 94.1% fueron enviados con diagnóstico clínico y el 5.9%% sin diagnóstico. Se encontró que el diagnóstico clínico más frecuente fue melanoma maligno acral lentiginoso con un 39.2%, esto podría explicarse debido a que la localización más frecuente de las lesiones fue en la extremidad inferior sobretodo en piés, a pesar de tratarse de melanoma maligno nodular.

En nuestro estudio, la invasividad fue evaluada a través del nivel de Clark. De los casos estudiados no se encontró ninguno que se encontrara dentro del nivel de Clark I o II. Se encontró que la mayoría de ellos presentaban un nivel de Clark IV con 30 casos (58.8%), seguido por el nivel de Clark V con 16 casos (31.4%) y el nivel Clark III 5 casos (9.8%). Datos que difieren con lo reportado en series nacionales, en las cuales el nivel de Clark prevalente fue el tipo I con 32.7%.³ Es importante recalcar que en nuestro estudio solo se reportan los melanomas nodulares; cuyo crecimiento vertical influye en esta medida, mientras que en otras series nacionales se han tomado en cuenta todas las variedades histopatológicas del melanoma. Así mismo, Ruiz y cols (1998) encontraron que un 71.8% de los melanomas malignos en su estudio pertenecían a los niveles de Clark IV y V, lo que muestra un menor porcentaje a lo encontrado en nuestro estudio, ya que el 90.2% de los casos estudiados se encontraron en estos niveles. En cuanto a series a nivel internacional, estudios realizados en melanomas nodulares (Egger y cols 2012) reportan que el 79.9% presentan un nivel de Clark IV al momento de diagnóstico, lo cual se correlaciona con los datos encontrados en nuestro estudio, a pesar de ser un dato más alto que nuestra cifra.

Con respecto a la profundidad del melanoma nodular, se logró obtener el nivel de Breslow en el 20% de los casos, debido a que la medición de este parámetro no es válida cuando los tumores se encuentran ulcerados o cuando la muestra es insuficiente. El mínimo nivel obtenido fue de 1.2 mm y el máximo se encontró en 2 casos fue de 4.0 mm. El nivel de Breslow más frecuente fue de 2.7 mm, lo cual es más profundo en comparación a lo reportado en la literatura mexicana donde el nivel más frecuente encontrado es de <0.76 mm.³ tomando en cuenta que estos

últimos reportes se han realizado en base a las características histopatológicas de todas las variedades de melanoma maligno y no particularmente en el de variedad nodular. A nivel internacional, Egger y cols (2012), en su estudio realizado en más de 700 melanomas nodulares encontraron que la mayoría de estos, presentaban un nivel de Breslow de 2.3mm, dato similar al reportado en nuestro estudio.¹⁵

En nuestro estudio encontramos ulceración en el 62.7% del total de casos estudiados, lo cual es una cifra más elevada a la reportada en la literatura internacional en donde se reporta que el 42.8% de los melanomas nodulares presentan este parámetro.¹⁵ Así mismo, este dato difiere de lo reportado en México, donde se ha encontrado ulceración en el 21.8% de los casos de melanoma maligno estudiados.³

En cuanto a las mitosis típicas o atípicas reportadas por campo de alta resolución 40x, encontramos que el mínimo encontrado fue de 1 mitosis por campo de alta resolución en el 17.6% de los casos y el máximo fue de 10 mitosis por campo de alta resolución en el 2.0%, con una media de 2.76 mitosis por campo de alta resolución y una mediana de 2 mitosis por campo. El 82.4% de nuestros casos presentaban más de una mitosis por campo de alta resolución, lo que representa una cifra más alta que las reportadas en la literatura internacional en la que se reportan melanomas con más de una mitosis, en 71.2% del total de casos estudiados.³⁷ En contraste, en un estudio realizado por Ladstein y cols (2010) se encontró una mediana de 6 mitosis por campo de alta resolución en melanomas nodulares, lo cual es una cifra más elevada que la encontrada en nuestro estudio.

En cuanto a la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés de *Vascular Endothelial Growth Factor*), el 100% de los casos expresaron algún porcentaje ya sea en patrón nuclear o intracitoplásmico. Se encontró una mínima expresión de 10% en el 2.0% de los casos y una máxima expresión 100% en el 5.9% de los casos. Se estratificaron los resultados en expresión leve (0-30%) de la cual se reportó el 17.6% del total de casos, expresión

moderada en un 37.3% y expresión alta en un 45.1% de los casos. La media de expresión fue de 61.6%. Esto es similar a lo publicado en estudios a nivel internacional, ya que se ha encontrado una expresión del VEGF en un 86.31% en los melanomas de todas las variedades histopatológicas.²⁷

Con respecto al índice proliferativo Ki67, se encontró una mínima expresión de 5% en el 5.9% de los casos estudiados y una máxima de 90% de expresión en el 3.9%. La media de expresión fue de 30.2% y la mediana de 30%. Estos datos son similares a los reportados por Ladstein y cols. quienes encontraron una mediana de 27% de expresión del Ki67 en una muestra de 202 melanomas nodulares. Es interesante mencionar que ambos casos con máxima expresión eran melanomas malignos que surgieron sobre nevos melanocíticos congénitos, sin embargo solo se obtuvieron 5 casos de melanoma maligno nodular sobre nevo melanocítico congénito, lo cual representa una cifra pequeña. Datos no reportados en estudios previos.

Considerando las múltiples fases de la oncogénesis a través del VEGF que condiciona la angiogénesis, se realizó en nuestro estudio la regresión lineal correlacionando la expresión del VEGF con el índice proliferativo Ki67, lo que demuestra una significancia estadística muy fuerte, con una $P < 0.006$. Se interpreta por lo tanto, que a mayor expresión de VEGF el tumor tiene una capacidad más alta de realizar la replicación celular, lo cual podría tener un alto impacto en las vías de la tumorigénesis. Para reforzar esta correlación, igualmente se realizó el análisis de Pearson con significancia bilateral evaluando la expresión del VEGF como variable independiente y la expresión del Ki67 como variable dependiente. Se obtuvo una significancia alta, con una $P < 0.0006$, lo cual muestra que ambas expresiones son directamente proporcionales, es decir que a mayor expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), mayor reproducción celular, expresada a través del índice proliferativo Ki67. No hay referencias en las diversas investigaciones mundiales, respecto a la correlación de estas dos variables, sin embargo si de manera individual el primer estudio

reportado sobre la expresión del VEGF fue el de Dadras et al. (2005) y lo sucedieron numerosos estudios relacionados. En cuanto el Ki67, Ben-Izhak y cols (2012) realizaron el primer estudio en el que se encontró una asociación entre el porcentaje de expresión del antígeno Ki67 y el tiempo de supervivencia de los pacientes con melanoma maligno anorrectal.

Mediante el método estadístico de Pearson la correlación entre la expresión total de VEGF y la invasividad de acuerdo al nivel de Clark, para correlacionar ambos parámetros, no encontramos una significancia estadística importante ($P < 0.665$). Así mismo la correlación entre la expresión total de VEGF y el tamaño de las lesiones, tampoco fue significativa ($P < 0.759$). Estos hallazgos son importantes, ya que podrían demostrar que la expresión del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es independiente de la invasividad y el tamaño de las lesiones de melanoma maligno nodular. En la literatura actual no hay referencias registradas que intenten correlacionar estas dos variables en su interrelación si no como variables independientes individuales.

Se realizó el análisis de Pearson con significancia bilateral evaluando la expresión del índice proliferativo Ki67 como variable dependiente y el número de mitosis por campo de alta resolución como variable independiente. Se obtuvo una significancia alta, con una $P < 0.00000$, lo cual muestra que ambas expresiones son directamente proporcionales, es decir que a mayor expresión del Ki67, mayor número de mitosis por campo de alta resolución y viceversa. Retomando el Ki67 como un índice de proliferación celular que marca todas las fases de una célula en mitosis (excepto G0) y que se ha convertido en un estándar de oro para categorización histopatológica actual de los melanomas en los estudios rutinarios.

CONCLUSIONES

- En nuestro estudio se estudiaron 51 casos de melanoma maligno nodular. La frecuencia del sexo femenino fue de 68.6% y la del sexo masculino 31.4%. La media de edad al momento del diagnóstico fue de 62 años, con una mediana de 66 años. Los pacientes en el rango de edad entre 66 y 75 años constituyeron el 35.29% del total de los sujetos. En el rango de 36 a 45 años de edad se encontraron 9 pacientes, lo que representa un 17.65% del total de la muestra.
- En cuanto a la topografía, la localización más frecuente encontrada en las mujeres fue la extremidad inferior en un 31.4% de los casos, así como en los hombres con un 17.6%. Con respecto a la evolución referida en la historia clínica, reportada en meses. En relación al tamaño de las lesiones reportadas, la lesión de menor tamaño fue de 0.5 cm y la de mayor de 8 cm con una media de 2.76 cm.
- La evolución mínima fue de 1 mes, la máxima de 60 meses con una media de 17.6 meses y una mediana de 12 meses al momento de diagnóstico de melanoma maligno nodular.
- De los 51 casos estudiados, el 94.1% fueron enviados con diagnóstico clínico y el 5.9% sin diagnóstico. Se encontró que el diagnóstico clínico más frecuente fue melanoma maligno acral lentiginoso con un 39.2%.
- De los casos estudiados no se encontró ninguno que se encontrara dentro del nivel de Clark I o II. Se encontró que la mayoría de ellos presentaban un nivel de Clark IV con 58.8% de los casos, seguido por el nivel de Clark V con 31.4% y el nivel Clark III 9.8%.

- Se obtuvo el nivel de Breslow en el 20% de los casos. El mínimo nivel obtenido fue de 1.2 mm y el máximo de 4.0 mm. El nivel de Breslow más frecuente fue de 2.7 mm.
- Encontramos ulceración en el 62.7% del total de casos estudiados. En cuanto a las mitosis típicas o atípicas reportadas por campo de alta resolución (40x), encontramos un mínimo de 1 mitosis (40x) en el 17.6% de los casos y un máximo fue de 10 mitosis (40x) en el 2.0%, con una media de 2.76 mitosis (40x) y una mediana de 2 mitosis (40x).
- El 100% de los casos expresaron algún porcentaje; ya sea en patrón nuclear o intracitoplasmático, de VEGF. Consideramos importante que este marcador de inmunohistoquímica debería ser rutinario en el diagnóstico del melanoma maligno. Se encontró una mínima expresión de 10% en el 2.0% de los casos y una máxima expresión 100% en el 5.9% de los casos. Se reportó una expresión leve en el 17.6% del total de casos, expresión moderada en un 37.3% y expresión alta en un 45.1% de los casos. La media de expresión fue de 61.6%.
- Se encontró una mínima expresión de Ki67 del 5% en el 5.9% de los casos estudiados y una máxima de 90% de expresión en el 3.9%. La media de expresión fue de 30.2% y la mediana de 30%. Todos los casos con máxima expresión eran melanomas malignos que surgieron sobre nevos melanocíticos congénitos, por lo cual sería interesante realizar estudios con muestras grandes de melanomas malignos de todas las variedades histopatológicas, que surgen sobre nevos congénitos.
- La correlación entre la expresión del VEGF con el índice proliferativo Ki67 demostró una significancia estadística muy fuerte ($P < 0.006$). Lo que significa que a mayor expresión de VEGF el tumor tiene una capacidad más alta de realizar la replicación celular.

- No se encontró una significancia estadística entre la expresión total de VEGF y la invasividad ($P < 0.665$) ni entre la expresión total de VEGF y el tamaño de las lesiones ($P < 0.759$). Por lo tanto, la expresión del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es independiente de la invasividad y el tamaño de las lesiones.
- La correlación entre la expresión del índice proliferativo Ki67 y el número de mitosis por campo de alta resolución mostró una significancia alta ($P < 0.00000$).
- Todas las aseveraciones anteriores nos permiten establecer la necesidad de estudios multicéntricos que analicen las diversas facetas del comportamiento biológico de este tumor, de esta forma lograr establecer las bases para nuevos métodos diagnósticos y enfoque terapéuticos dirigidos a blancos específicos. Con esto se pretende alargar el período de vida, así como mejorar la calidad de la misma.
- Nuestro estudio sienta las bases para múltiple enfoques en el análisis de esta complicada entidad. Por lo tanto consideramos que servirá como piloto para el estudio del melanoma maligno en todas sus variedades clínico-patológicas, tomando en cuenta determinaciones inmunohistoquímicas y de biología molecular.
- Es necesaria la integración de una clínica multidisciplinaria para el estudio, diagnóstico, tratamiento y prevención del melanoma maligno en la cual participen las disciplinas de Dermatología Clínica, Dermato-oncología, Dermatopatología, Oncología Clínica, Oncología Quirúrgica, Genética y Biología molecular.

Bibliografías

1. Vito R., Vernon S., Keiran S. A brief history of melanoma: from mummies to mutations. *Melanoma Res.* 2012; 22(2): 114–122.
2. Gutiérrez Vidrio R., Cortés Lozano N. Confrontando al melanoma en el siglo XXI. *Med Cutan Iber Lat Am* 2007; 35(1):3-13.
3. Káram M., Toussaint S., Domínguez J., et al. Características clínicas e histopatológicas del melanoma maligno en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. *Gac Méd Méx* 2008; 144(3): 219-23.
4. NCI Cancer Net Database [Internet]. [citado: 14 nov 2014] Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/melanoma>
5. National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology and End Results [Internet]. [citado: 14 nov 2014] Disponible en: <http://www.seer.cancer.gov/statfacts/>
6. Eggermont A., Spatz A., Robert C. Cutaneous melanoma. *The Lancet* 2014; 383(9919): 816 – 27.
7. Karim-Kos H., Vries E., Soerjomataram I. et al. Recent trends of cancer in Europe: A combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *Eur J Cancer* 2008 44: 1345-89.
8. International Agency for Research on Cancer [Internet]. GLOBOCAN 2002. [citado: 14 nov 2014] Disponible en: <http://www-dep.iarc.fr/>
9. Eran E., Watson I. R., Kryukov G. V. et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012; 159(2): 251-63.

10. Gandini S., Sera F., Cattaruzza M. S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2040–59.
11. Tsao H., Chin L., Garraway L. A. et al. Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev*; 2012 26: 1131-1155.
12. Van Leeuwen M. T., Webster A.C., McCredie M. R. et al. Effect of reduced immunosuppression after kidney transplant failure on risk of cancer: population based retrospective cohort study. *BMJ [Internet]*. 2010 [citado: 14 nov 2014]; 340(570): 1-6. Disponible en: <http://www.bmj.com/content/340/bmj.c570>
13. Scolyer R. A., Long G. V., Thompson J. F. Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. *Molecular oncology* 2011; 5(2): 124–136.
14. Marini M., Saponaro A., Casas J. et al. Melanoma recurrente local: la importancia de diferenciar el tipo verdadero del tipo metastásico. *Med Cutan Iber Lat Am* 2004; 32(3): 103-10.
15. Egger M., Dunki-Jacobs E., Callender G. et al. Outcomes and prognostic factors in nodular melanomas. *Surgery* 2012; 152:652-60.
16. Bailey E.C., Sober A.J., Tsao H. et al. En: Goldsmith L., Katz S., Gilchrest B., Paller A., Leffell D., Wolff K. editors. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. Vol 1. 8va ed. EUA: McGraw-Hill; 2012. p. 1416-1444.
17. Cockerell C. J., The Pathology of Melanoma. *Dermatol Clin* 2012; 30:445-68.
18. Ackerman A.B. Malignant melanoma, a unifying concept. *Am J Dermatopathol* 1980; 2: 309–13.

19. Heenan P.J. Nodular melanoma is not a distinct entity. Arch Dermatol 2003; 139(3):387.
20. Piris A, Mihm MC Jr, Duncan LM. AJCC melanoma staging update: impact on dermatopathology practice and patient management. J Cutan Pathol 2011; 38:394–400.
21. Tejera A., Solís E., Ríos J., et al. Factores pronósticos en el melanoma cutáneo primario no incluidos en la clasificación de la American Joint Committee on Cancer (AJCC). Actas Dermosifiliogr 2011; 102(4):255-63.
22. Dadras S. S., Lange-Asschenfeldt B., Velasco P. et al. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph nodes. Mod Pathol 2005; 18: 1232–42.
23. Fuertes L., Santonjab C., H. Kutzner et al. Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia. Actas Dermosifiliogr 2013; 104(3):181-203
24. Scholzen T, Gerdes, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol 2000; 182:311-22.
25. Väisänen A., Kuvaja P., Kallioinen M et al. A prognostic index in skin melanoma through the combination of matrix metalloproteinase-2, Ki67, and p53. Human Pathology 2011; 42:1103-11.
26. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 Protein: From the Known and the Unknown. J Cell Physiol 2000; 182: 311–22.

27. Konstantina A., Lazaris A., Ioannidis E. et al. Immunohistochemical expression of VEGF, HIF1-a, and PIGF in malignant melanomas and dysplastic nevi. *Melanoma Research* 2011; 21:389–394.
28. Tucker K. B., Makey K. L., Chinchar E. et al. EGCG Suppresses melanoma tumor angiogenesis and growth without affecting angiogenesis and VEGF expression in the heart and skeletal muscles in mice. *J Cancer Res Updates* 2014; 3: 19-29.
29. Mehnert J. M., McCarthy M. M., Jilaveanu L. Quantitative expression of VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, and VEGF-R3 in melanoma tissue microarrays. *Hum Pathol* (2010) 41, 375–84.
30. Bichakjian C., Halpern A. C., Johnson T. M. et al. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2011; 65:1032-47.
31. Wolf I. H., Richtig E., Kopera D. et al. Locoregional cutaneous metastases of malignant melanoma and their management. *Dermatol Surg* 2004; 30:244-7.
32. Ko J., Fisher D. E., A new era: melanoma genetics and therapeutics. *J Pathol* 2011; 223:241–250.
33. Chapman P. B., Hauschild A., Robert C. et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011; 364(26):2507-16.
34. Martí R. M., Sorolla A., Yeramian A. Nuevas dianas terapéuticas en el melanoma. *Actas Dermosifiliogr.* 2012; 103(7):579-90.

35. Bevona C, Sober AJ. Melanoma Incidence trends. *Dermatol Clin* 2002; 20:589-595.
36. Alfeirán-Ruiz A, Escobar-Alfaro G. Epidemiología del melanoma de piel en México. *Rev Inst Nal Cancerol* 1998; 44: 168-174.
37. Haydu L. E., Murali, R., Bonenkamp J. J. et al. Prognostic Importance of the Extent of Ulceration in Patients With Clinically Localized Cutaneous Melanoma. *Ann Surg* 2012; 255: 1165–1170.

ANEXOS

ANEXOS



Fig. 1 Melanoma de extensión superficial en tórax.



Fig. 2 Melanoma maligno de tipo nodular, planta de pié derecho.



Fig. 3 Melanoma lentigo maligno en mejilla.



Fig. 4. Melanoma maligno de tipo acral lentiginoso, talón izquierdo.



Fig. 5 Melanoma maligno nodular sobre nevo congénito.



Fig. 6 melanoma maligno sobre nevo azul.

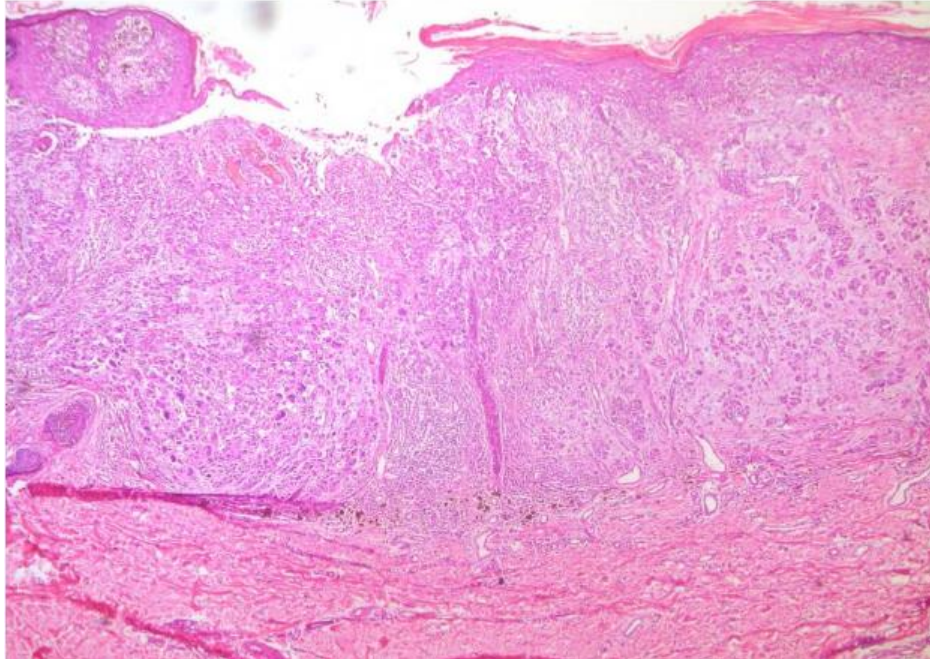


Fig. 7 Melanoma maligno con crecimiento vertical y área de ulceración central.

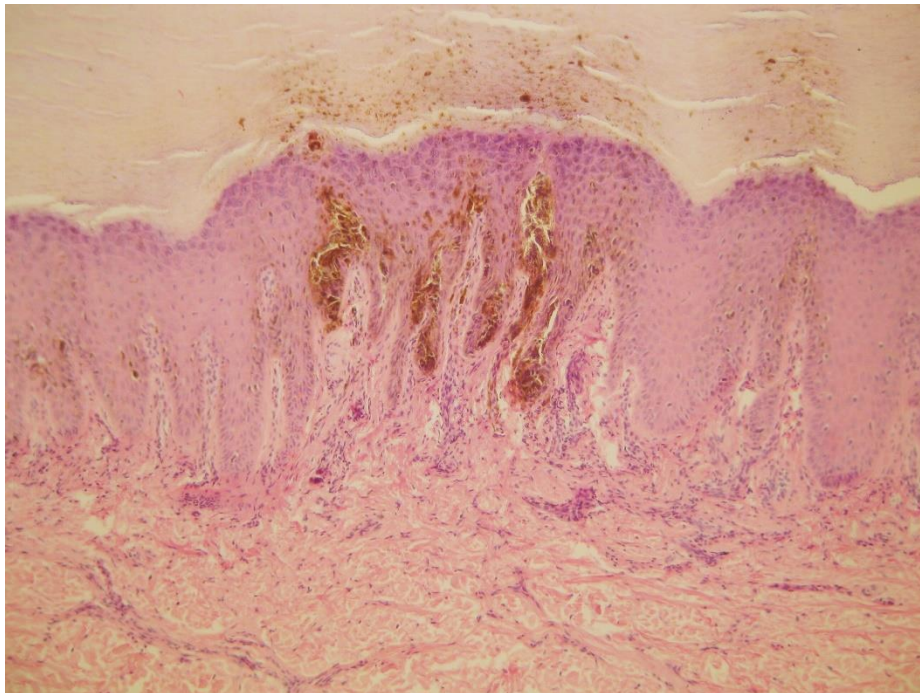


Fig. 8 Melanoma maligno Clark I.

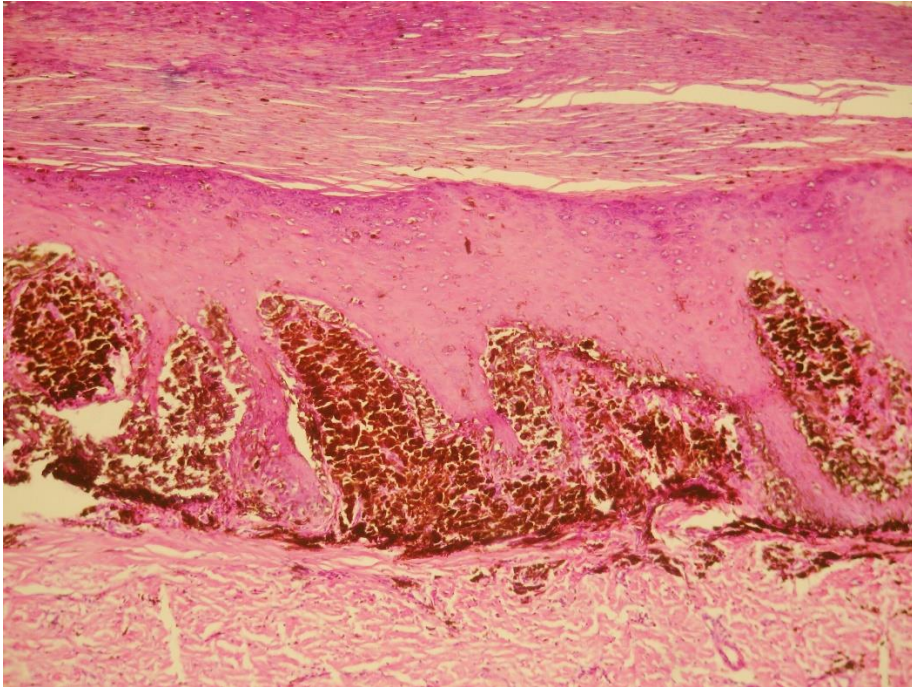


Fig. 9 Melanoma maligno Clark II.

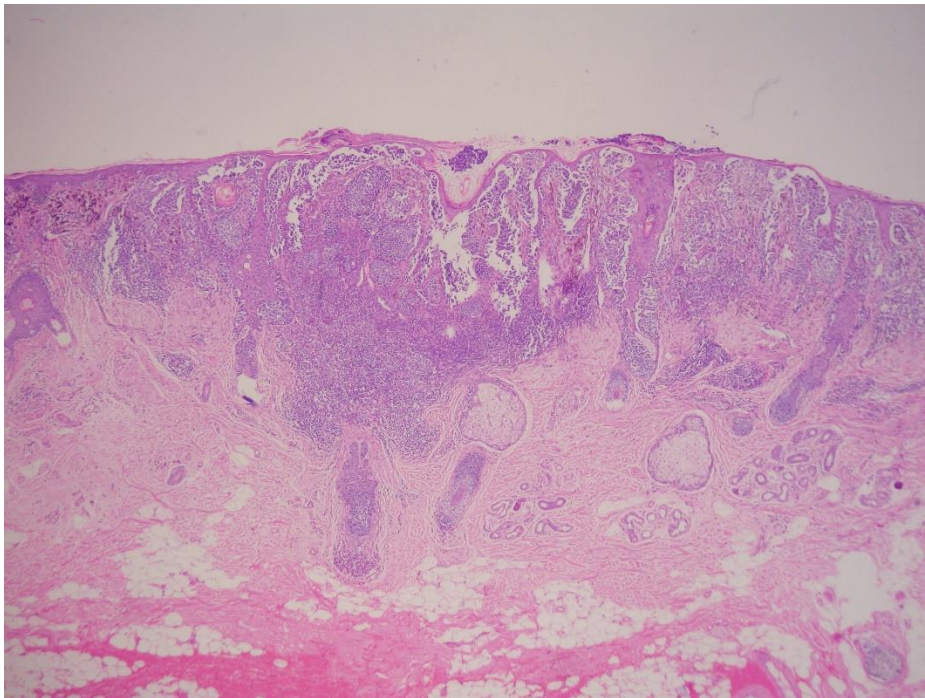


Fig. 10 Melanoma maligno Clark III.

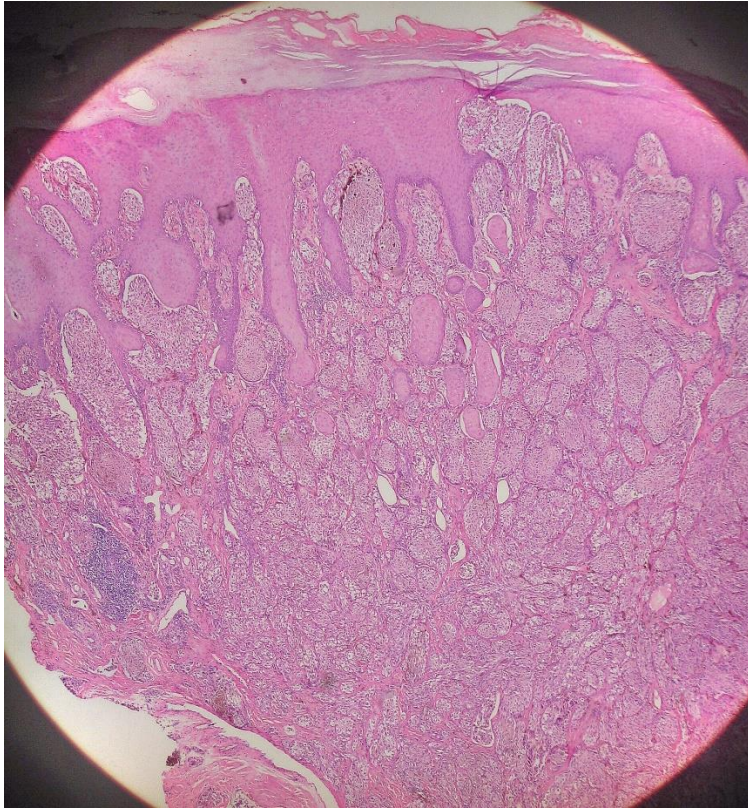


Fig. 11 Melanoma maligno Clark IV.

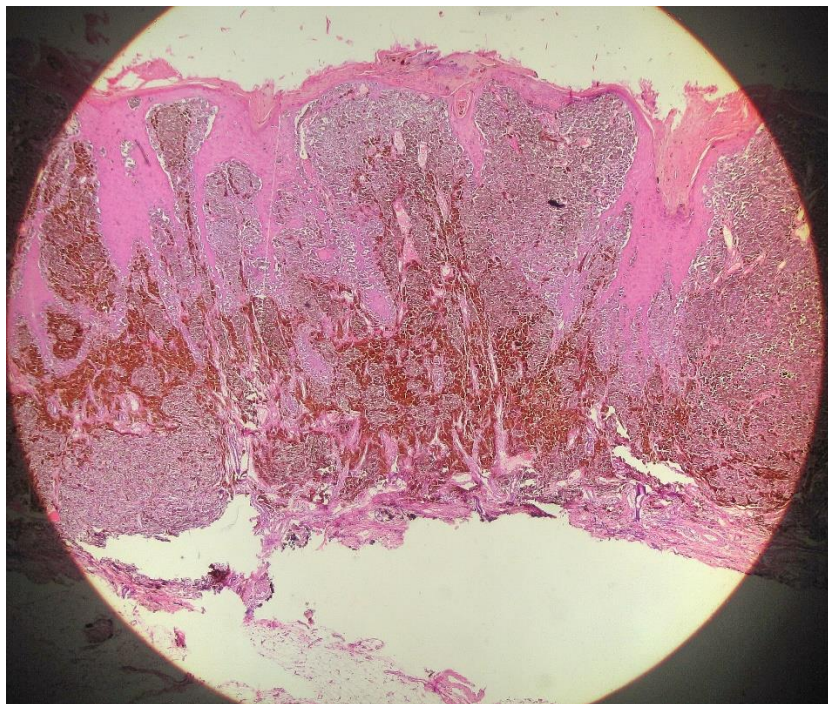


Fig. 12 Melanoma maligno Clark V.

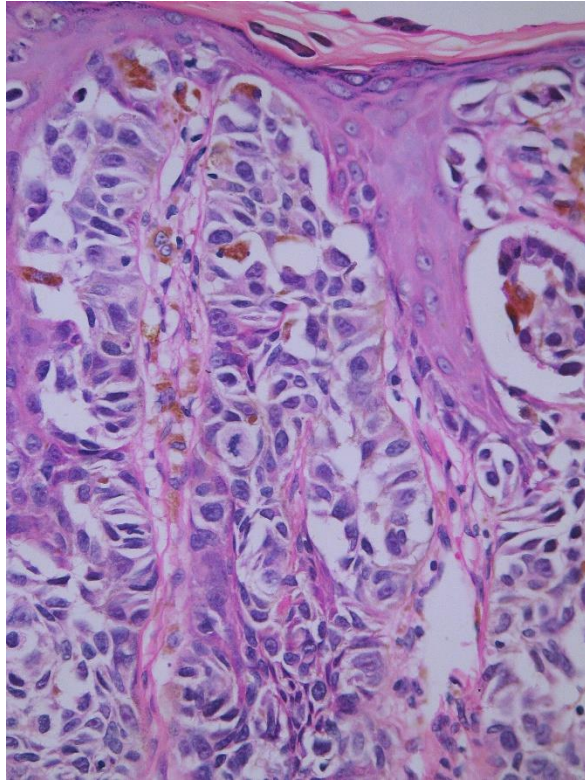


Fig. 13 Figura mitótica.

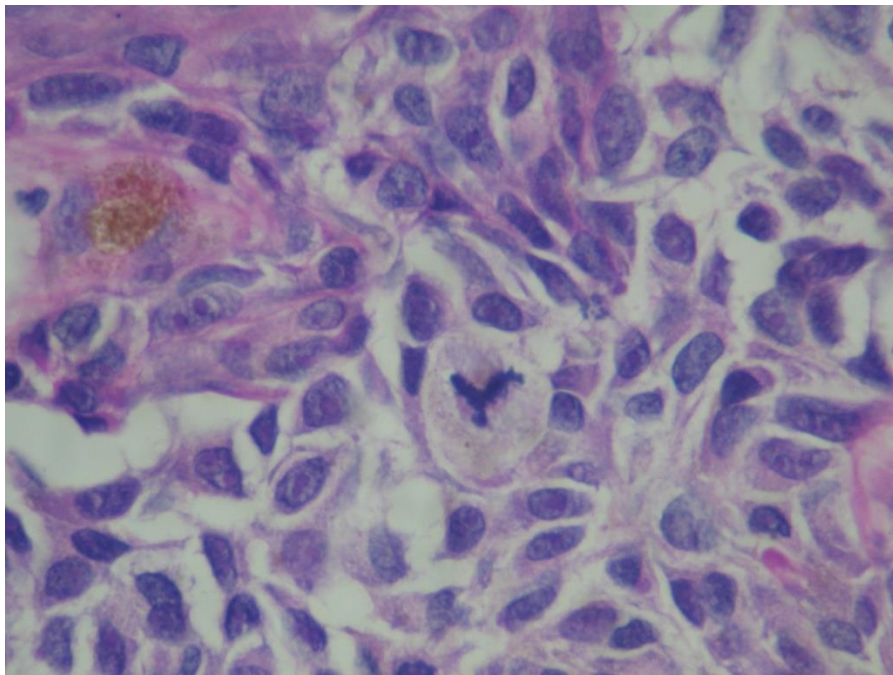


Fig. 14 Figura mitótica atípica tripolar.

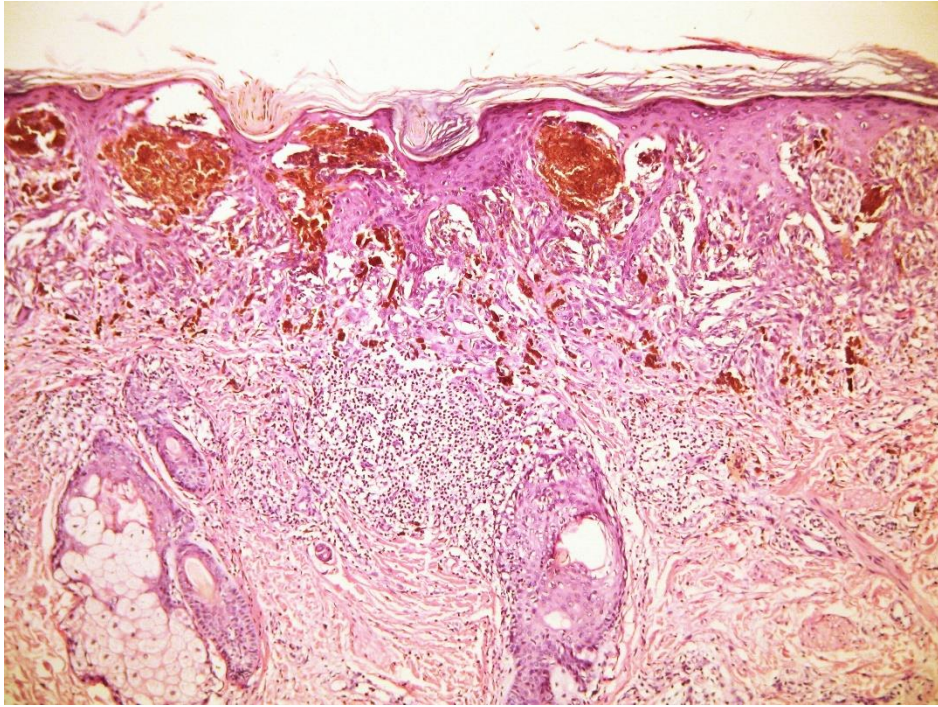


Fig. 15 Infiltrado linfocítico rodeando la masa tumoral del melanoma maligno.

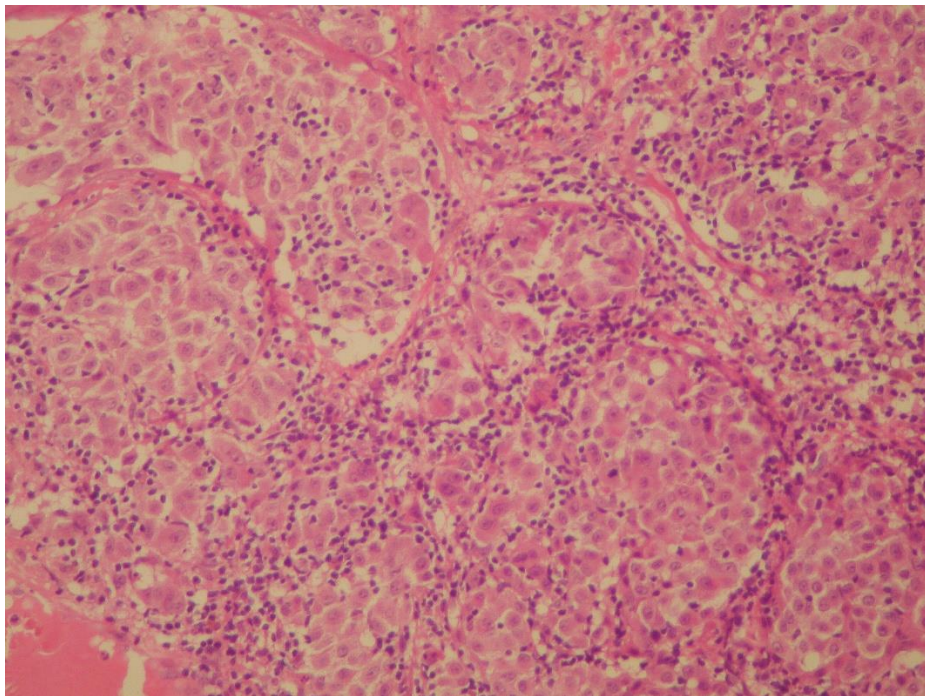


Fig. 16 Infiltrado linfocítico invadiendo la masa tumoral de melanoma maligno.

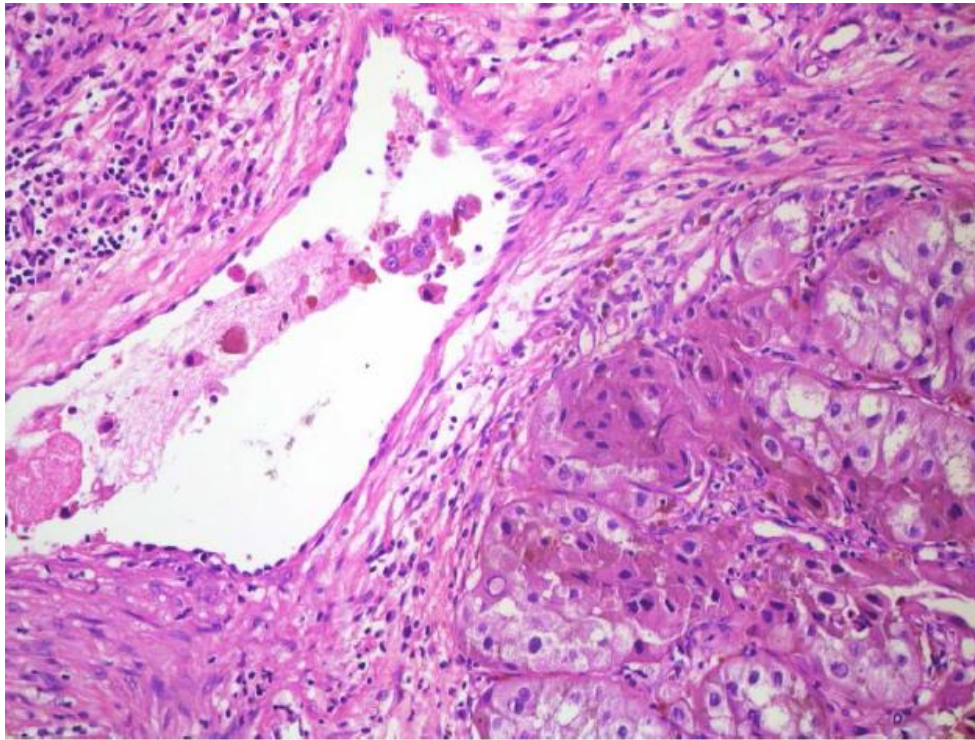


Fig. 17 Grupo de células tumorales en el interior de la luz vascular (angioinvasión)

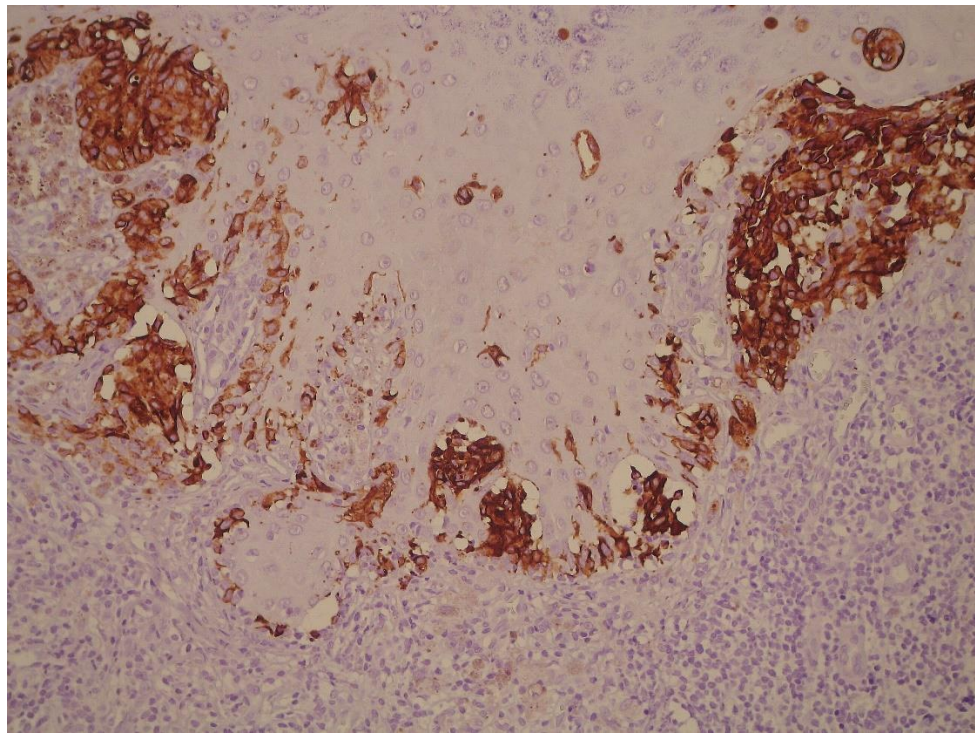


Fig.18 Tinción de inmunohistoquímica: proteína S100 en melanoma maligno.

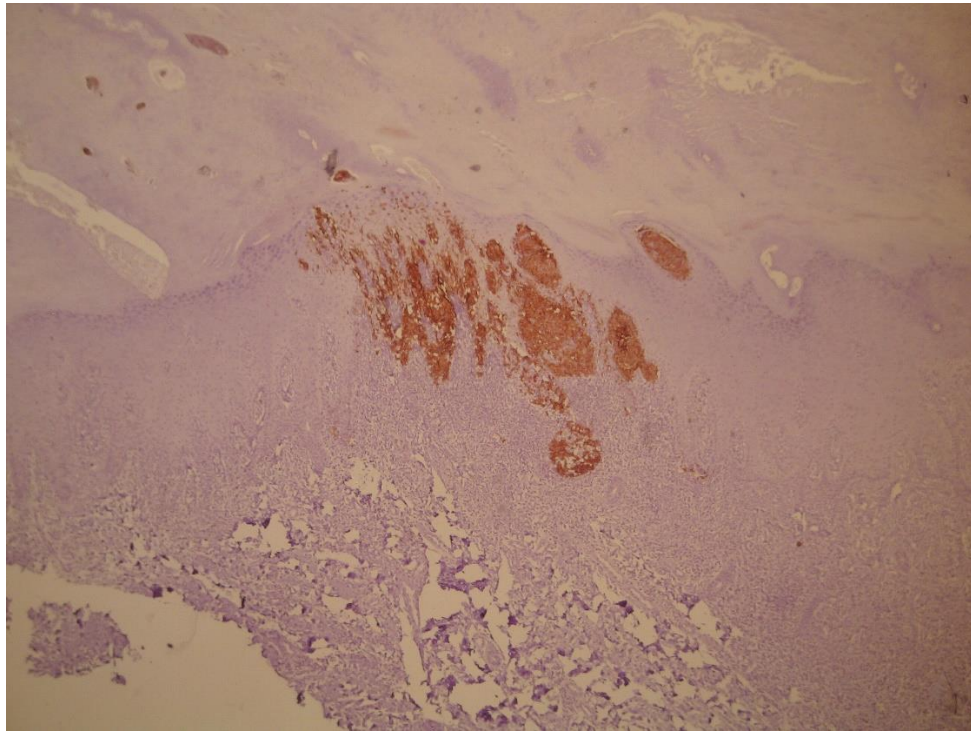


Fig.19 Tinción de inmunohistoquímica: MART-1 en melanoma maligno.

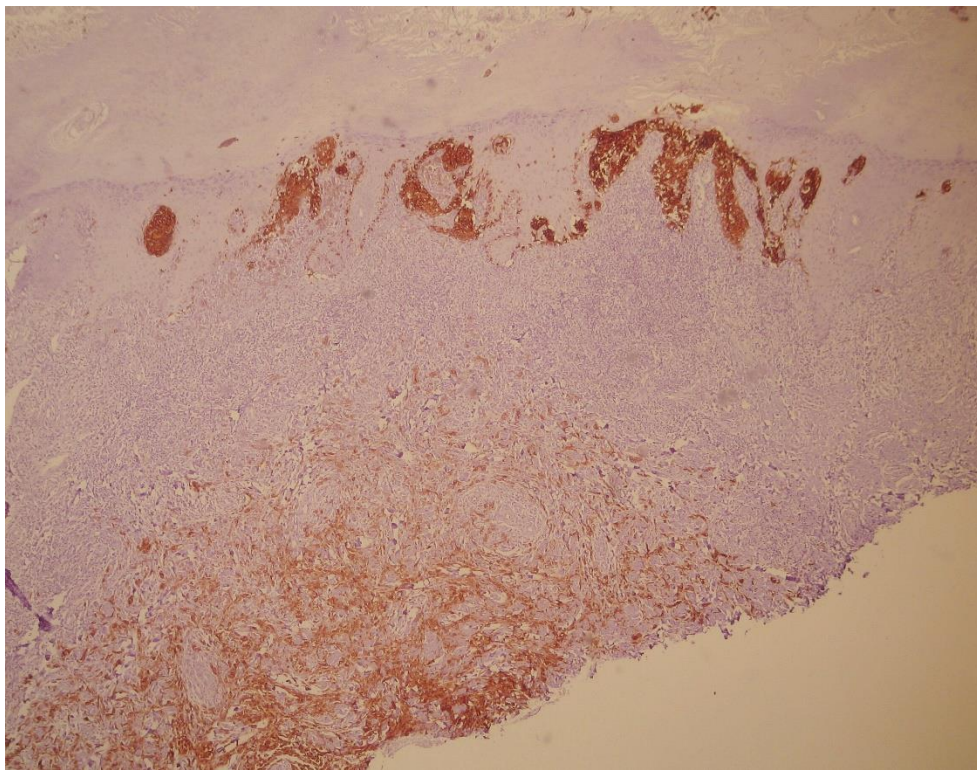


Fig.20 Tinción de inmunohistoquímica: HMB-45 en melanoma maligno.

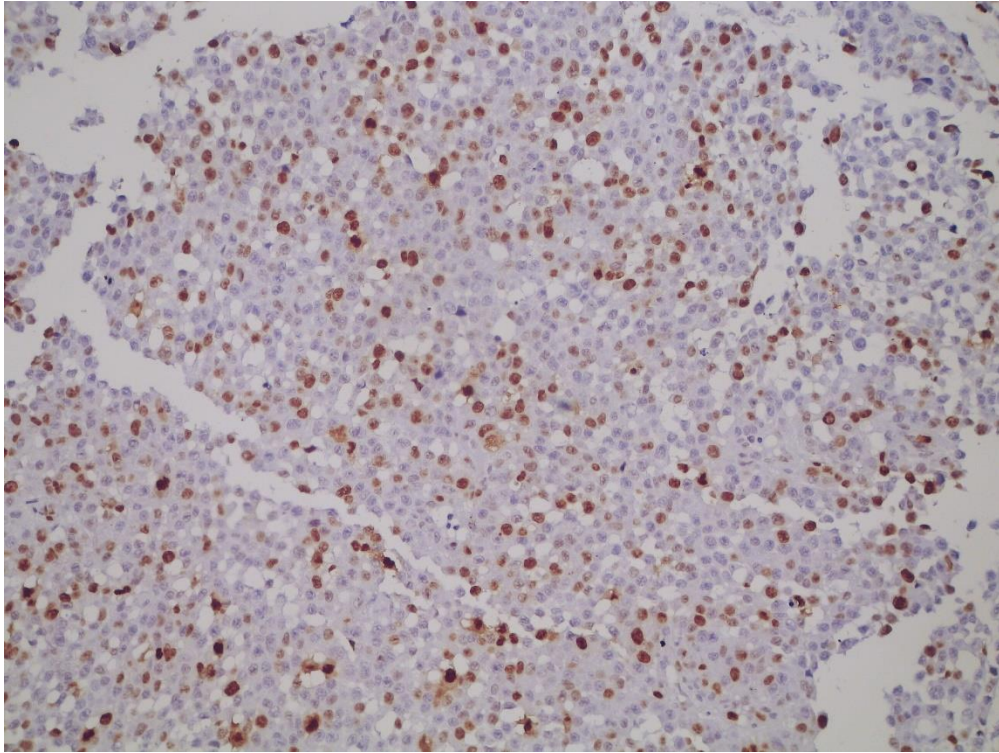


Fig. 21: Expresión de Ki67 en un 40% en melanoma maligno nodular.

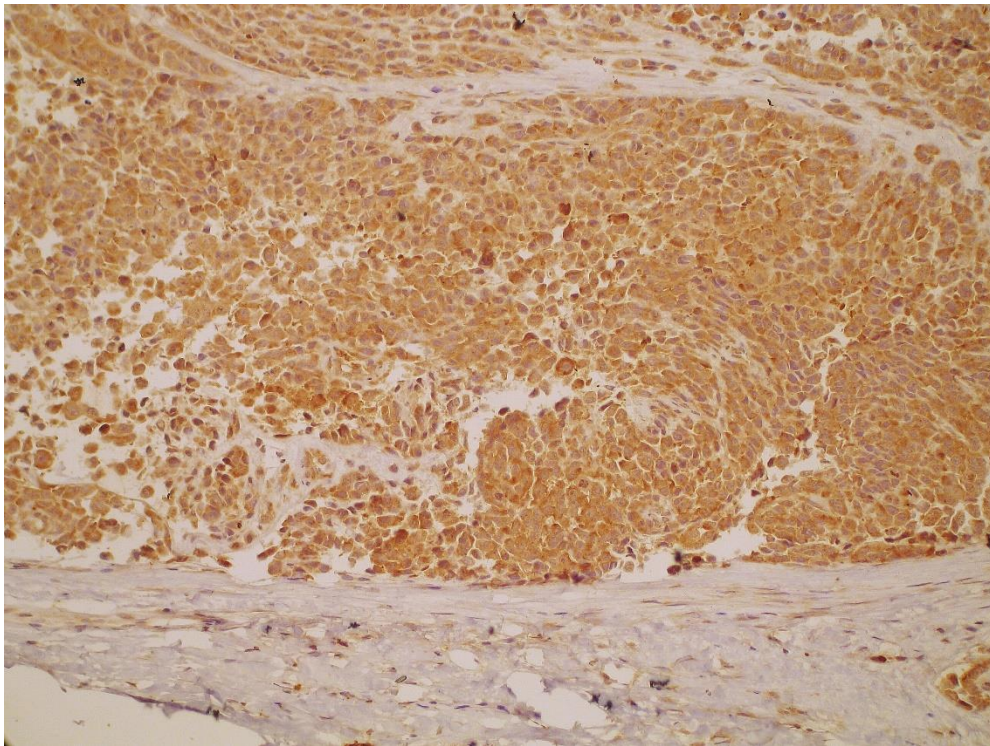


Fig. 22. Expresión de VEGF en un 100% en melanoma maligno nodular.