

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE MEDICINA

CARRERA MEDICINA



UTILIDAD DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS (S-100, HMB-45 y MELAN-A), Y RELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS, LOCALIZACIÓN DE LA LESIÓN Y SUPERVIVENCIA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE MELANOMA MALIGNO EN EL CENTRO DE LA PIEL (CEPI), DURANTE ENERO 2012 A SEPTIEMBRE 2015.

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MÉDICO
CIRUJANO**

**DAYANA MICHELLE PITA ENDARA
GLADYS KARINA ROSILLO BENAVIDES**

Director de Tesis: Dr. Santiago Palacios Álvarez
Tutor Metodológico: Ana María Troya Zuleta, M.Sc.

QUITO, 2015

A mis padres Efrén y Ceci
A mis hermanos, Sebastián y José David
Dedicatoria especial a mi primo hermano Diego Endara†
Por caminar conmigo durante este largo camino

Dayana Pita Endara

*A todos los que creyeron y esperaron por este día,
en especial a mi familia, mi mundo entero.*

Karina Rosillo Benavides

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, pilar fundamental en mi vida. Gracias por el apoyo incondicional, por su inigualable amor y amistad, por todas las enseñanzas que me han permitido llegar tan lejos, por ser los mentores de mi vida y sobre todo por ser quienes siempre han estado y estarán junto a mí en cada paso de mi camino.

A mi hermanos, mis mejores compañeros, quienes con su sola presencia llenan de felicidad mis días. Estoy segura que con ustedes contaré en cada instante de mi vida.

A mis tíos y primos más cercanos, quienes me han visto crecer y nunca han dejado de confiar en mí. Porque me acompañarán siempre desde donde quiera que estén.

A mis amigas y amigos, mi segunda familia, con quienes hemos compartido experiencias inolvidables, y han sabido levantarme en mis momentos de tristeza y también han festejado conmigo los momentos de alegría. Por todos los momentos compartidos, por su presencia y apoyo permanente, muchas gracias.

Al Dr. Santiago Palacios, por ser parte de este proyecto.

Al Dr. Severino Rey por su amistad, colaboración y apoyo incondicional.

Al Dr. Nelson Cevallos por todas las buenas experiencias vividas y por dedicar su tiempo a este trabajo.

A la Dra. Verónica García, Lcdas. Angélica Pulles y Rocío Romero, por su colaboración para la realización de esta tesis.

Un agradecimiento muy especial a Ana María Troya, por todo el apoyo, ayuda y sobre todo, por la linda amistad brindada.

A mi mejor amiga y compañera de tesis, quien ha sido más que una amiga, una hermana durante estos años de amistad, sin su ayuda no hubiese sido posible la realización de este trabajo.

Gracias totales....

Dayana Pita Endara

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por ser los autores de toda esta historia, son y serán para siempre mi motor. Gracias mamá por ser mi mejor amiga y cómplice y gracias papá por creer siempre en tu doctorita. Lo logramos juntos.

A mi hermano, por cada experiencia compartida, por ser mi otra mitad, mi terremoto, y por enseñarme a ser valiente.

A mis tíos, Dori y Hernán y a mis primos en especial Paulina y Juan José gracias por tanto amor y apoyo, son mi segundo hogar.

Alejandra, mi princesa, a ti por alegrarme cada segundo y llevarme contigo de la mano.

A mis amigos, siempre incondicionales, por tantas alegrías y por saber decir las palabras precisas cuando necesitaba de aliento. Adriana, por ser más que una amiga, tú y yo compartimos el mismo corazón.

Al Dr. Santiago Palacios por dirigirnos en esta nueva experiencia.

Dr. Nelson Cevallos gracias por enseñarnos tanto y por todo su apoyo en este camino.

Al Dr. Severino Rey por su gran colaboración y amistad, por su tiempo y por confiar en nosotras. Un verdadero ejemplo.

Ana María por ser de esos ángeles que se te cruzan en el camino, gracias por tomar el toro por los cuernos, sin tu ayuda esto no sería posible, más que una tutora una gran amiga.

A la Dra. Verónica García Yllán y a las Lcdas. Angélica Pulles y Rocío Romero por su esfuerzo y colaboración para poder llevar a cabo esta aventura.

Y por último gracias infinitas Pita, tú siempre a mi lado, hemos compartido hasta el lugar más recóndito del alma, le agradezco a la vida por habernos puesto en el mismo camino, sin ti no sé qué sería de mí, hermana.

Karina Rosillo Benavides

TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN	1
-----------------------	---

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO	8
2.1. GENERALIDADES DE LA PIEL	8
2.2. MELANOCITOS	12
2.2.1. GENERALIDADES	12
2.2.2. DESARROLLO EMBRIOLÓGICO DE LOS MELANOCITOS	13
2.2.2.1. De Melanoblastos a Melanocitos	13
2.2.3. LOS MELANOSOMAS: ORGANELOS IMPORTANTES PARA LA PIGMENTACIÓN	16
2.2.3.1. Proteínas Asociadas a la Formación de Melanosomas	18
2.2.3.2. Proteínas reguladoras de melanocitos y su relación con la proliferación celular	20
2.2.4. MELANOGÉNESIS.....	21
2.2.4.1. Transporte de Melanosomas	23
2.2.4.2. Regulación de la melanogénesis	25
2.2.5. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN REGULADORAS DE LA FUNCIÓN DE LOS MELANOCITOS	27
2.3. MELANOMA	29
2.3.1. HISTORIA	29
2.3.2. EPIDEMIOLOGÍA	31
2.3.2.1. DECLARACIÓN DE BÚSQUEDA	31
2.3.3. FACTORES DE RIESGO	40
2.3.3.1. Factores Ambientales	40
2.3.3.2. Factores Fenotípicos	44
2.3.3.3. Factores Genéticos	45
2.3.4. FISIOPATOLOGÍA	46
2.3.5. DIAGNÓSTICO	52
2.3.5.1. Diagnóstico Clínico	52
2.3.5.2. Diagnóstico Histopatológico	54
2.3.5.3. Factores Pronósticos	56

2.3.6.	CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA	57
2.3.6.1.	Melanoma de Extensión Superficial (MES)	57
2.3.6.2.	Melanoma Nodular (MN)	59
2.3.6.3.	Melanoma Lentigo Maligno (LMM)	60
2.3.6.4.	Melanoma Lentiginoso Acral (MAL)	61
2.3.6.5.	Otras Variedades de Melanoma	62
2.4.	INMUNOHISTOQUÍMICA	63
2.4.1.	DECLARACIÓN DE BÚSQUEDA	63
2.4.2.	GENERALIDADES DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA	65
2.4.2.1.	Principios y Procedimientos	67
2.4.3.	PROTEÍNAS S-100	68
2.4.4.	HMB-45 Y MELAN-A	70
2.5.	JUSTIFICACIÓN	72
2.6.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	73
2.7.	OBJETIVOS	73
2.5.1.	OBJETIVO GENERAL	73
2.5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	74
2.8.	HIPÓTESIS	74
CAPÍTULO III		
3.	METODOLOGÍA	75
3.1.	TIPO DE PROYECTO	75
3.2.	TIPO DE ESTUDIO	75
3.3.	LUGAR Y PERÍODO EN EL QUE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN	75
3.4.	UNIVERSO - MUESTRA	75
3.4.1.	PROCEDIMIENTO DIAGNÓSTICO E INTERVENCIÓN	76
3.4.2.	CRITERIOS DE INCLUSIÓN	77
3.4.3.	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	77
3.5.	MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE MUESTRA	78
3.6.	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES	79
3.7.	MÉTODO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	82
3.8.	ASPECTOS BIOÉTICOS	83
3.9.	ASPECTOS ADMINISTRATIVOS	83
CAPÍTULO IV		
4.	RESULTADOS	85
4.1.	ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS	85

4.2. ASOCIACIONES ENTRE VARIABLES	86
4.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES	90
CAPÍTULO V	
5. DISCUSIÓN	93
CAPÍTULO VI	
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	98
6.1. CONCLUSIONES	98
6.2. RECOMENDACIONES	99
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
8. FIGURAS	108
9. TABLAS	111
10. FOTOGRAFÍAS	134
11. ANEXOS	146

LISTA DE ABREVIATURAS.

>60a: mayores a 60 años

μ: micras

ABS: Oficina Australiana de Estadísticas

ACTH: hormona adenocorticotrópica

AIHW: Instituto Australiano de Salud y Bienestar

AJCC: American Joint Committee on Cancer

AJCP: American Journal Clinical Pathology

ARF: ADP-ribosylation factor

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

bFGF: factor básico de crecimiento de fibroblastos

BMP: bone morphogenic protein (proteínas morfogénicas óseas)

BMP-4: bone morphogenic protein 4. (proteínas morfogénicas óseas 4)

BRAF: B-raf Proto-oncogene

cAMP: adenosinmonofosfato cíclico

CC: coeficiente de correlación

CCND1: cyclin D1 protein coding gene

CDK-2: Cyclin dependent kinase 2

CDK4: cyclin-dependent kinase 4

CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CEPI: Centro de la Piel

c-kit: receptor c-kit

CRE: cAMP response element

CREB: cAMP response element-binding protein

DAG: diacilglicerol

DHI: 5,6-dihidroxiindol

DHICA: ácido 5, 6-dihidroxiindol-2-carboxílico

DNA: ácido desoxirribonucleico.

Ednr A: receptor de endotelina A

Ednr B: receptor de endotelina B

ERK: extracellular signal-regulated kinases

ERO: especies reactivas de oxígeno

ET: endotelina

ET1: endotelina-1

ET2: endotelina-2

ET3: endotelina-3

Gp100: glucoproteína 100.

GSK3B: enzima glucógeno sintetasa cinasa 3B

H: hombre

ha: habitantes

HE: hematoxilina-eosina

HGF: hepatocyte growth factor (factor de crecimiento de hepatocitos)

HMB-45: anticuerpo monoclonal 45

HMB-50: anticuerpo monoclonal 50

H-RAS: Harvey RAS sarcoma viral oncogene homolog

IARC: International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional de Investigación del Cáncer)

IHQ: inmunohistoquímica

IHQRRP: Inmunohistoquímica Rocio Romero P.

INK4a: locus INK4a

IVU: índice de radiación UV

kDa: kilodalton

Kg: kilogramos

KMO: test de Kaiser-Meyer-Olkin

LAMP: proteínas de membrana asociadas con lisosomas

L-DOPA: 3,4 dihidroxifenilalanina

LEC-TFC: transcription factors (factores de transcripción)

LMM: melanoma lentigo maligno

LT: leucotrienos

M: mujer

MAL: melanoma lentiginoso acral

MAP cinasa-2: proteincinasa activada por mitogeno-2

MAP: mitogen activated protein

MAPK: mitogen activated protein kinase

MCR: receptor de melanocortina

MELAN-A: antígeno melanoma reconocido por células T-1

MES: melanoma de extensión superficial

MIHQ: marcador inmunohistoquímico

MITF: factor de transcripción asociado a microftalmía

mm: milímetros

mm²: milímetro cuadrado

MMP-2: matrix metallopeptidase 2 (metaloproteincinasa 2)

MMP-7: matrix metallopeptidase 7 (metaloproteincinasa 7)

MN: melanoma nodular

MSH: hormona estimulante de melanocitos

MW: molecular weight (peso molecular)

NFG: nerve growth factor (factor de crecimiento nervioso)

NGF: factor de crecimiento nervioso

NKI-beteb: anticuerpo monoclonal para melanoma.

nm: nanómetros

N-RAS: neuroblastoma RAS viral oncogene homolog

NT: neurotrofinas

OMS: Organización Mundial de la Salud

ON: óxido nítrico

p: valor de significancia

p16INK4a: proteína supresora tumoral

P75NTR: neurotrophin receptor p75

PAR-2: receptor-2 activado por proteasa

Pax-3: paired Box 3 gene

Pax-5: paired Box 5 gene

PCA: análisis de componentes principales

PG: prostaglandinas

PGE: prostaglandina E

PGF: prostaglandina F

PIP3: fosfatidi-inositol fosfato 3

PKA: proteincinasa dependiente de cAMP

PKC: proteincinasa C

PKC-β: enzima proteincinasa C- β

Pmel 17: melanocyte protein mel 17

POMC: proopiomelanocortina

PTEN: phosphatase and tensin homolog

Rab27a: Ras-related protein Rab-27a.

Rac: proteína Rac

RACK: receptores de cinasa activada

RE: retículo endoplásmico

Rho: proteína Rho

RNT: Registro Nacional de Tumores

S-100: proteína ácida, soluble en sulfato amónico saturado al 100% a pH neutro

SCF: factor de células madre ligando

SEER: Surveillance Epidemiology and End Results.

SF: factor Steel

SOLCA: Sociedad de Lucha Contra el Cáncer del Ecuador

Sox-10: (SRY (Sex Determining Region Y) – Box 10) gene.

T.I.E: tasa de incidencia estandarizada

T.M.E: tasa de mortalidad estandarizada

TE: tasa estandarizada.

TRP 1 y 2: proteínas relacionadas con tirosinasa

USA: United States of América

UV: ultravioleta

UVA: ultravioleta tipo A

UVB: ultravioleta tipo B

UVC: ultravioleta tipo C

V600E: mutación sustitución valina por ácido glutámico en la posición 600.

WHO: World Health Association

WNT: wingless-type mamary tumor virus integration – site family

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Anatomía de la Piel	11
Figura 2.	Desarrollo embriológico del melanocito	15
Figura 3.	Flujograma de los tipos de melanosomas normales (feomalanosomas y eumelanosomas)	17
Figura 4.	Flujograma de la biosíntesis de melanina	22
Figura 5.	Peligros de la radiación UV, mitos y verdades	43
Figura 6.	Fototipos de Piel	44
Figura 7.	Mecanismos de la enfermedad. Vías de MAPK y de la PI3K	47
Figura 8.	Mecanismos de la Enfermedad: Melanoma	48
Figura 9.	Regla ABCDE para la detección temprana de melanoma	49
Figura 10.	Signos Sugestivos de Malignidad en Lesiones Pigmentadas	50
Figura 11.	Niveles de Clark	52
Figura 12.	Fases de desarrollo del melanoma de extensión superficial	54
Figura 13.	Fases de desarrollo del melanoma nodular	56
Figura 14.	Fases de desarrollo del melanoma lentigo maligno	57
Figura 15.	Melanoma Acro-lentiginoso	58
Figura 16.	Análisis de Componentes Principales (PCA) realizado con la matriz de correspondencias entre todas las variables analizadas en este estudio	108
Figura 17.	Análisis de Componentes Principales (PCA) realizado con la matriz de correspondencias entre las variables Histopatológicas y Marcadores Inmunohistoquímicos	109
Figura 18.	Análisis de Componentes Principales (PCA) realizado con la matriz de correspondencias entre las variables Histopatológicas-Pronósticas, Supervivencia y Marcadores Inmunohistoquímicos	110

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Epidemiología Mundial del Melanoma Maligno Cutáneo según IARC	34
Tabla 2.	Distribución de la Localización Anatómica del Melanoma Maligno Cutáneo	35
Tabla 3.	Tasas estandarizadas de indicadores principales de la incidencia de Melanoma Maligno Cutáneo en Quito - Ecuador, desde 1986 hasta 2010	36
Tabla 4.	Comparación Epidemiológica del Melanoma Maligno Cutáneo ...	37
Tabla 5.	Comparación de la Sensibilidad, Especificidad y Valor Predictivo Positivo/Negativo de los Marcadores Inmunohistoquímicos para Diagnóstico de Melanoma	68
Tabla 6.	Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para las variables demográficas (género y grupos etarios).....	111
Tabla 7.	Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para la variable Localización de la lesión.....	111
Tabla 8.	Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para las variables histopatológicas diagnósticas (Clasificación Histopatológica, Fase de Crecimiento, Elastosis Actínica, Infiltrado Inflamatorio, Satelitis e Infiltrado Perineural)	112
Tabla 9.	Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para las variables de grosor tumoral (Niveles de Clark e Índice de Breslow, con tinciones Hematoxilina-Eosina e Inmunohistoquímica)	113
Tabla 10.	Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para las variables histopatológicas pronósticas (Ulceración e Índice de Mitosis)	114
Tabla 11.	Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para la variable Marcadores Inmunohistoquímicos (S 100, HMB 45 y MELAN A)	114
Tabla 12.	Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para la variable Supervivencia	115
Tabla 13.	Resumen de la tabulación cruzada entre las variables demográficas (género/edad) y Localización de la lesión	115

Tabla 14.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables demográficas (género/edad) y Clasificación Histopatológica	116
Tabla 15.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables demográficas (género/edad) y Elastosis Actínica	117
Tabla 16.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables demográficas (género/edad) y Supervivencia	118
Tabla 17.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables demográficas (género/edad) y Marcadores Inmunohistoquímicos	119
Tabla 18.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables Localización de la lesión y Clasificación Histopatológica	120
Tabla 19.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables Localización de la lesión y Elastosis Actínica	120
Tabla 20.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables Localización de la lesión y Ulceración	121
Tabla 21.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables Clasificación Histopatológica y Fase de Crecimiento	121
Tabla 22.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables Fase de Crecimiento-Clasificación Histopatológica y Supervivencia	122
Tabla 23.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables Fase de Crecimiento-Clasificación Histopatológica y Niveles de Clark	123
Tabla 24.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables Fase de Crecimiento-Clasificación Histopatológica e Índice de Breslow con tinción Hematoxilina-Eosina	124
Tabla 25.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables Fase de Crecimiento-Clasificación Histopatológica e Índice de Breslow con tinción Inmunohistoquímica	125
Tabla 26.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables Clasificación Histopatológica y Marcadores Inmunohistoquímicos	126
Tabla 27.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables Niveles de Clark e Índice de Breslow con tinción Hematoxilina-Eosina	126
Tabla 28.	Resumen de la tabulación cruzada entre variables Niveles de Clark e Índice de Breslow con tinción Inmunohistoquímica	127
Tabla 29.	Matriz de correlaciones y significancia estadística entre las variables analizadas en este estudio	127
Tabla 30.	Matriz de correlaciones y significancia estadística entre todas las variables analizadas en este estudio	128

Tabla 31.	Resumen de las medidas de adecuación de muestreo para todas las variables analizadas en este estudio	129
Tabla 32.	Varianza explicada en el PCA realizado con todas las variables analizadas en este estudio	129
Tabla 33.	Matriz de correlaciones y significancia estadística entre las variables Histopatológicas y Marcadores Inmunohistoquímicos ..	130
Tabla 34.	Resumen de las medidas de adecuación de muestreo para las variables Histopatológicas y Marcadores Inmunohistoquímicos ..	131
Tabla 35.	Varianza explicada en el PCA realizado con las variables Histopatológicas y Marcadores Inmunohistoquímicos	131
Tabla 36.	Matriz de correlaciones y significancia estadística entre las variables Histopatológicas-Pronósticas, Supervivencia y Marcadores Inmunohistoquímicos	132
Tabla 37.	Resumen de las medidas de adecuación de muestreo para las variables Histopatológicas - Pronósticas, Supervivencia y Marcadores Inmunohistoquímicos	132
Tabla 38.	Varianza explicada en el PCA entre las variables Histopatológicas-Pronósticas, Supervivencia y Marcadores Inmunohistoquímicos	133

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

Fotografía 1.	Histología del melanoma: células gigantes, vacuolas intranucleares, nucléolos marcados y amplio citoplasma	134
Fotografía 2.	Marcador HMB-45 positivo en melanoma tipo lentigo maligno con fase de crecimiento radial	134
Fotografía 3.	Variante nodular de melanoma	135
Fotografía 4.	Elastosis actínica severa	135
Fotografía 5.	Reacción inflamatoria intensa rodeando células tumorales.....	136
Fotografía 6.	Invasión perineural de melanocitos malignos	136
Fotografía 7.	Compromiso del paquete vasculo-nervioso dérmico por células tumorales	137
Fotografía 8.	Invasión tumoral en todo el espesor de la piel y ulceración	137
Fotografía 9.	Mitosis entre células tumorales con tinción hematoxilina-eosina	138
Fotografía 10.	Marcador S-100 negativo y B. Marcador HMB-45 positivo	138
Fotografía 11.	Positividad de los tres marcadores inmunohistoquímicos en la misma muestra histológica	139
Fotografía 12.	Histología difusa y distribución homogénea de pigmento melánico	140
Fotografía 13.	Melanoma nodular de células claras, tinción hematoxilina-eosina	140
Fotografía 14.	Invasión vascular y trombo tumoral de melanocitos malignos	141
Fotografía 15.	Granuloma con células melanocíticas malignas gigantes multinucleadas	141
Fotografía 16.	Epidermotropismo en melanoma maligno con el marcador S-100	142
Fotografía 17.	Islotes de pigmento melánico en queratina de piel acral	142
Fotografía 18.	Acumulación hemática entre la capa córnea, diagnóstico diferencial de lesiones pigmentadas acrales	143
Fotografía 19.	Muestra no valorable, no se evidencia diferenciación de las capas de la piel	143
Fotografía 20.	Delimitación macroscópica tumoral con el marcador inmunohistoquímico HMB-45	144

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo para tinción inmunohistoquímica manual y automatizado de Roche®	145
ANEXO 2. Consentimiento In formado del CEPI	150
ANEXO 3. Herramienta de Recopilación de datos para Melanoma	152

RESUMEN

UTILIDAD DE MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS (S-100, HMB-45 Y MELAN-A), Y RELACIÓN ENTRE CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS, LOCALIZACIÓN DE LA LESIÓN Y SUPERVIVENCIA DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE MELANOMA MALIGNO EN EL CENTRO DE LA PIEL (CEPI), DURANTE ENERO 2012 A SEPTIEMBRE 2015.

Dayana Pita y Karina Rosillo

El melanoma maligno cutáneo constituye el 1,2% de todos los casos nuevos de cáncer en el mundo con 700.000 casos nuevos diagnosticados al año. Dentro de los tumores de piel el melanoma maligno es el menos común ocupando el 10% de todos los tipos de cáncer de piel. El Ecuador ocupa el trigésimo sexto puesto a nivel mundial en la incidencia de melanoma, siendo los primeros puestos para, Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos. La inmunohistoquímica es una herramienta diagnóstica fundamental en dermatopatología, dirigida hacia la determinación de la estirpe o la diferenciación de las neoplasias. Uno de los marcadores, reconoce a la proteína S-100, que se encuentra ampliamente distribuida en el sistema nervioso y dependiendo la subunidad por la que está constituida, se expresa en distintas células. Los anticuerpos MELAN-A y HMB-45 tienen alta sensibilidad y especificidad para melanocitos, nevus y otros tipos de melanomas, debido a que reconocen al grupo de proteínas gp-100/Pmel-17 específicas de los melanosomas.

El objetivo de este estudio fue determinar la utilidad de los marcadores inmunohistoquímicos (S-100, HMB-45, MELAN-A), y la relación entre características histopatológicas, localización de la lesión y supervivencia de pacientes diagnosticados de melanoma maligno en el Centro de la Piel (CEPI).

Se utilizaron 25 historias clínicas, placas e informes histopatológicos y bloques de parafina, de pacientes previamente diagnosticados de melanoma maligno en el Centro de la Piel. Se realizaron inmunotinciones con los marcadores S-100, MELAN-A y HMB-45 en nuevos cortes extraídos de los bloques de parafina. Los resultados fueron analizados en el programa estadístico SPSS 20, mediante frecuencias, tablas de contingencia y Análisis de Componentes Principales (PCA). La localización predominante fue cabeza y cuello con un 64% y se observó mayor frecuencia del tipo histopatológico lentigo maligno (40%). La proteína S-100 tuvo 92% de positivos y 8% negativos, el HMB-45 el 100% fueron positivos, y el MELAN-A se obtuvo 96% positivos y 4% negativos. Se realizó un PCA donde observamos agrupaciones entre algunas variables, entre estas: grupo etario y localización de la lesión ($CC = -0,376$, $p = 0,032$), Breslow HE con el índice de Breslow IHQ ($CC = 0,878$; $p \leq 0,001$), asociación de la supervivencia con los niveles de Clark ($CC = 0,344$, $p = 0,046$), el índice de Breslow tinción IHQ ($CC = 0,425$, $p = 0,017$) y la ulceración ($CC = -0,471$, $p = 0,009$).

Concluimos que los marcadores inmunohistoquímicos son útiles para la confirmación diagnóstica de melanoma maligno cutáneo, teniendo en cuenta que el resultado positivo o negativo de un solo marcador, no confirma ni excluye el diagnóstico de melanoma, por lo que deben ser usados de manera conjunta. La tinción hematoxilina-eosina debe ser la primera herramienta usada para determinar las características histopatológicas de una lesión sugerente de melanoma, sin embargo, se debe utilizar la inmunohistoquímica para confirmación diagnóstica y en casos de lesiones malignas desde etapas tempranas, debido a que facilita el reconocimiento neoplásico en tejido con escasa afectación tisular. Además, se observó una diferencia significativa entre el índice de Breslow con tinción inmunohistoquímica y con tinción hematoxilina-eosina, siendo herramienta importante para reportar una medición más precisa del grosor tumoral.

ABSTRACT

**UTILITY OF IMMUNOHISTOCHEMICAL MARKERS (S-100, HMB-45 AND MELAN-A),
AND THE RELATIONSHIP BETWEEN HISTOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS,
LOCATION OF THE INJURY AND SURVIVAL IN PATIENTS DIAGNOSED WITH
MALIGNANT MELANOMA IN THE CENTER OF THE SKIN (CEPI), IN JANUARY 2012
SEPTEMBER 2015.**

Dayana Pita & Karina Rosillo

Cutaneous malignant melanoma is 1.2% of all new cases of cancer worldwide with 700,000 new cases diagnosed annually. In skin tumors, malignant melanoma is the least common, occupying 10% of all types of skin cancer. Ecuador ranks the thirty sixth place worldwide in the incidence of melanoma, being the top for Australia, New Zealand and the United States. Immunohistochemistry is a fundamental diagnostic tool in dermatopathology, aimed at determining the lineage or neoplastic differentiation. One of immunohistochemical markers, recognizes the S-100 protein, which is widely distributed in the nervous system and depending of the subunit which is constituted, it is expressed in different cells. The Melan-A and HMB-45 antibodies have high sensitivity and specificity for melanocytes, nevus and other types of melanomas, because they recognize the group of proteins gp-100/Pmel-17, specific of melanosomes.

The aim of this study was to determine the utility of immunohistochemical markers (S-100, HMB-45, Melan-A), and the relationship between histopathological characteristics, location of the injury and survival of patients diagnosed with malignant melanoma in the center of the skin (Centro de la Piel, CEPI).

25 medical records, pathology reports and slides, and paraffin blocks of patients previously diagnosed with malignant melanoma in Centro de la Piel were used. Immunostaining were conducted with S-100, Melan-A, and HMB-45 markers in new cuts extracted from paraffin blocks. The results were analyzed in the statistical program SPSS 20, using frequencies, contingency tables and Principal Component Analysis (PCA). The predominant location was head and neck with 64% and higher frequency of lentigo malignant histopathologic type (40%) was observed. The S-100 protein was positive 92% and negative 8% , HMB-45 were positive 100%, and Melan-A was positive 96% and negative 4%.

Principal component analysis (PCA) was performed, where we observed associations between some variables like: age group and lesion location (CC = -0.376, $p = 0.032$), HE Breslow index and IHQ Breslow index (CC = 0.878; $p \leq 0.001$). Also between survival association with Clark levels (CC = 0.344, $p = 0.046$), IHQ Breslow index (CC = 0.425, $p = 0.017$) and ulceration (CC = -0.471, $p = 0.009$).

We conclude that immunohistochemical markers are useful for diagnostic confirmation of cutaneous malignant melanoma, considering that a positive or negative result of a single marker, does not confirm nor exclude the diagnosis of melanoma, so they must be used together. The hematoxylin-eosin staining should be the first tool used to determine the histopathologic features of melanoma suggestive lesions, however, immunohistochemistry must be used for diagnostic confirmation, and, in malignant lesions from early stages, because facilitates neoplastic cells recognition in minimal damage tissue. In addition, a significant difference between Breslow index with immunohistochemical staining and hematoxylin-eosin staining was observed, being an important tool to report more accurate measurements of tumor thickness.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

El melanoma maligno se define como la proliferación neoplásica maligna originada en los melanocitos de la epidermis. Los melanocitos son células productoras de melanina, responsables de la pigmentación de la piel, éstos derivan embriológicamente de las células pluripotenciales de la cresta neural. Es el motivo por el cual, aunque este tumor suele desarrollarse en la piel, en raras ocasiones puede hacerlo en otras localizaciones como los epitelios de las mucosas, en la retina, en las leptomeninges y en otros sitios en los cuales sus células deriven del mismo origen embriológico. Los melanocitos no tienen un patrón de tejido como el resto de células epidérmicas y no poseen estructuras de contacto intercelular como ellas, por lo que muestran tendencia a la separación después de la mitosis; esta característica biológica podría explicar la tendencia a la diseminación precoz de las células tumorales. ⁽¹⁾⁽²⁾

En condiciones normales, los melanocitos contactan con los queratinocitos por medio de sus dendritas, existiendo un melanocito por cada 5-6 queratinocitos basales, formando así la unidad melánica epidérmica. La densidad de los melanocitos es variable dependiendo de la región anatómica, va de alrededor de 550 a más de 1200 melanocitos/mm² (mayor en la región genital, cara y areola mamaria). ⁽³⁾

Epidemiológicamente, en el desarrollo del melanoma; se ha comprobado la importancia de la exposición solar y la predisposición genética. En muchos países occidentales, desde principios de los años 60; la incidencia y mortalidad han aumentado de forma espectacular. En las últimas décadas se ha detectado un aumento sostenido de la incidencia del melanoma, entre un 3-7% anual. Aunque la cifra varía de un país a otro, las estimaciones más recientes sugieren una duplicación de la incidencia cada 10-20 años. ⁽⁴⁾

El melanoma maligno cutáneo constituye el 1,2% de todos los casos nuevos de cáncer en el mundo con 700.000 casos nuevos diagnosticados al año, según los datos publicados por la International Agency for Research on Cancer (IARC) en Cancer Incidence in Five Continents, durante el periodo 1978-2002. El aumento de la incidencia de melanoma se observó en ambos sexos y los mayores incrementos se registraron para el melanoma del tronco, en los hombres, y para el de las extremidades, en las mujeres que siguen siendo las zonas corporales prevalentes en cada sexo. Los melanomas de cabeza y cuello han aumentado su incidencia global. La incidencia de melanoma sigue siendo mayor en personas mayores de 50 años. Este comportamiento se mantuvo para Europa, Norteamérica y Suramérica. ⁽⁵⁾⁽⁶⁾

Dentro de los tumores de piel el melanoma maligno es menos común que el carcinoma espinocelular y basocelular, pero tiene un peor pronóstico, ocupando el 10% de todos los tipos de cáncer de piel.

Según la “International Agency for Research on Cancer 2013” el Ecuador ocupa el trigésimo sexto puesto a nivel mundial en la incidencia de melanoma, siendo los primeros puestos para, Australia, Nueva Zelanda y Estados Unidos, debido a que el porcentaje en individuos de raza caucásica es muy alto. ⁽⁵⁾

En las estadísticas realizadas por el Registro Nacional de Tumores SOLCA en los residentes de la ciudad de Quito, desde el año 2006 hasta el 2010, se ha visto un incremento paulatino en la incidencia estandarizada de melanoma maligno, de hasta 0.9 por cada 100.000 habitantes en hombres, y 0.1 por cada 100.000 habitantes en mujeres. Estos datos han cambiado el patrón que se mantuvo desde 1986 hasta el 2005, en donde la tasa de incidencia era mayor para el género femenino. ⁽⁷⁾

Contradictoriamente con estadísticas mundiales el melanoma maligno en Ecuador se presenta con mayor frecuencia en pacientes femeninas mayores de 65 años a razón de

1:0.8 en comparación con los hombres. El aumento en la tasa cruda de mortalidad ha sido de 0.3 en 1986 a 1.4 en el 2010 en ambos sexos, sin predominio significativo. ⁽⁷⁾

El melanoma maligno constituye el 10% de los cánceres cutáneos, pero ocasiona el 65% de las muertes por esta causa. La supervivencia varía en función del estadiaje del tumor; a los 5 años en estadio I la supervivencia es superior al 90%; en estadio II, entre el 45-80%; en el estadio III entre el 25-70% y del 18.8% en el estadio IV. ⁽⁸⁾

Según la clasificación clínico-patológica del Melanoma (Clark 1960) tomada de la Dermatología de Fitzpatrick⁽³⁾, se describe los siguientes subtipos de melanoma:

Melanoma de extensión superficial (MES): es el tipo más común (70% de los casos), entre la cuarta y quinta década de vida. Generalmente es plano e irregular en forma y color, con sombras variables de negro y café. Puede ocurrir a cualquier edad y en cualquier parte del cuerpo y es más común en las personas de raza blanca. Se presenta principalmente en zonas expuestas de manera intermitente al sol sobre todo en extremidades inferiores en mujeres y en dorso en hombres. Se origina de Novo o en un nevus pre-existente. ⁽³⁾

Melanoma nodular (MN): Constituye alrededor del 15 a 30% de los casos en pacientes de aproximadamente 50 años. Aparece principalmente en tronco y extremidades, presenta exclusivamente fase de crecimiento vertical, lo cual condiciona su comportamiento agresivo. Generalmente empieza como un área elevada de color azul-negro oscuro o rojo-azulado, aunque algunos no tienen color. ⁽³⁾

Melanoma Lentigo maligno (LMM): Se presenta en aproximadamente el 10 al 15% entre los 70 y 80 años. Ocurre más comúnmente en la piel dañada por exposición acumulada al sol en la cara, el cuello y los brazos. Las áreas de piel anormal generalmente son grandes, planas y de color bronceado con manchas café entremezcladas. Presenta un lento crecimiento a expensas de una prolongada fase de crecimiento radial. Es comparativamente el tipo histológico de mejor pronóstico. ⁽³⁾

Melanoma lentiginoso acral (MAL): Es la forma menos común de melanoma en caucásicos, se presenta en el 2 a 8% de los pacientes de raza blanca y en el 60 al 72% en raza negra. La edad aproximada de aparición es a los 65 años. Generalmente ocurre en las palmas de las manos, las plantas de los pies o por debajo de las uñas y es más común en las personas de raza negra. Es importante destacar que tanto el tipo de extensión superficial como el nodular se pueden presentar en sitios acrales (distantes).⁽³⁾

Otras variedades de melanoma:

Melanoma de la mucosa: Las localizaciones más frecuentes son las superficies mucosas de la cabeza y el cuello (cavidades nasal, oral y retina) y la mucosa vulvar o anorrectal.⁽³⁾

Melanoma Desmoplásico-Neurotrópico: es un subtipo raro, agresivo y asociado a una tasa elevada de recurrencias locales. Se desarrolla con mayor frecuencia en la piel de la cabeza y el cuello expuesta al sol de individuos de edad avanzada, por lo general durante la sexta y la séptima décadas de la vida. Puede variar en su color, tiende a ser firme y se caracteriza por tener el aspecto de cicatriz por lo que se puede confundir con una cicatriz tipo quiste o queloide.⁽³⁾

El diagnóstico precoz de este tipo de tumor es de vital importancia para la disminución de la mortalidad, y debe iniciarse mediante inspección o exploración física, debido a que la apariencia macroscópica del tumor primario suele tener características propias lo que permite diagnosticar aproximadamente el 90% de los casos.⁽⁹⁾

La valoración clínica es fundamental para la detección precoz del melanoma, por lo que es importante conocer los antecedentes familiares como la historia personal de exposición solar y el fototipo cutáneo para determinar el comportamiento de la piel ante una exposición solar no protegida. El examen físico permite determinar los nevus con características clínicas de malignidad, valorando parámetros como: asimetría, bordes irregulares, variaciones en la coloración y diámetro del tumor medido en milímetros.

Generalmente el melanoma presenta un crecimiento asimétrico con márgenes irregulares, diversidad en color y pigmentación y crecimiento rápido con tamaño superior a 6mm. ⁽³⁾

Además del diagnóstico clínico, es necesario el uso de técnicas complementarias para llegar a la confirmación diagnóstica. Es fundamental el estudio histopatológico de lesiones con alta sospecha clínica de malignidad, en estos casos la biopsia debe ser tomada por dermatólogos entrenados y con criterios oncológicos. La biopsia escisional es el procedimiento de elección, ya que extirpa la lesión en su totalidad y permite un análisis detallado. El informe anatómo-patológico debe ser lo más completo posible incluyendo parámetros que van a incidir directamente en el pronóstico como: profundidad, que se basa en los niveles de Clark, establecidos en función de la invasión del tumor hacia las diferentes capas de la piel, y el índice de Breslow que determina el grosor tumoral en milímetros, la invasión vascular-linfática, perineural, satelitosis, índice de proliferación celular, etc. ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾

La inmunohistoquímica constituye en la actualidad una herramienta diagnóstica fundamental en dermatopatología. Se trata de un grupo de inmunotinciones que permiten demostrar una variedad de antígenos presentes en las células o los tejidos, utilizando anticuerpos marcados. Esta técnica se basa 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 que produce una coloración marrón característica. El uso de las técnicas inmunohistoquímicas va dirigido hacia la determinación de la estirpe o la diferenciación de las neoplasias. Además de distinguir entre una lesión benigna de una maligna, también puede ofrecer información acerca de algunos factores de gran importancia en terapias target. ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾

En la práctica clínica el diagnóstico de melanoma no puede estar basado en el resultado de un marcador inmunohistoquímico “*per se*”, además se conoce que la sensibilidad y especificidad de los marcadores aumentan al usarlos de manera conjunta, debido a las diferencias de sus características. Los resultados de la inmunohistoquímica dependen mucho de la calidad y manipulación del tejido desde el mismo momento en que fue extirpada la lesión o parte de ella, la estandarización de protocolos de manejo y del entrenamiento del especialista. Los marcadores más utilizados en el reconocimiento de neoplasias melanocíticas son: proteína S-100, HMB-45 y MELAN-A.

La proteína S-100 es una proteína acida que se encuentra ampliamente distribuida en el sistema nervioso central y periférico. Dependiendo la subunidad por la que está constituida, se expresa en distintas células. La subunidad $\alpha\alpha$ se expresa en el músculo, la $\alpha\beta$ en los melanocitos, células de la glía, condrocitos y células mioepiteliales, y la $\beta\beta$ en las células de Langerhans y células de Schwann. ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾

En la práctica general los anticuerpos reconocen a los 3 isotipos de la proteína, para que sea usado satisfactoriamente como una herramienta de alta sensibilidad, capaz de detectar todas las células que contienen a la proteína S-100, es por eso que se considera que más del 98% de casos de melanoma maligno son S-100 positivos. ⁽¹²⁾⁽¹³⁾

Los anticuerpos MELAN-A y HMB-45 reconocen al grupo de proteínas gp-100/Pmel-17 de los melanosomas y han demostrado tener varios niveles de sensibilidad y especificidad para melanocitos, nevus y otros tipos de melanomas, así como también de otras líneas celulares y tumorales. En la práctica éstos marcadores han sido mayormente utilizados como agentes confirmatorios de la positividad del S-100 en neoplasias melanocíticas. ⁽¹²⁾

El HMB-45 es un anticuerpo monoclonal que actúa al unirse con la glucoproteína gp-100 del premelanosoma, anteriormente mencionado. Su función es identificar a melanocitos

inmaduros, activados e intraepidérmicos. Es un marcador más específico que la proteína S-100 pero menos sensible. Una característica importante a considerar de ese marcador es que puede generar reacción positiva en nevus benignos, nevus de Spitz y en melanocitos que se superponen a una cicatriz. El HMB45 tiene una sensibilidad del 78 al 93% siendo un marcador útil en la confirmación del diagnóstico de melanoma en caso de malignidad con histogénesis dudosa o lesiones metastásicas donde el melanoma forma parte del diagnóstico diferencial. ⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽¹²⁾

El MELAN-A es una proteína que forma parte de la membrana del premelanosoma, producto del gen MART-1, se expresa en melanocitos normales, nevus y melanomas, además de células retinales, corteza suprarrenal, ovario y células de Leydig del testículo. Su tinción es más intensa que la de la proteína S-100, y juntas potencian la capacidad de diferenciación de la estirpe melanocítica. ⁽¹⁰⁾⁽¹⁴⁾

Este marcador es el más utilizado para demostrar la estirpe de una neoplasia melanocítica por lo que se considera más sensible que el HBM45 y más específico que la proteína S100. ⁽³⁾

El rápido aumento de incidencia de melanoma, junto con su naturaleza metastásica altamente agresiva, nos obliga a conocer las nuevas herramientas diagnósticas, haciendo de la inmunohistoquímica un área activa y necesaria para la investigación.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES DE LA PIEL

La piel es un órgano extenso y complejo que protege al huésped del medio ambiente y al mismo tiempo cumple funciones indispensables. Mide aproximadamente 2 metros dependiendo de la talla y el peso de la persona, y pesa alrededor de 4kg, suponiendo el 6% de peso corporal total. Es mucho más que una barrera impenetrable contra agentes externos, se encarga de la termorregulación, sensación, protección ultravioleta, reparación y regeneración de heridas y determina la apariencia física de una persona influenciada por la pigmentación generada por los melanocitos. Mantiene el equilibrio de los fluidos corporales debido a que actúa como una barrera que impide la pérdida de líquidos a través de la misma, controla la percepción de los agentes externos que ingresan al organismo a través del tacto, presión, temperatura y receptores del dolor. Todas estas funciones son mediadas por la acción dinámica de sus capas: epidermis, dermis e hipodermis, las mismas que derivan de diferentes orígenes embriológicos proporcionándoles células y características morfo-funcionales propias. ⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾

Embriológicamente la piel tiene un origen doble, la epidermis que es la capa más superficial, se origina del ectodermo superficial y la dermis del mesénquima subyacente. La diferenciación embriológica de los estratos de la epidermis empieza a las 8 semanas de gestación desde una capa única de células ectodérmicas que se dividen y forman el peridermo o epitriquio, constituido por células aplanadas que se depositan en la superficie. Ésta proliferación de células continua hasta dar lugar a una tercera capa intermedia, y al final del cuarto mes la epidermis toma su estructura definitiva diferenciándose en 4 capas: capa basal o germinativa, espinosa, granulosa y córnea.

⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾

La queratinización inicia entre las 22 a 24 semanas desde la cabeza, cara, palmas y plantas. La cantidad de queratinocitos aumenta durante varias semanas hasta lograr la diferenciación final de las capas epidérmicas alrededor de la mitad del tercer trimestre, adquiriendo así las características de la piel del adulto. ⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾

Anatómicamente la epidermis (Figura 1) es la capa más superficial, presenta un epitelio plano estratificado queratinizado que tapiza la totalidad de la superficie corporal. Tiene gran variedad de células y presenta un espesor variable que va de 0.4 mm a 1.5 en la mayor parte del cuerpo y de 1.5mm a 4mm en zonas con piel gruesa como las palmas, codos y plantas de los pies. Se trata de un epitelio que se regenera continuamente y facilita el desarrollo de anexos como la unidad pilosebácea, uñas y glándulas sudoríparas. ⁽¹⁵⁾

Las células que componen la epidermis se dividen en queratinocitos o células no dendríticas, predominantes en esta capa, conformando el 80% de las células de la piel; y células dendríticas representadas principalmente por los melanocitos (10% de las células epidérmicas) que se ubican sobre todo en la capa basal de la epidermis. ⁽¹⁵⁾

La epidermis tiene subcapas, de afuera hacia adentro son: córnea, lúcida, granulosa, espinosa y basal. En el estrato basal y espinoso, se da la división mitótica para la formación de nuevas células que ocuparán los espacios erosionados de la capa córnea, por eso se las considera conjuntamente como una capa germinativa. En la basal, lugar de la unión dermo-epidérmica, se encuentra la melanina, pigmento normal de la piel. En la capa granulosa se sintetiza la queratohialina, precursora de la queratina, que se acumula en gránulos dentro del citoplasma celular, por eso su nombre. La capa lúcida se encuentra solamente en partes gruesas de la piel, no en la piel delgada. Finalmente en la parte más superficial de la epidermis se encuentra el estrato córneo, formado por células aplanadas ubicadas una sobre otra fuertemente empaquetadas en varias filas de células que carecen de núcleo y presentan casi exclusivamente filamentos de queratina,

formando haces denominados monofilamentos. Las filas más superficiales se van descamando, generando así un proceso de desgaste y regeneración de la epidermis que dura aproximadamente 30 días desde la división celular hasta la descamación de las mismas. ⁽¹⁵⁾

Dentro de las células dendríticas de la epidermis se encuentran los melanocitos, encargados de la síntesis de melanina que dan el pigmento a la piel; las células de Langerhans que forman parte del sistema inmune, ubicadas principalmente en las capas basal, espinosa y granulosa, representan del 2 al 8% de las células epidérmicas y son las encargadas del procesamiento y presentación de antígenos a los linfocitos T de la epidermis. Las células de Meckel son células sensoriales ubicadas en zonas de alta sensibilidad táctil, distribuidas entre los queratinocitos basales y cercanas a una terminación nerviosa, debido a que envían estímulos para transmitir la información del tacto, éstas se encuentran en zonas particulares de la piel como improntas digitales, regiones vellosas, labios, ciertas zonas de la cavidad oral y en las raíces de folículos capilares. ⁽³⁾⁽¹⁵⁾

Por debajo de la epidermis está la dermis, capa integrada por elementos fibrosos, filamentosos y conectivos, encargada de dar estabilidad a la red nerviosa, vascular y a los anexos cutáneos. En ésta se encuentran varios tipos de células residentes como macrófagos, fibroblastos, mastocitos y células circulantes del sistema inmune. La dermis provee elasticidad y resistencia a la piel, brinda permeabilidad y forma un escudo protector contra daños mecánicos y térmicos. Además interactúa con la epidermis para mantener la integridad de ambos tejidos y colabora con la formación y mantenimiento de la unión dermo-epidérmica. Se encarga también de regular la reparación y remodelamiento de la piel. ⁽³⁾

La dermis está dividida en dos partes: la parte superior o dermis papilar y la inferior o dermis reticular, separadas por una red horizontal de vasos sanguíneos denominada

plexo subpapilar. La dermis papilar es la que rodea y se amolda al contorno de la epidermis. Y la dermis reticular está conformada principalmente por fibras elásticas y de colágeno, que en individuos normales crecerán progresivamente hasta llegar a la hipodermis. El límite inferior de la capa reticular se distingue por el cambio de tejido conectivo fibroso a tejido conectivo adiposo, correspondiente a la hipodermis. ⁽³⁾

La hipodermis, subcutis o tejido celular subcutáneo está formado por adipocitos, células que actúan como reserva energética, proveen amortiguamiento y protección a la piel.

A pesar de su clara distinción anatómica con la epidermis y dermis, estas capas están estructural y funcionalmente integradas a través de nervios, vasos sanguíneos y la continuidad de los anexos de la epidermis. ⁽³⁾

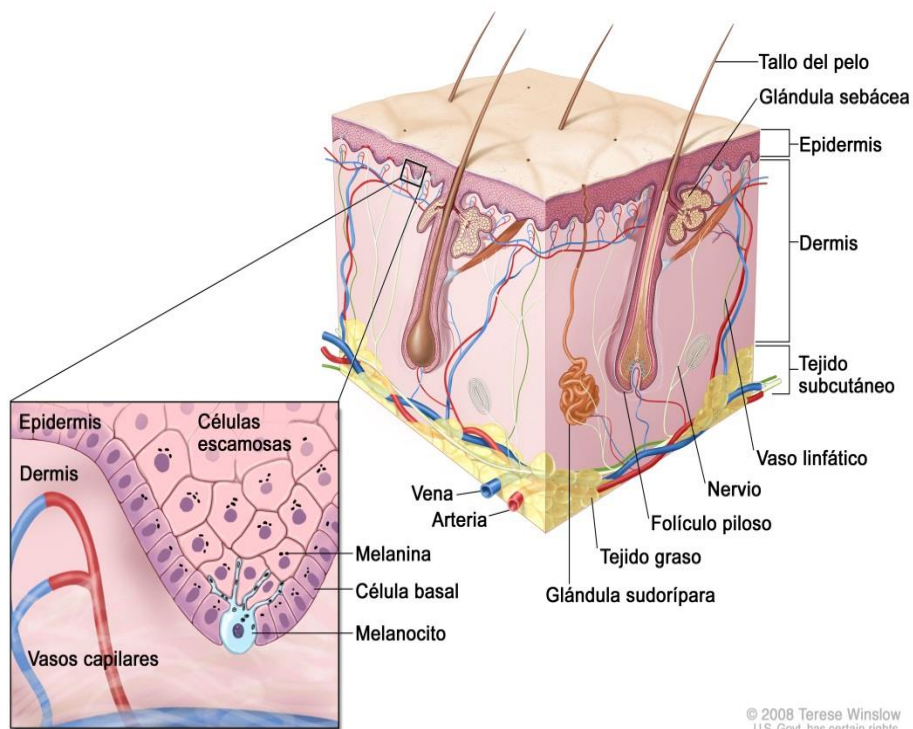


Figura 1. Anatomía de la Piel

Tomado de: Cure and Cancer Health [Internet]. Estados Unidos: Intellisphere LCC; 2015 [citado 15 oct 2015]. Disponible en: <http://www.curetoday.com/tumor/unknownprimaries/treatment/cdr0000256816>

2.2. MELANOCITOS

2.2.1. GENERALIDADES

Los melanocitos son células no queratinocíticas derivadas de la cresta neural encargadas de la síntesis de melanina, que residen inicialmente sobre la membrana basal.

Microscópicamente se las puede distinguir por su citoplasma pálido, un núcleo ovoide y sobre todo por el melanosoma, estructura distintiva del melanocito que se encarga de almacenar el pigmento melánico. ⁽³⁾

En condiciones normales, los melanocitos contactan con los queratinocitos por medio de sus dendritas, existiendo un melanocito por cada 5-6 queratinocitos basales, formando así la unidad melánica epidérmica. Los melanocitos sintetizan melanina que se almacena en los melanosomas, los mismos que son transportados a los queratinocitos a través de sus procesos dendríticos. Debido a que la descamación de los queratinocitos es constante, la transferencia de los melanosomas a los queratinocitos, debe permanecer igualmente constante para permitir la pigmentación cutánea. Esta interacción con los queratinocitos es fundamental para mantener la homeostasis de los melanocitos, así como su diferenciación, proliferación, supervivencia y procesos de melanogénesis.

La densidad de los melanocitos es variable dependiendo de la región anatómica, va de alrededor de 550 a más de 1200 melanocitos/mm² (mayor en la región genital, cara y areola mamaria), pero es muy constante entre los individuos de las diferentes razas. ⁽³⁾

La pigmentación cutánea no depende de la cantidad de melanocitos, sino de la actividad melanogénica, el tamaño de los melanosomas y de su distribución y transferencia hacia los queratinocitos; es así que en personas de piel clara, los melanosomas son de menor tamaño y se localizan agrupados dentro de los queratinocitos, mientras que en las poblaciones de piel más oscura, son más grandes, oscuros y dispersos entre los queratinocitos. ⁽³⁾

2.2.2. DESARROLLO EMBRIOLÓGICO DE LOS MELANOCITOS

Los melanocitos se originan de células pluripotenciales que derivan de la cresta neural. Estas células madre se caracterizan por su capacidad de diferenciarse en varios tipos celulares como: neuronas, células de la glía, músculo liso, hueso cráneo facial y cartílago; son células latentes que suelen agruparse en nichos, rodeadas de células diferenciadas que intervienen en su conducta gracias a la acción de citocinas y factores de crecimiento. Las células madre de los melanocitos residen en el bulbo del folículo piloso desde donde migran hacia epidermis o hacia los mismos folículos pilosos para diferenciarse y especializarse. Expresan marcadores de la cresta neural como factores de transcripción Sox10 y Pax5, que intervienen posteriormente en la regulación del Mitf y el TRP-2. ⁽³⁾

Los melanoblastos, células progenitoras de los melanocitos, migran desde la parte dorsal del tubo neural, en sentido dorso lateral entre las capas mesodérmica y ectodérmica hacia los folículos pilosos y la piel, hacia la cóclea del oído interno, coroides, cuerpo ciliar y el iris. ⁽¹⁷⁾

Los melanocitos propiamente se encuentran en la epidermis desde la mitad del primer trimestre, llegando a ser funcionales hacia finales del segundo trimestre. La producción de melanina comienza al 3-4 mes de gestación en los melanosomas. A medida que los melanosomas se acumulan, son transportados hacia los procesos dendríticos de los melanocitos y alrededor del quinto mes son transferidos a los queratinocitos de la epidermis y folículos pilosos para dar la pigmentación de la piel y el pelo. ⁽¹⁷⁾⁽¹⁸⁾

2.2.2.1. De Melanoblastos a Melanocitos

Existen moléculas de señalización de células vecinas, que influyen en la migración de melanoblastos y diferenciación a melanocitos, a través de receptores celulares específicos que inducen señalización nuclear para influir en la transcripción de genes y síntesis de proteínas. Estas son:

- **Wnt (Wingless-type mamary tumor virus integration – site family):** Es una familia de 16 glucoproteínas que se encarga de la maduración, diferenciación y migración de las células pluripotenciales a melanoblastos, debido a que se une y activa a Frizzled, un receptor que inhibe a la enzima glucógeno sintetasa cinasa 3B (GSK3B) produciendo la acumulación de B-catenina citosólica. Cuando Frizzled está inactivo, forma complejos con la B-catenina para degradarla mediante la ubiquitina de B-catenina. La B-catenina acumulada se transloca al núcleo e induce la formación del factor de transcripción asociado a microftalmía (Mitf), colaborador en la diferenciación de melanoblastos debido a la transcripción de tres enzimas: tirosinasa, proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP-1) y cromo tautomerasa (TRP-2). ⁽³⁾⁽¹⁹⁾
- **Proteínas Morfogénicas Óseas (BMP):** son antagonistas de Wnt y suprimen la diferenciación de células de la cresta neural a melanoblastos. ⁽³⁾⁽¹⁸⁾
- **Endotelinas (ET):** están compuestas por tres miembros: ET1, ET2, ET3. Se unen y activan a los receptores Ednr A y B. ET3 se sintetiza en células ectodérmicas, se une y activa al receptor Ednr-B para permitir la migración dorso lateral de los melanoblastos, además de la correcta proliferación y supervivencia de los mismos. ⁽³⁾⁽²⁰⁾
- **Factor Steel (SF):** es una citocina expresada en los queratinocitos epidérmicos que se une y activa al receptor tirosinasa transmembrana c-kit presente en los melanoblastos, para intervenir en el desarrollo temprano de los mismos, iniciando así la migración hacia su destino final. ⁽²¹⁾
- **Factor De Crecimiento De Hepatocitos (HGF):** se une al receptor tirosinasa transmembrana Met para inducir la proliferación de melanoblastos y la diferenciación

a melanocitos maduros; además regula la expresión de cadherinas en los melanocitos. ⁽³⁾⁽¹⁸⁾

- **Cadherinas (E, P y N):** son glucoproteínas transmembrana que adquieren su función dependiendo del subtipo que sean. En los melanoblastos, se unen a la B-catenina por su dominio citoplasmático. El subtipo E-cadherina expresada en queratinocitos y melanocitos de la epidermis, suprime la proliferación excesiva de melanocitos en la epidermis, aunque en ocasiones, algunos melanocitos epidérmicos alternan E-cadherina por N-cadherina, lo que les permite escapar de la supresión de los queratinocitos para lograr proliferar y agruparse formando nevus. ⁽³⁾⁽²²⁾ (Figura 2).

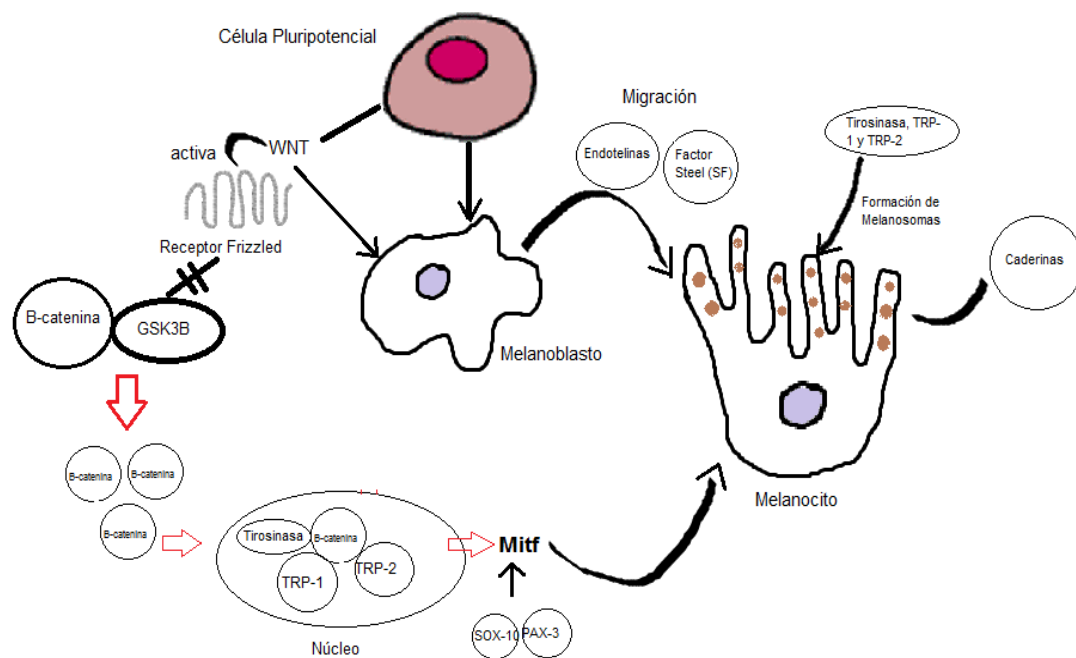


Figura 2. Desarrollo embrológico del melanocito.

Se origina de una célula pluripotencial, por acción de WNT que activa al receptor Frizzled para inhibir a la enzima GSK3B. Esto libera la B-catenina para ingresar al núcleo e intervenir en la transcripción de Mitf, que interviene en el desarrollo del melanoblasto, para posteriormente por acción de endotelinas y SF, madurar a melanocito. WNT: Wingless-type mamary tumor virus integration, GSK3B: enzima glucógeno sintetasa cinasa 3B. TRP-1, TRP-2: Proteínas Relacionadas Con Tirosinasa, SF: Factor Steel.

Realizado por: Dayana Pita y Karina Rosillo.

2.2.3. LOS MELANOSOMAS: ORGANELOS IMPORTANTES PARA LA PIGMENTACIÓN.

“La pigmentación, síntesis y distribución de la melanina por la epidermis implica varios pasos: transcripción de proteínas requeridas para la melanogénesis, biogénesis de los melanosomas, asignación de las proteínas melanogénicas a los melanosomas, transporte de los melanosomas a los extremos de las dendritas del melanocito y transferencia de los melanosomas a los queratinocitos. La alteración de cualquiera de estos procesos causa hipopigmentación.”⁽³⁾

Los melanosomas son los organelos citoplasmáticos que se encuentran adheridos a la membrana del melanocito en donde se produce la síntesis de la melanina. Según el tipo de melanina sintetizada hay dos tipos: eumelanosomas y feomelanosomas. Los eumelanosomas tienen forma elíptica, son grandes y contienen una matriz glucoproteica estructurada para la síntesis de eumelanina. Los feomelanosomas son pequeños, con forma esférica y tienen una matriz desorganizada.⁽¹⁹⁾

Los melanosomas tienen cuatro estadios de maduración (Figura 3). Estadio I o pre melanosomas: tienen matriz amorfa y vesículas formadas por invaginación de la membrana, se forman en el retículo endoplásmico (RE) y ya tienen las proteínas melanosómicas Pmel17 (gp100) y MART-1. Los eumelanosomas en estadio II ya tienen matriz estructurada pero no sintetizan melanina, sin embargo, ya está presente la enzima tirosinasa formando complejos con TRP-1 (proteína relacionada con tirosinasa 1, de la cual se hablará más adelante); a diferencia de los feomelanosomas estadio II los cuales ya sintetizan melanina. Se evidencia depósito de melanina en la matriz fibrilar en los eumelanosomas estadio III y en el estadio IV ya se encuentran totalmente melanizados, por lo tanto pigmentados.⁽³⁾⁽¹⁹⁾

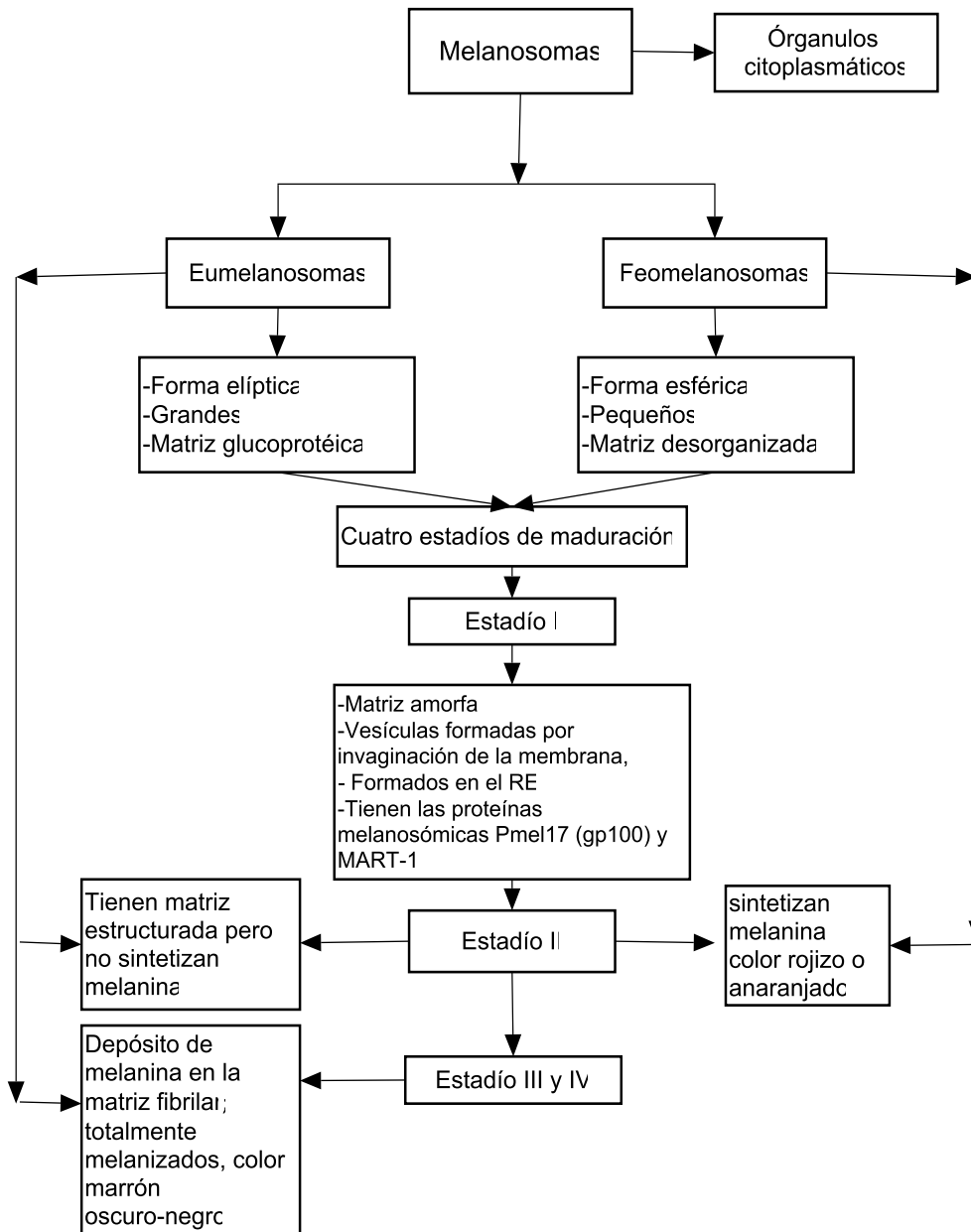


Figura 3. Flujograma de los tipos de melanosomas normales (feomelanosomas y eumelanosomas).

RE: retículo endoplasmático. Pmel17: conocida también como gp100, proteína estructural, sintetizada como una proteína precursora en el retículo endoplasmático y su transcripción esta inducida por la hormona estimulante de melanocitos- α (MSH). MART-1: proteína presente en la membrana de los melanosomas en estadio I y II que forma un complejo con Pmel17 e incide en su expresión, estabilidad y procesamiento
 Realizado por: Dayana Pita y Karina Rosillo.

2.2.3.1. Proteínas Asociadas a la Formación de Melanosomas

Existe un proceso de asignación adecuada y organizada de enzimas y proteínas melanogénicas además de proteínas estructurales y reguladoras hacia los melanosomas, con el fin de lograr su maduración. Dentro de las enzimas melanogénicas tenemos:

- **Enzima Tirosinasa:** se sintetiza en el RE como una proteína precursora que sufre glucosilación para ser activada. Posteriormente es plegada y empaquetada con TRP-1 para formar complejos que serán utilizados en la maduración y cambios de estadio de los melanosomas. La tirosinasa se encuentra en la membrana externa del melanosoma y tiene tres dominios: interno, transmembrana y citoplasmático. El interno representa el 90% de la proteína y contiene la región catalítica que se une a iones cobre, necesarios para la actividad de la tirosinasa. El dominio citoplasmático se encarga del tráfico apropiado de tirosina hacia los melanosomas, además, se fosforilan 2 residuos de serina de este dominio mediante la enzima proteincinasa C- β (PKC- β) con el fin de activar a la tirosinasa que catalizará la biosíntesis de la melanina. Sin estos procedimientos, no existiría la pigmentación. ⁽¹⁹⁾
- **Proteínas Relacionadas Con Tirosinasa (TRP-1 y TRP2):** son glucoproteínas que se sintetizan en el RE. TRP-1 al igual que la tirosinasa, sufre proceso de glucosilación para su adecuado funcionamiento. No se conoce bien su función en la melanogénesis, pero su ausencia genera trastornos pigmentarios, al parecer participa en la activación o estabilización de la tirosina. Mientras que TRP-2 o DOPAcrómico tautomerasa madura en el aparato de Golgi y se localiza finalmente en la membrana de los melanosomas para formar complejos con la tirosinasa y TRP-1. Al igual que la tirosinasa, también requiere la unión con iones metálicos como el zinc para su activación. Durante la síntesis de melanina, TRP-2 permite el paso de DOPAcrómico a DHICA (ácido 5, 6-dihidroxiindol-2-carboxílico). ⁽¹⁹⁾

- **Proteincinasa C (PKC) - β** : La PKC es una familia de 12 isoformas, donde la PKC- β se encarga de la regulación de la actividad de la tirosinasa al fosforilar residuos serina de su dominio citoplasmático para activarla. Esta fosforilación de la tirosinasa determina la formación del complejo tirosinasa - TRP-1 que le da estabilidad y mayor actividad enzimática. Existen receptores privativos para cada tipo de PKC que son los receptores de cinasa activada (RACK) que se encargan de activar a su diana en la membrana. La fosforilación de la tirosina se da gracias al complejo PKC- β /RACK-1.
- **Proteínas Estructurales Pmel17**: conocida también como gp100 es una glucoproteína reconocida por anticuerpos como HBM45, HBM 50 y NKI-beteb. Tiene un papel indispensable en la formación de la matriz fibrilar de los eumelanosomas. Pmel17 se sintetiza como una proteína precursora en el RE y su transcripción esta inducida por la hormona estimulante de melanocitos- α (MSH) a través del Mitf. Pmel17 es transportada a los melanosomas que se encuentran en estadio I para formar la estructura fibrilar que es la parte más importante de la matriz de los eumelanosomas, debido a que aporta con la forma elipsoidal y promueve la polimerización de la melanina. Si los melanosomas carecen de Pmel17 no avanzan al estadio II, por ende no presentarán melanogénesis activa. ⁽³⁾
- **MART-1/Melan A**: es una proteína presente en la membrana de los melanosomas en estadio I y II que forma un complejo con Pmel17 e incide en su expresión, estabilidad y procesamiento dentro de los melanosomas.
- **Proteína P (Pink-eyed dilution)**: es una proteína transmembrana de transporte que sirve como bomba de protones para mantener el medio ácido en los melanosomas, además estabiliza el complejo tirosinasa/TRP-1/TRP-2 e interviene en el transporte de

la tirosina a los melanosomas. La ausencia de esta proteína genera alteraciones en la pigmentación de la piel, debido al pH inapropiado de los melanosomas. ⁽³⁾

2.2.3.2. Proteínas reguladoras de melanocitos y su relación con la proliferación celular

- **Factor de Transcripción Asociado a Microftalmía (Mitf) gen y proteína:** es el denominado gen maestro de la supervivencia de los melanocitos, importante para la regulación de la transcripción de las principales proteínas melanogénicas como la tirosinasa, TRP-1, TRP-2, PKC- β y MART-1. Éste es un regulador fundamental que determina el destino de algunas células debido a que expresa genes específicos de melanocitos. El Mitf tiene 9 isoformas: M, A, B, H, C, D, E, J y Mc. El mitf-M es muy específico de los melanocitos, estimula la transcripción de tirosinasa y PKC- β , pero en los melanocitos, se expresan también otras isoformas como el Mitf-A, B, E. La expresión del Mitf es regulada por factores de transcripción como el Sox10 y Pax3. El Mitf participa en la supervivencia de los melanocitos, al regular positivamente la acción del Bcl-2, una proteína antiapoptótica muy importante que se amplifica y expresa descontroladamente en el melanoma, contribuyendo a su supervivencia. El Mitf también interviene en la proliferación de los melanocitos al favorecer la expresión de la cinasa Cdk2 que interviene en el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular y además suprime la expresión de p21 que inhibe esta cinasa Cdk2, pero en ocasiones diferentes puede estimular la expresión de p21 y p16INK4a, una proteína que inhibe la activación de las cinasas, logrando la detención del ciclo celular. ⁽²³⁾
- **Receptor de Melanocortina 1 (MCR):** es un receptor transmembrana que presenta 5 tipos (MCR 1, 2, 3, 4, 5) siendo MCR-1 el que se encuentra en células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos pero sobre todo en melanocitos donde se da su máxima expresión. La MSH (hormona estimulante de melanocitos) y la ACTH (hormona

adenocorticotrópica) activan al MCR-1 a través de la activación de la enzima adenilciclase, lo que aumenta el nivel intracelular de cAMP que se une a la región promotora de Mitf para inducir su transcripción y activación, además de regular positivamente las proteínas melanogénicas incluyendo la tirosinasa. Existen 30 polimorfismos o variantes del gen MCR-1 que son responsables de los diferentes colores del pelo y la piel, tres de las cuales se han asociado con el cabello rojo y amarillo y la piel clara de personas europeas del norte y australianos. ⁽³⁾

2.2.4. MELANOGÉNESIS

Es la síntesis de melanina dentro de los melanosomas, que posteriormente serán transferidos hacia los queratinocitos cercanos con la finalidad de proteger a los melanocitos contra la radiación UV (Figura 4).

Existen 2 tipos, la eumelanina que es insoluble y de color marrón o negro, y la feomelanina soluble, clara, que contiene azufre y es de color rojo amarillo. La melanina se deriva del indol DOPA y se sintetiza en los melanosomas bajo algunos efectos oxidativos específicos y variables como el PH del melanosoma, que influye en la actividad de las enzimas melanogénicas y en la polimerización de la melanina. ⁽³⁾

La síntesis de los dos tipos de melanina incluyen un paso catalítico crucial, pues la inhibición de esta reacción bloquea la síntesis de melanina; se trata del paso limitante de la velocidad de biosíntesis, en el cual el aminoácido tirosina es oxidado a L-DOPA por la enzima tirosinasa, llamada también DOPA oxidasa, L-DOPA oxígeno reductasa o tirosina oxidasa. Éste proceso se da a través de la vía conocida como Raper-Manson. Posteriormente L-Dopa se oxida a DOPAquinona por la misma enzima tirosinasa y después se convierte en DHI (5,6-dihidroxiindol) que formará eumelanina negra, o se convierte en DHICA (ácido 5, 6-dihidroxiindol-2-carboxílico) que dará la melanina marrón. DHICA se forma gracias a la acción de la enzima TRP-2 (DOPA-cromotautomerasa). La

DOPA quinona podría combinarse también con glutatión o cisteína para dar cisteinilDOPA y formar así la feomelanina amarilla/roja. ⁽³⁾

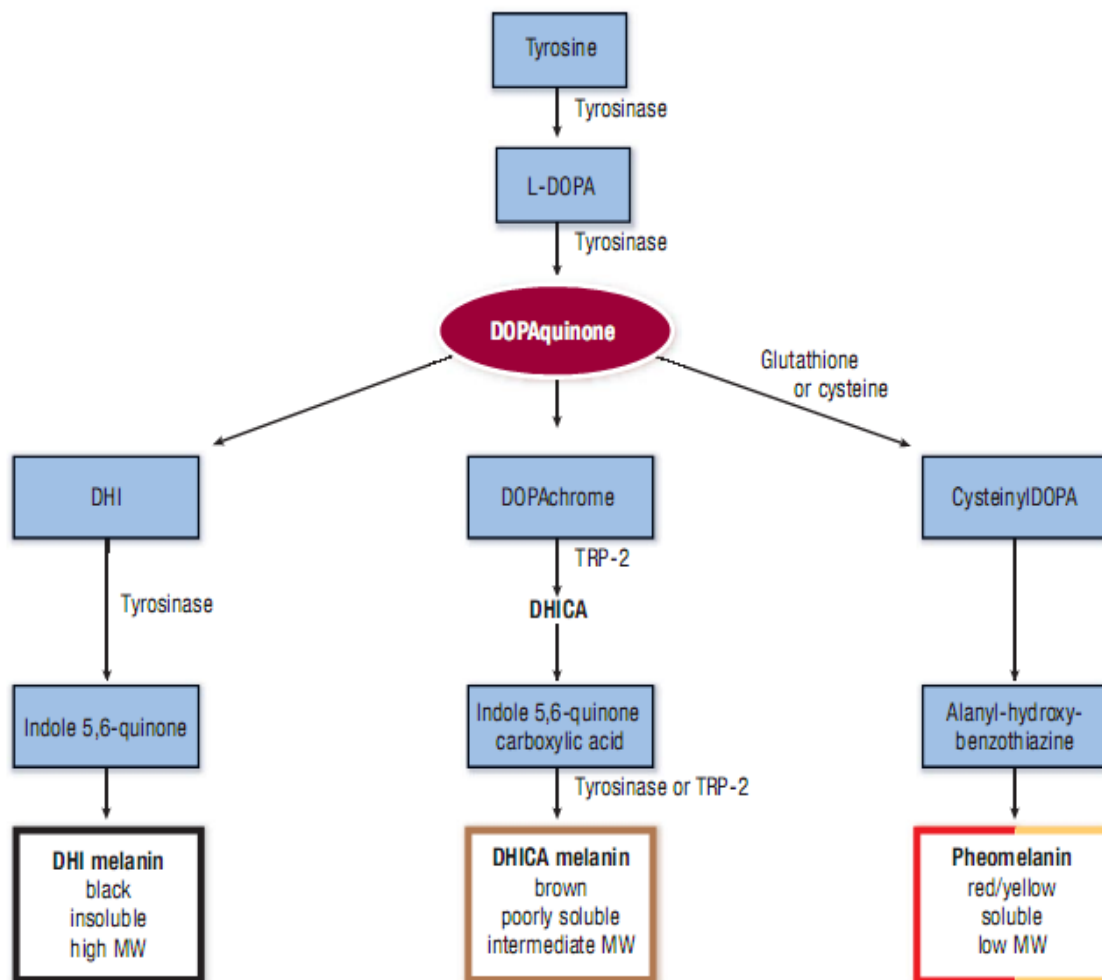


Figura 4. Flujograma de la Biosíntesis de Melanina.

La síntesis de melanina empieza con la transformación de tirosina a L-DOPA (3,4 dihidroxifenilalanina) por acción de la enzima tirosinasa. Posteriormente L-DOPA es convertida a DOPA-quinona por la misma enzima. DHI (5,6 dihidroxiindol) y DHICA (5,6 dihidroxiindol 2-ácido carboxílico) son productos de DOPA-quinona, darán lugar a eumelanina negra o café respectivamente. A través de la incorporación de glutatión o cisteína, la DOPA-quinona puede formar feomelanina. MW: molecular weight (peso molecular), TRP: proteína relacionada con la tirosinasa.

Tomado de: Fitzpatrick's. Dermatology in General Medicine, 7th Ed.

La melanina tiene la capacidad de absorber y dispersar la radiación UV, además de otros tipos de radiaciones, para convertirla en una forma menos tóxica de energía como es el

calor. Mediante éste proceso la melanina protege al DNA de los daños inducidos por la radiación UV. ⁽³⁾

La melanina y sus intermediarios también pueden ser nocivos y alterar el DNA por acción de la radiación UVA (320-400nm) probablemente por la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO). La feomelanina tiene ciertas características que sugieren ser la causa de la mayor incidencia de melanoma en pacientes con piel clara y cabello rojo, como: la menor capacidad de protección del DNA inducido por UV, su capacidad mutagénica originaria y la producción de sus intermediarios con capacidad prooxidante. ⁽³⁾

2.2.4.1. Transporte de Melanosomas

El transporte de estos organelos se da gracias a la acción de las dendritas de los melanocitos, que son procesos protoplasmáticos ramificados que van a interactuar con los queratinocitos. Estas dendritas están formadas por filamentos de actina que conforman un componente estructural indispensable. Los queratinocitos y sus factores derivados como ET1 (endotelina 1), factor de crecimiento nervioso (NGF), α -MSH, ACTH, prostaglandinas E_2 (PGE_2) y $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) y β -endorfina, desempeñan un papel importante en el desarrollo dendrítico de los melanocitos, así como también las integrinas que intervienen en el contacto de la actina con la matriz extracelular para su correcto funcionamiento. Otro grupo de proteínas importante para la formación de dendritas son Rac y Rho, que deben mantenerse en equilibrio para colaborar con el desarrollo dendrítico de los melanocitos, debido a que la activación de Rho retrae a las dendritas y la activación de Rac estimula la formación de las mismas. ⁽³⁾⁽²⁰⁾

Una vez formadas las dendritas, los melanosomas son transferidos a las puntas de éstas a través de microtúbulos que se encuentran paralelos al eje longitudinal de las dendritas, esto se controla por proteínas asociadas a los microtúbulos llamadas cinesinas y dineínas citoplasmáticas que actúan como puentes motores conectando al melanosoma con los

microtúbulos. Los melanosomas pueden moverse en sentido bidireccional a lo largo de las dendritas de los melanocitos. El movimiento anterógrado y centrifugo depende de la kinesina y el retrógrado y centrípeto de la dineína. Posterior a este proceso, los melanosomas son capturados por la actina de las dendritas mediante la proteína *miosina-Va*, que se une a través de proteínas ligadoras como *Rab27a* y *melanofilina*. En ausencia de estas proteínas, especialmente *miosina-Va*, no se acumulan los melanosomas en las dendritas. ⁽³⁾

Luego viene la transferencia de los melanosomas hacia los queratinocitos adyacentes, un paso crucial para la pigmentación de la piel. Se puede dar mediante algunos procesos como: exocitosis, cuando se fusionan las membranas melanosómicas con las plasmáticas, del melanocito para liberar el melanosoma en el espacio extracelular y ser capturadas y fagocitadas por los queratinocitos circundantes. Otro proceso, realizado por los queratinocitos es la citofagocitosis, en la cual se da fagocitosis de una célula viva o alguna parte de ella en este caso una dendrita que se fusiona con el lisosoma dentro del queratinocito, se transporta a una localización supranuclear donde se rompe la membrana del fagolisosoma y se liberan los melanosomas. ⁽³⁾

La fusión de membranas plasmáticas entre queratinocito y melanocito es otra manera de transferencia de los melanosomas, porque se crea un espacio por el cual los melanosomas se transfieren de una célula a otra a través de filipodios, unas proyecciones citoplasmáticas delgadas, puntiagudas y filiformes que se encuentran en las puntas de las dendritas, éstas se adhieren a la membrana plasmática de los queratinocitos para lograr la transferencia de los melanosomas. La cuarta vía de transferencia se da por el desprendimiento de vesículas llenas de melanosomas que son fagocitadas por los queratinocitos o fusionadas con la membrana plasmática de los mismos. ⁽³⁾

Los queratinocitos tienen un receptor transmembrana acoplado a proteína G denominado receptor-2 activado por proteasa (PAR-2) que se activa cuando se degrada su dominio

extracelular a través de serina proteasas, exponiendo un nuevo segmento que servirá como un ligando fijo. Su activación aumenta la actividad fagocítica de los queratinocitos. Es importante destacar a este receptor debido a que la radiación UV induce su actividad y expresión aumentando así la fagocitosis de los melanosomas. Este efecto es más pronunciado en individuos con fototipos de piel II y III. ⁽³⁾

2.2.4.2. Regulación de la melanogénesis

La funcionalidad y comportamiento de los melanocitos depende de las señales enviadas por los queratinocitos adyacentes, señales autocrinas y factores ambientales como la radiación UV. Ésta, además de estimular directamente el desarrollo de dendritas y la producción de melanina en los melanocitos, tiene la capacidad de aumentar la secreción de varios factores derivados de los queratinocitos. Existen estimuladores e inhibidores de la melanogénesis, dentro de los estimuladores están: proopiomelanocortina (POMC) y sus derivados MSH y ACTH, endotelina 1 (ET1), factor Steel (SF), mediadores inflamatorios como las prostaglandinas (PG) y los leucotrienos (LT), neurotrofinas (NT), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y óxido nítrico (ON). Y entre los inhibidores los más comunes están los esfingolípidos. ⁽³⁾⁽²⁰⁾

- **Proopiomelanocortina (POMC) y sus derivados:** POMC es sintetizado en los queratinocitos epidérmicos y en la hipófisis y da lugar a dos derivados, la hormona adenocorticotrófica (ACTH) y la hormona estimulante de melanocitos (MSH) que son potentes estimuladores de la melanogénesis ya que aumentan la pigmentación cutánea sobre todo en áreas expuestas al sol, sin embargo, niveles anormalmente altos podrían causar hiperpigmentación cutánea más generalizada. Es importante saber que la radiación UV y las interleucinas, entre otros, pueden inducir la expresión de POMC por los queratinocitos con sus efectos correspondientes. Un efecto

protector se da gracias a la α -MSH que aumenta la reparación del daño del DNA y disminuye el nivel celular de peróxido de hidrogeno inducido por la radiación UV sobre las células melanocíticas. ⁽³⁾

- **Endotelina-1 (ET-1):** induce la melanogénesis en los melanocitos maduros al activar la tirosina y aumentar los niveles de TRP-1. Los queratinocitos sintetizan y secretan ET-1 debido al estímulo de la radiación UV para inducir la proliferación de melanocitos y promover la formación de dendritas. La ET-1 regula positivamente MCR1 y aumenta su afinidad por la α -MSH para generar efectos fotoprotectores similares como la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno inducido por UV y el aumento de las proteínas apoptóticas. ⁽³⁾⁽²⁰⁾
- **Prostaglandinas y Leucotrienos:** aumentan sus niveles en la piel quemada por el sol ya que la radiación UV regula positivamente sus receptores. Estos mediadores inflamatorios inciden en la función de los melanocitos debido a que expresan receptores como $PGF_2\alpha$ que estimula la formación de dendritas y activa la tirosinasa. Los leucotrienos B_4 y C_4 aumentan la síntesis de melanina y estimulan la proliferación de los melanocitos. ⁽³⁾⁽²²⁾
- **Neurotrofinas (NT):** NGF, NT3 y NT4 son moléculas que aumentan la supervivencia de las neuronas en el sistema nervioso central y periférico. Los melanocitos muestran el receptor p75NTR²²⁵, un receptor común y de baja afinidad para todas las NT. El NFG es regulado por la radiación UV, se deriva de los queratinocitos y actúa como quimio atrayente de los melanocitos, además que colabora con su desarrollo dendrítico. El NFG y NT3 aumentan la supervivencia de los melanocitos, sobre todo después de la exposición al sol, porque aumentan los niveles de Bcl2 para disminuir la muerte de los melanocitos y evitar la depleción de los mismos por el daño UV. ⁽³⁾

- **Factor Básico de Crecimiento de Fibroblastos (bFGF):** factor producido en los queratinocitos que estimula el crecimiento de los fibroblastos. Genera efecto mitógeno en los melanocitos al unirse a los receptores tirosincinasa transmembrana, y debido a que se originan de los queratinocitos, tiene regulación positiva en respuesta a la radiación UV. ⁽³⁾

- **Óxido Nítrico (NO):** es un radical libre producido por los melanocitos y queratinocitos en respuesta a la radiación UV y a la acción de citocinas inflamatorias, aumentando la actividad de la melanogénesis al actuar en la tirosincinasa. ⁽³⁾

- **Inhibidores de la Melanogénesis:** existen pocos inhibidores de la melanogénesis conocidos. Tenemos a:
 - Esfingolípidos: son lípidos asociados a la membrana que intervienen como transductores de señales para disminuir la melanogénesis por aumento de la degradación del Mitf, a través de vías mediadas por ubiquitina.
 - BMP-4 (bone morphogenic protein 4): se encarga de regular negativamente la expresión de la tirosinasa, sin embargo, bajo los efectos de la radiación UV, se reduce la acción de los receptores para BMP-4 con la finalidad de permitir el bronceado al bloquear esta inhibición.

2.2.5. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN REGULADORAS DE LA FUNCIÓN DE LOS MELANOCITOS

La unión de ligandos con receptores específicos en los melanocitos, ejercen efectos biológicos en las células gracias a la generación de cascadas de señalización que activan o inhiben enzimas, fosforilan proteínas, etc., para lograr el objetivo final. Existen dos tipos

de cinasas que actúan en las señalizaciones celulares; dependiendo de los residuos que fosforilen en sus proteínas diana, éstas pueden ser: serina/treonina y tirosina. ⁽³⁾

- **Vía Dependiente de Adenosinmonofosfato Cíclico (cAMP) y Proteincinasa dependiente de cAMP (PKA):** el cAMP es un mensajero intracelular involucrado en el metabolismo, crecimiento y diferenciación celular, regulado positivamente por la adenilciclase, una enzima asociada a la membrana y activada por la unión de un receptor con su ligando. Las acciones del cAMP están mediadas por la PKA, una cinasa serina/treonina conformada por dos subunidades reguladoras y dos catalíticas. Ésta enzima permanece inactiva en el citoplasma y cuando el cAMP se une con su parte reguladora, libera las unidades catalíticas y la activa. Una vez activada, la PKA fosforila al CREB (cAMP response element-binding protein) que se une con CRE (cAMP response element), una secuencia de DNA. Todo esto induce la transcripción del Mitf para dar lugar a la melanogénesis.
- **Vía dependiente de Proteincinasa C (PKC):** es una cinasa serina/treonina que actúa en el crecimiento, diferenciación y transformación celular. Ésta enzima permanece inactiva en el citoplasma y se activa por acción del diacilglicerol (DAG) ubicado en la membrana plasmática y estimulado por la radiación UV. El DAG transloca a la PKC hacia la membrana para activarla y permitir la fosforilación de los residuos serina/treonina. Existen 12 isoformas de PKC en los humanos, de las cuales cinco se expresan en los melanocitos (PKC α , β , ϵ , δ , ξ), siendo PKC- β la que participa específicamente en la regulación de la actividad de la tirosinasa.
- **Receptores Tirosincinasa:** los melanocitos tienen este tipo de receptores que se unen a varios ligandos como BMP, bFGF, HGF y ligando c-kit, para activar al dominio tirosincinasa intracelular del receptor mediante fosforilación, activando así las MAP

cinastas que inician una reacción en cadena para fosforilar proteínas como el Mitf. Estas señales se transfieren al núcleo para intervenir en la transcripción de genes encargados de la melanogénesis, la proliferación y supervivencia de los melanocitos.

2.3. MELANOMA

2.3.1. HISTORIA

El primer melanoma del que se tiene conocimiento fidedigno fue detallado en un paciente operado por John Hunter en 1787. El hallazgo fue un gran tumor retro-maxilar, y fue guardado en líquidos conservadores hasta el día de hoy, exhibiéndose en el frasco N° 219 del Hunterian Museum. El patólogo Bodenham en 1968 extrajo la pieza y realizó el estudio histológico, pudiendo determinar que la lesión que Hunter catalogó como “tumor fungoide” era un melanoma maligno. En la literatura inglesa el primer caso fue publicado por William Norris en 1820, que lo describió como una enfermedad fungoide. El caso correspondió a un hombre de 59 años a quien operó en febrero de 1817 por un tumor de la pared abdominal, el que se había desarrollado en un lunar preexistente. “Seis meses después el tumor reaparece con un color marrón oscuro, se ulcera y segrega un líquido maloliente. Poco tiempo después aparecen nódulos rodeando al primitivo y los ganglios inguinales se ponen tumefactos”. El paciente falleció y el Dr. Norris realizó la autopsia, encontrando metástasis en el esternón, en los pulmones y en el abdomen, donde encuentra “miles y miles” de manchas color alquitrán. Este caso fue publicado en el “The Edinburg Medical and Surgical Journal” en el año 1820. ⁽²⁴⁾

Los conocimientos anatomopatológicos fueron debidamente caracterizados después de Virchow, en 1863, quien publicó su libro “Die Krankhafter Gesschwaelste”, donde mostró el origen histológico de este tumor, comenzando la denominación de melanoma, reemplazando el término melanosis usado por Norris y Lawrence. Antes de conocerse su histogénesis a partir de la neurocresta, a fines del siglo XIX y hasta mediados del siglo

XX, varios autores usaron los términos de melanosarcomas y melanocarcinomas según el tipo celular, fusiforme o epiteliode, que predominara en estos tumores. ⁽²⁴⁾

Entre los conocimientos modernos adquiridos sobre la patología tumoral en relación con el pronóstico del tumor, es hasta el día de hoy muy importante la denominada microestadificación. En 1967, W.H. Clark (Jr.) publicó la importancia del nivel de invasión tumoral en la profundidad de la epidermis. Tiempo después se describió que el espesor de la lesión en la piel medido en milímetros es el parámetro histológico de pronóstico más importante en aquellos pacientes que no presentan metástasis linfáticas o alejadas. Esta medida es fundamental para la clasificación, el pronóstico y el tratamiento de la afección. Este estudio es mérito de uno de los miembros del Grupo WHO Melanoma Programme, el Dr. A. Breslow, y consiste en la medición en milímetros de la superficie a la profundidad de la lesión. De este estudio se puede concluir que los tumores de hasta 1 mm de espesor tienen excelente pronóstico y que existe una relación directa entre el aumento del espesor y la gravedad de la enfermedad, así, por ejemplo, las lesiones de 4 mm de espesor tienen un alto porcentaje de penetración a la vía linfática y por ende el pronóstico es más grave. Considerando la evolución habitualmente benigna que tenían los melanomas diagnosticados en niños, Sophie Spitz, en 1948, publicó acerca de la entidad que aún hoy lleva su nombre, el nevus de Spitz o nevus de células fusiformes y epitelioides. En años sucesivos se observó también en adultos, y continúa siendo un serio problema el diagnóstico diferencial histopatológico de estas lesiones con el melanoma. Otro de los hallazgos histopatológicos que está en relación con el mal pronóstico es la ulceración, hecho destacado por Balch y colaboradores. ⁽²⁴⁾

2.3.2. EPIDEMIOLOGIA

2.3.2.1. DECLARACIÓN DE BÚSQUEDA

La búsqueda de información se realizó a través de revistas médicas científicas y buscadores académicos, usando las siguientes palabras claves en los idiomas inglés y español: melanoma maligno, epidemiología, estadísticas, global, Latinoamérica, Ecuador. Se incluyeron además filtros como: fechas de publicación, tipos de estudio y disponibilidad de textos en formato completo y abstracts. Los artículos se seleccionaron según la pertinencia del título, del resumen y de la relación que tuvieron con las preguntas de investigación planteadas en esta tesis. Los artículos detallados a continuación fueron tomados en cuenta para la redacción de la epidemiología del melanoma cutáneo en el marco teórico y discusión.

Resultados de la Búsqueda:

BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY: 122 resultados con melanoma/epidemiology

- Melanoma of the hand and foot: epidemiological, prognostic and genetic features. A systematic review.
- Changes in the site distribution of common melanoma subtypes in Queensland, Australia over time: implications for public health campaigns.
- Emerging trends in the epidemiology of melanoma.

SCIELO: 6 artículos con melanoma-statistics

- Cutaneous melanoma in Latin America: a population-based descriptive study
- Cutaneous melanoma - a 30-year-long epidemiological study conducted in a city in southern Brazil, from 1980-2009.

GOOGLE ACADÉMICO: 404 con epidemiología de melanoma en Latinoamérica.

- Age-standardized (world) incidence rates (per 100.000) Percentage distribution of the number of cases Melanoma of skin. IARC X.
- Tendencia de la incidencia y la mortalidad en melanoma maligno en los últimos 60 años y análisis de los datos del Registro Poblacional (sic.) de Cáncer de Cali.

El melanoma maligno se define como la proliferación neoplásica maligna originada en los melanocitos de la epidermis. Como lo describimos anteriormente, los melanocitos son células productoras de melanina, responsables de la pigmentación de la piel. ⁽²⁾

Epidemiológicamente se ha comprobado la importancia de la exposición solar y la predisposición genética, en el desarrollo del melanoma. La incidencia y mortalidad han aumentado de forma espectacular en las últimas décadas, desde principios de los años 60 se ha detectado un aumento sostenido de la incidencia del melanoma, entre un 3-7% anual en muchos países occidentales. Aunque la cifra varía de un país a otro, las estimaciones más recientes sugieren una duplicación de la incidencia cada 10-20 años. ⁽⁴⁾

El melanoma maligno cutáneo constituye el 1,2% de todos los casos nuevos de cáncer en el mundo, con 700.000 casos nuevos diagnosticados al año, según los datos publicados por la International Agency for Research on Cancer (IARC) en Cancer Incidence in Five Continents, durante el periodo 1978-2002. El aumento de la incidencia de melanoma se observa en ambos sexos, siendo el tronco la localización más frecuente en los hombres y las extremidades inferiores en las mujeres. Los melanomas de cabeza y cuello han aumentado su incidencia global. La incidencia de melanoma sigue siendo elevada en personas mayores de 50 años, este comportamiento se mantiene mundialmente. ⁽⁶⁾

Los continentes que encabezan la mayor incidencia de esta patología son: Oceanía, Europa y América del Norte.

De acuerdo con los datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la International Agency for Research on Cancer (IARC) 2013 (Tabla 1) (Tabla 4), Australia tiene una tasa de incidencia estandarizada de aproximadamente 52.6 personas por cada 100,000 habitantes, y una tasa de mortalidad de 4,0 por 100,000. Las tasas de incidencia del melanoma en Australia y Nueva Zelanda son más de dos a tres veces superiores a los de Canadá, Estados Unidos y el Reino Unido. Aunque las tasas de mortalidad son muy bajas, siguen siendo más de dos veces mayores en Australia y Nueva Zelanda que en Canadá, los Estados Unidos y el Reino Unido. ⁽⁵⁾⁽²⁵⁾

El último recuento nacional de incidencia de melanoma, según lo dispuesto por el Instituto Australiano de Salud y Bienestar (AIHW) y la Oficina Australiana de Estadísticas (ABS) reportan que las tasas de incidencia estandarizadas por edad para el melanoma han aumentado del 26,7 por 100,000 en 1982 al 48,8 por 100.000 en el 2014, con un claro predominio por el sexo masculino, 62 casos por cada 100.000 mientras que en mujeres es de 40 casos por cada 100.000. ⁽²⁶⁾

Tabla 1. Epidemiología Mundial de Melanoma Maligno Cutáneo según IARC*

Continente	País	Tasa estandarizada de Incidencia por 100.000	
		Masculino	Femenino
África	Sur África	0.6	0.3
América Central y del Sur	Argentina, Córdoba	3.6	3.1
	Brasil, Sao Paulo	5.6	4.5
	Colombia, Cali	4.0	3.0
	Ecuador, Quito	3.5	3.8
América del Norte	Canadá	9.6	8.2
	USA (42 estados)	15.0	11.0
Asia	China, Beijing	0.4	0.3
	India, Nueva Delhi	0.2	0.2
Europa	Austria	25.6	23.4
	Suiza, Geneva	20.4	20.4
	Noruega	15.4	16.6
	Suecia	13.0	13.9
	Italia, Sur Tyrol	18.6	18.9
	España, Granada	7.3	8.9
Oceanía	Nueva Zelanda	36.8	29.6
	Australia, Queensland	52.6	38.3

*IARC: Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (por sus siglas inglés)

Realizador por: Karina Rosillo y Dayana Pita

Tomado de: World Health Organization. Cancer Incidence in Five Continents. France : s.n., 2014, International Agency for Research on Cancer, Vol. X.

Tasas de incidencia intermedia y baja se encuentran en Latinoamérica. Sin embargo las tasas más bajas se reportan en habitantes Asiáticos o Africanos

En América Latina, las tasas de incidencia de melanoma varían ampliamente de 1.1-6.5 por 100.000 personas-años en ambos sexos para todas las edades y regiones. En un estudio descriptivo realizado en el año 2002⁽²⁷⁾, las tasas de incidencia promedio fueron 4.6 y 4.3 por 100.000 personas-años para las mujeres y hombres, respectivamente. La edad media registrada es de 60-64 años para ambos sexos con predominio en género masculino en este grupo de edad, a diferencia del grupo comprendido entre 25-49 años en donde la mayor tasa de incidencia registrada es en mujeres. ⁽²⁷⁾

Según la IARC 2013, el Ecuador (Quito) ocupa el trigésimo sexto puesto a nivel mundial en la incidencia de melanoma, abarcando una incidencia de 3.5 por 100.000 para sexo

masculino, con una distribución de aparición claramente marcada, 25.7% en cabeza, 16.2% en tronco, 7.6% miembro superior, 33.3% miembro inferior; y una incidencia del 3.8 por 100.000 para el género femenino, de los cuales 22.5% en cabeza, 7.2% en tronco, 13.0% miembro superior, 46.4% miembro inferior ⁽²⁸⁾ (Tabla 2). Similar a estos datos se observó que en el Registro Nacional de Tumores, se ha mantenido mayor incidencia en mujeres hasta el periodo 2001-2005; pero en el último quinquenio (2006-2010) se registra una incidencia estandarizada mayor en hombres de 3.7 y en mujeres de 3.5 (Tabla 3).

En los residentes de la ciudad de Quito desde el año 2006 hasta el 2010 se ha visto un incremento paulatino en la incidencia estandarizada de melanoma maligno, de hasta 0.9 por cada 100.000 habitantes en hombres y de 0.1 por cada 100.000 habitantes en mujeres. Contradictoriamente a las estadísticas mundiales, el melanoma maligno en Ecuador se presenta con mayor frecuencia en pacientes femeninas mayores de 65 años a razón de 1:0.8 en comparación con los hombres. El aumento en la tasa cruda de mortalidad ha sido de 0.3 en 1986 a 1.4 por 100.000 en el 2010 en ambos sexos, sin predominio significativo ⁽⁷⁾ (Tabla 3).

Tabla 2. Distribución de la Localización Anatómica del Melanoma Maligno Cutáneo

País		Ecuador		Colombia		Chile		Estados Unidos		Suiza		Italia		Australia	
Sexo		♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Localización	Cabeza	0.9	0.8	0.8	0.4	1.0	0.5	3.6	1.3	2.9	2.0	2.4	2.5	8.3	4.3
	Tronco	0.5	0.2	1.1	0.5	0.8	0.3	5.8	3.1	7.2	4.1	9.8	4.7	12.3	4.7
	Miembro Superior	0.5	0.3	0.4	0.5	0.2	0.6	3.4	2.9	4.0	3.5	3.3	3.9	7.6	7.5
	Miembro Inferior	1.2	1.9	1.4	1.3	0.8	0.6	1.4	3.3	2.3	6.5	2.3	7.5	6.0	9.8
	No Especificado	0.6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2	0.9	0.4	0.9	0.5	0.8	0.4	1.1	0.6

Tasa estandarizada por 100.000 habitantes

Realizado por: K.R y D.P.

Fuente: Cancer Incidence Five Continents Vol. X, IARC

Tabla 3. Tasas estandarizadas de indicadores principales de melanoma maligno cutáneo en Quito-Ecuador, desde 1986 hasta 2010

	Hombres					Mujeres				
	1986-1990	1991-1995	1996-2000	2001-2005	2006-2010	1986-1990	1991-1995	1996-2000	2001-2005	2006-2010
*T.I.E	2.7	2.7	2.7	2.8	3.7	2.9	3.8	3.2	3.4	3.5
*T.M.E	0.5	0.9	0.9	1.2	1.6	0.7	0.8	0.9	1.2	1.3
Razón H/M	0.8/1	0.6/1	0.7/1	0.7/1	0.8/1					

*T.I.E: tasa de incidencia estandarizada y *T.M.E: tasa de mortalidad estandarizada por 100.000 habitantes

Tomado de: Registro Nacional de Tumores. SOLCA

Modificado por: Dayana Pita y Karina Rosillo

En las estadísticas reportadas por SOLCA 2006-2010 en residentes de Quito, el melanoma ocupa el puesto número 15 dentro de los tumores malignos más frecuentes y solo ocupa alrededor del 10% de los cánceres cutáneos, la patología con mayor incidencia dentro de esta neoplasia es el carcinoma de células basales con 65% seguido del carcinoma de células escamosas 20%. ⁽⁷⁾

El proyecto de investigación realizado en el 2008 por Torres M. ⁽²⁹⁾, en la ciudad de Quito con una población de 279 pacientes reportó que el tipo histológico de melanoma maligno más prevalente fue Lentiginoso-Acral con un 38.7%, seguido del tipo Nodular con un 24.7%, mientras que la menor proporción se observó en los pacientes con Melanoma de Diseminación Superficial y Lentigo Maligno con 20.07% y 16.5% respectivamente. La localización mayormente afectada fue la extremidad inferior en ambos sexos con el 39.1%, el 24.7% en cabeza, 20.1% en extremidades superiores, 9% en tronco y 7.2% en cuello ⁽²⁹⁾ (Tabla 4).

Tabla 4. Comparación Epidemiológica de Melanoma Maligno Cutáneo.

REVISTA	AUTORES	TITULO	AÑO DE PUBLICACIÓN	RESULTADOS
British Journal of Dermatology BJD	Nikolaou V. and Stratigos AJ.	Emerging trends in the epidemiology of melanoma	2013	<p>-Melanoma es el 5to cáncer en hombres y el 7mo en mujeres en USA.</p> <p>-Incidencia en Australia y Nueva Zelanda más de 60 x 100 000 ha.</p> <p>- USA: 25.4 x 100 000 H, 16.9 x 100 000 M. (2003-2007)</p> <p>- USA: Aumento dramático de casos en >60a (principalmente hombres). Variación promedio anual en >60a es de 6.15% (1992-2005)</p> <p>- *TIE: 11.4 H, 11.0 M Europa Central y Oriental. 10 x 100 000 Sur, 19 x 100 000 Norte.</p> <p>- Europa Central, Oriental y Sur mayor incidencia en hombres, Europa Norte y Occidental mayor en mujeres.</p> <p>- USA: aumento crítico en grupo de edad 20-49 años: M: 8.1 (1975) a 17.4 (2008), H: 8.3 a 12.5 x 100 000. (SEER).</p>
International Agency for Research on Cancer	-Globocan CI5 -ACCIS -IICC -ECO -NORDCAN -SurvCan	Age-standarized (world) incidence rates (per 100.000) Percentage distribution of the number of cases Melanoma of skin	2013	<p>-África: 0.6 en hombres y 0.3 en mujeres</p> <p>-América del Sur: Argentina 3.6 H y 3.1 M; Brasil 5.6 H y 4.5 M; Ecuador 3.5 H y 3.8 M.</p> <p>-América del Norte: USA 15.0 H y 11.0 M; Canadá 9.6 H y 8.2 M.</p> <p>-Asia: China 0.4 H y 0.3 M.</p> <p>-Europa: Austria 25.6 H y 23.4 M; Suiza 20.4 en H y M; España 7.3 H y 8.9 M.</p> <p>-Oceanía: Nueva Zelanda 36.8 H y 29.6 M; Australia 52.6 H y 38.3 M.</p> <p>-Globalmente la localización más frecuente en los H. es el tronco y en las M. en miembros inferiores. En Ecuador la incidencia para ambos sexos es en miembros inferiores con 1.2 H y 1.9 M.</p>

Rev Asoc Colomb Dermatol	Oliveros C, Bravo J, Zambrano A, Cepeda M, Ramírez A.	Tendencia de la incidencia y la mortalidad en melanoma maligno en los últimos 60 años y análisis de los datos del Registro Poblacional (sic.) de Cáncer de Cali	2012	<p>-USA: aumento de la incidencia de 6 a 18 casos por 100.000 ha (1960s-2000).</p> <p>-Canadá: *TIE de 11.5 a 15.9 H y de 9.8 a 14.1 M, en los últimos 20 años.</p> <p>-Europa Central: aumento de 3-4 a 10-15 por 100.000 ha en los últimos 15 años.</p> <p>-Australia, Queensland: incidencia actual 55.8 H y 41.1 M por 100.000 ha., y 40-60 casos por 100.000 ha. en general.</p> <p>-Suiza: *TIE 18.6 H y 19.6 M.</p> <p>-Colombia, Cali: *TIE en el 2007, 3.8 H y 3.2 M.</p>
Scielo	Sortino-Rachou A, Curado M, Cancela M.	Cutaneous melanoma in Latin America: a population-based descriptive study	2011	<p>-En Latinoamérica la *TIE es de 4.3 H y 4.6 M, la edad media para ambos sexos 60-64 años. Aumento crítico en grupo de edad 25-49 años predominio M.</p> <p>-Brasil, Sao Paulo: *TIE 6.5 H y 5.7 M.</p>
Scielo	Nilton Naser	Melanoma cutâneo - estudo epidemiológico de 30 anos em cidade do sul do Brasil, de 1980-2009	2011	<p>En la ciudad de Blumenau, localizada al sur de Brasil se observó una de las incidencias más altas a nivel de Latinoamérica con un aumento en la tasa estandarizada de 6.3 a 20.6 durante 1980 al 2009. Esto se debe a la gran colonización de inmigrantes caucásicos procedentes de países como Alemania, Italia y Portugal.</p>
Registro Nacional de Tumores	SOLCA	Melanoma de Piel	2010	<p>-Ecuador: aumento de la *TIE en hombres 2.7-3.7 y mujeres 2.9-3.5 de 1986-2010.</p> <p>-Localización anatómica más frecuente miembros inferiores en H y M con 33.3% y 46.4% respectivamente.</p> <p>- El aumento en la tasa cruda de mortalidad ha sido de 0.3 en 1986 a 1.4 por 100.000 en el 2010 en ambos sexos</p>

Tesis Doctoral	Torres Ma. Gabriela	<p>Características Clínicas, Epidemiológicas E Histopatológicas Del Melanoma Maligno Cutáneo En Los Hospitales: Oncológico Gral. Solón Espinoza Ayala-SOLCA Y Dermatológico Gonzalo González De La Ciudad De Quito Durante El Período Comprendido Entre Enero Del 2000 a Diciembre Del 2007.</p>	2008	<p>-Ecuador, Quito: Lentiginoso-Acral con un 38.7%, seguido del tipo Nodular con un 24.7%, Diseminación Superficial y Lentigo Maligno con 20.07% y 16.5% respectivamente.</p> <p>-La localización mayormente afectada fue la extremidad inferior en ambos sexos con el 39.1%.</p>
-----------------------	---------------------	--	------	---

H: Hombre, M: Mujer, ha: habitantes, USA: United States of América, >60a: mayores a 60 años, *TIE: Tasa Incidencia Estandarizada x 100.000 habitantes, SEER: Surveillance Epidemiology and End Results. Globocan: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, CI5: Cancer Incidence in Five Continents, ACCIS: Automated Childhood Cancer Information System, IICC: International Incidence of Childhood Cancer, ECO: European Cancer Observatory, NORDCAN: Association of the Nordic Cancer Registries, SurvVan: Cancer survival in Africa, Asia, the Caribbean and Central America. SOLCA: Sociedad de Lucha Contra el Cáncer, Ecuador
Realizada por: Dayana Pita y Karina Rosillo

A pesar que el melanoma maligno implica el menor porcentaje de los cánceres cutáneos es de vital importancia su estudio porque abarca el 80% de las defunciones por esta neoplasia. La supervivencia varía en función del estadiaje del tumor; a los 5 años en estadio I la supervivencia es superior al 90%; en estadio II, entre el 45-80%; en el estadio III entre el 25-70% y del 18.8% en el estadio IV. ⁽⁸⁾

Las diversas investigaciones realizadas sobre la etiología del melanoma concluyen que este no es un proceso aislado, es el resultado de la interacción de varias vías moleculares con la predisposición genética de cada individuo y la contribución de agresores ambientales.

2.3.3. FACTORES DE RIESGO

Los factores de riesgo más importantes para el desarrollo de melanoma maligno se pueden dividir en grandes grupos: ambientales o modificables, fenotípicos y genéticos.

2.3.3.1. Factores Ambientales

Se encuentran contemplados todos los comportamientos de riesgo que involucran exposición a luz solar crónica o intermitente, radiación ionizante o inmunosupresión.

Los estudios describen que la exposición solar prolongada en la infancia ha sido catalogada como el mayor contribuidor para todos los tipos de cáncer, pero en contraste, el melanoma parece estar asociado a una exposición intermitente y a quemaduras solares.

El bronceado, llamado también color facultativo de la piel, es el mecanismo defensivo ante la agresión de la luz ultravioleta, esto se da gracias a la mayor síntesis de melanina por los melanocitos y la transferencia de ésta hacia los queratinocitos donde la energía ultravioleta es absorbida y disipada. Existen dos tipos de bronceado:

Bronceado inmediato: este no brinda aumento de pigmento melánico en la epidermis, no es una verdadera melanogénesis. Al parecer está producido por una reorganización de los melanosomas, y por oxidación de melanina existente, reacción provocada por los rayos UVA. Empieza a los 5-10 minutos de exposición y solo dura de minutos a días. ⁽³⁰⁾

Bronceado diferido: la fotoprotección brindada por este mecanismo, está dada por el aumento de melanocitos, desarrollo dendrítico, mayor melanización de cada melanosoma y transferencia de melanosomas a los queratinocitos. Los espectros ultravioleta que lo provocan son UVA (320-400 nm) y UVB (280-320 nm) ya que la radiación UVC (100-280 nm) no atraviesa a la tierra porque es absorbida por la capa de ozono. Empieza a los 3-4 días de exposición a la radiación ultravioleta y alcanza un pico entre los 10 días a 3-4 semanas, esto dependerá también de factores externos como la cantidad de exposición y el tipo de piel de la persona expuesta, desaparece gradualmente en varias semanas. ⁽³⁰⁾

Según la OMS en su guía práctica sobre índice UV solar mundial ⁽³⁰⁾ describe la importancia de los elementos que influyen sobre la intensidad de la radiación UV:

- La altura del sol, mientras más alto se encuentre el sol en el cielo la intensidad de la radiación será mayor, esto dependerá de la época del año y la hora del día. Entre las 10 de la mañana y las 2 de la tarde se recibe el 60% de la radiación UV diaria.
- La latitud, que es la que proporciona la localización de un lugar y se expresa en medidas angulares que varían desde los 0° del ecuador hasta los 90°N del polo Norte, es también directamente proporcional a la radiación, mientras más cerca se encuentre del ecuador más intensos los rayos UV.
- La nubosidad es un factor que puede servir en la disipación de la intensidad de la radiación, reduciéndola hasta en un 50%. Pero en el caso de nubes poco densas la penetración de los rayos es de aproximadamente el 90%.

- La altitud, mientras ésta sea mayor la atmósfera se torna más delgada y su capacidad de absorción disminuye. Con cada 1000 metros de incremento de la altitud, la intensidad de la radiación UV aumenta en un 10 a 12%. Este factor es uno de los principales a tomar en cuenta en nuestra población, ya que la altitud de la ciudad de Quito es de 2.800 msnm.
- El ozono, varía durante la época del año e incluso el día y es gran ayuda para la absorción de la radiación.
- La variabilidad de reflexión de diferentes superficies, por ejemplo, la nieve reciente puede reflejar hasta un 80% de la radiación UV; la arena seca de la playa, alrededor de un 15%, y la espuma del agua del mar, alrededor de un 25%.

La OMS, en colaboración con la Comisión Internacional de Protección contra la Radiación No Ionizante, el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y la Organización Meteorológica Mundial, desarrolló el Índice UV (IUV), con valores entre 'menores a 2', que corresponden a niveles bajos de UV (no se requiere protección), hasta valores 'mayores a 11', que corresponden a niveles extremos (se recomienda limitar el tiempo de exposición solar durante las horas del mediodía, permanecer bajo la sombra, usar gafas, sombrero de ala ancha y ropa de manga larga).⁽³⁰⁾

La escala de la OMS se estableció en base a niveles de UV registrados en Canadá y la exposición de personas de piel clara. Los rangos y calificativos actuales en la escala de la OMS son insuficientes, ya que frecuentemente en la región andina de Sudamérica se alcanza y supera el valor de 11. Desde agosto del 2009, la Red Metropolitana de Atmosférico de Quito registra los niveles de Radiación Ultravioleta UV y de acuerdo a los registros del período agosto - diciembre del 2009, el 66% de los días presentaron valores del IUV iguales o mayores a 11; y el 16%, valores del IUV iguales o mayores a 16, corroborando lo aseverado por el Instituto de Física de Rosario y por la Fundación Ecuatoriana de Psoriasis, en cuanto a la mayor intensidad de la radiación en nuestra

región. El Instituto de Física de la ciudad de Rosario-Argentina, IFIR, propone un rango más extenso para los valores del IUV, considerando que en nuestra región de Latinoamérica existen niveles de radiación solar más intensa y que sus habitantes tenemos en general una piel más oscura, y por consiguiente mayor protección natural y menor riesgo ante la UV. Este Instituto propone que los niveles de IUV mayores a 15 se consideren extremos. ⁽⁵⁵⁾

Los efectos causados por la radiación UV pueden ser directos e indirectos. Se ha observado que la radiación UV provoca alteración en los lípidos de membrana, ocasionando la activación de la proteincinasa B que como ya habíamos mencionado promueve la melanogénesis por la activación de la tirosinasa.

Directamente esta irradiación ocasiona reacciones biológicas mediadas por la interacción con células que absorben luz y producen color (cromóforos celulares), la piel posee cromóforos endógenos normales o fisiológicos como son el ADN, las proteínas que contienen gran cantidad de aminoácidos aromáticos, los esteroides, los liposomas, las porfirinas y el ácido urocánico en el estrato córneo. La toxicidad de la radiación UVA es causada porque los cromóforos funcionan como fotosensibilizadores y producen especies reactivas de oxígeno y radicales libres, mientras que el daño ocasionado por rayos UVB es directo sobre el DNA celular, formándose dímeros de pirimidinas (generalmente de timina) que acortan la distancia normal del enlace y generan una deformación de la cadena. ⁽³⁰⁾

Indirectamente se produce la secreción de factores paracrinos tanto estimuladores como inhibidores de melanogénesis tales como: factor básico de crecimiento de fibroblastos, endotelina-1, hormona estimulante de melanocitos alfa, prostaglandina E2, óxido nítrico, factor de necrosis tumoral, entre otros; cuya finalidad es lograr el equilibrio para obtener aumento de melanogénesis y proliferación de melanocitos, brindando un efecto protector. ⁽³⁰⁾

En resumen, molecularmente la exposición a la luz ultravioleta incrementa la pigmentación de la piel por un mecanismo mediado por la hormona estimulante de melanocitos (alfa-MSH) y su receptor melanocortina tipo 1 (MCR1). La unión de esta hormona con su receptor estimula señales intracelulares en el melanocito que a su vez incrementan la expresión de enzimas involucradas en la producción de melanina. Las personas caucásicas y pelirrojas son portadoras de un polimorfismo en el receptor MCR1 que reduce la actividad del mismo e incrementa el riesgo de melanoma al haber una disminución en la producción de melanina y por lo tanto en el mecanismo de defensa ante la agresión UV.

FALSO	VERDADERO
El bronceado es saludable.	El bronceado es una forma de defensa del organismo contra daños adicionales por la radiación UV.
El bronceado te protege del sol.	Un bronceado intenso en personas de piel clara sólo ofrece una protección escasa, equivalente a un FPS de alrededor de 4.
En días nublados no te quemas.	Hasta el 80% de la radiación UV solar puede atravesar una nubosidad poco densa. La neblina de la atmósfera puede incluso aumentar la exposición a la radiación UV.
Estando en el agua no te quemas.	El agua proporciona una protección mínima contra la radiación UV y los reflejos del agua pueden aumentar la exposición.
Durante el invierno, la radiación UV no es peligrosa.	La radiación UV es generalmente menor durante los meses de invierno, pero la reflexión en la nieve puede duplicar la exposición total, especialmente a altitudes elevadas. Sea particularmente precavido a comienzos de la primavera, cuando las temperaturas son bajas pero los rayos del sol son más fuertes de lo que se podría esperar.
Las cremas protectoras permiten tomar el sol mucho más tiempo.	Las cremas de protección solar no deben utilizarse para aumentar el tiempo de exposición al sol, sino para aumentar la protección cuando la exposición es inevitable. La protección que proporcionan depende en gran medida de si se aplican correctamente.
Si realizas descansos periódicos al tomar el sol no te quemas.	La exposición a la radiación UV se acumula a lo largo del día.
Si uno no siente el calor de los rayos del sol no se quemará.	Las quemaduras solares se deben a la exposición a rayos UV imperceptibles. El efecto térmico se debe a la radiación infrarroja del sol y no a la radiación UV.

Figura 5. Peligros de la radiación UV, mitos y verdades.

Tomado de: Organización Mundial de la Salud. Índice UV Solar Mundial, Guía Práctica

2.3.3.2. Factores Fenotípicos

Los factores de riesgo fenotípicos involucrados en la patogenia del melanoma son la fotosensibilidad sobretudo el fototipo de piel I y II (Figura 6), escasa capacidad de broncearse, pelo y ojos claros, pecas o quemaduras de fácil aparición, las pecas se

consideran clones de melanocitos mutados. Antecedentes de quemaduras importantes en la infancia y juventud, aumentan entre 20 y 30 veces el riesgo de desarrollo de la enfermedad, al igual que antecedentes personales de melanoma.

Presencia de pecas, nevus melanocíticos en una cantidad >50 y de 2-5 mm de diámetro, nevus displásicos y congénitos, aumentan el riesgo de desarrollar melanoma en 14 veces, más que la población que no los presenta. A medida que aumentan las lesiones aumenta el riesgo, y el número de las mismas se relaciona con la precocidad e intensidad de la exposición solar en la infancia, como también con el número de quemaduras solares habidas hasta la segunda década de vida ⁽³¹⁾

Fototipo de piel	Color de piel	Sensibilidad a la radiación	Descripción
I	Blanca (deficiente en melanina)	Muy sensible	Siempre se quema con facilidad tras la exposición al sol, raramente se broncea.
II	Blanca (deficiente en melanina)	Muy Sensible	Habitualmente se quema tras la exposición al sol, algunas veces se broncea.
III	Blanca (con melanina suficiente)	Sensible	Algunas veces se quema tras la exposición al sol, habitualmente se broncea de manera gradual y uniforme, (café claro).
IV	Café Clara (con melanina suficiente)	Moderadamente sensible	Raramente se quema tras la exposición al sol, siempre se broncea bien. (café moderado).
V	Café (con protección melanica)	Minimamente sensible	Rara vez se quema. Se broncea intensamente (café oscuro).
VI	Café oscuro o negro (con protección melanica)	Insensible o minimamente sensible	Nunca se quema. Se broncea intensamente (café oscuro o negro).

Figura 6. Fototipos de Piel

Tomado de: Organización Mundial de la Salud. Índice UV Solar Mundial, Guía Práctica

2.3.3.3. Factores Genéticos

El melanoma es considerado como una enfermedad poligénica multifactorial. Las alteraciones genómicas que preceden al desarrollo de melanoma pertenecen a dos grandes clases de genes: supresores de tumores, cuya función es evitar la transformación maligna de las células, y a la que pertenecen la mayoría de los genes

relacionados con el melanoma, y los oncogenes propiamente dichos, cuya función es estimular la progresión tumoral. ⁽⁵⁶⁾

Se pueden diferenciar también alteraciones en genes de alta penetrancia y baja prevalencia, como son los genes CDKN2A y CDK4 asociados a casos de melanoma familiar, y de bajo riesgo o baja penetrancia, por ejemplo receptor de Melanocortina-1, receptor de vitamina D, factor de crecimiento epidermal, citocromo P-450, gen reparador de DNA, relacionados con la aparición de melanoma esporádico. ⁽³¹⁾⁽⁵⁶⁾

2.3.4. FISIOPATOLOGÍA

El modelo propuesto por Clark para explicar el desarrollo secuencial de melanoma, consiste en 4 fases mediadas por vías moleculares, las cuales describen los cambios que atraviesa una lesión melanocítica desde la benignidad hasta el desarrollo de melanoma maligno.

La primera fase consiste en la formación de la lesión, un nevus melanocítico, es decir melanocitos sin atipia citológica organizados en nidos celulares con crecimiento celular limitado, mecanismo mediado por un proceso de senescencia celular. Fisiológicamente la proliferación névica se da por la activación de una compleja vía de quinasas, MAPK o ERK $\frac{1}{2}$, que llevan la información procedente de un receptor extracelular a un efector intracelular, generando la proliferación y crecimiento de melanocitos. Una mutación activadora del gen BRAF o de N-RAS son las principales causas de la alteración patológica de ésta vía de quinasas ⁽³²⁾⁽³³⁾(Figura 7).

La mutación del BRAF está dada por una sustitución en el dominio de activación de la quinasa V600E, aparece hasta en el 80% de nevus atípicos y por su distribución se le ha atribuido relación con los rayos UV, de igual manera se cree que esta es la alteración inicial en la formación del melanoma pero no la única. Existen también mutaciones en el gen N-RAS, predominantes en el melanoma maligno tipo nodular, mutaciones en el gen

H-RAS asociada con el Nevus de Spitz y mutaciones inactivadoras de INK4a, ARF y/o p53 relacionadas con melanoma no metastásico. ⁽³²⁾⁽³³⁾

La segunda fase es el desarrollo de atipia citológica e inactivación de genes supresores tumorales, las modificaciones moleculares de esta fase incluyen el crecimiento celular precipitado, alteración del DNA y pérdida de apoptosis. ⁽³²⁾⁽³³⁾

El gen CDKN2A codifica principalmente dos proteínas supresoras tumorales que son: p16/INK4A y p14/ARF que pertenecen a vías de regulación molecular e intervienen en el ciclo celular dando como resultado la supresión tumoral y la apoptosis del ADN alterado. El gen PTEN también interviene en la función supresora tumoral mediante la codificación de una lipoprotein-fosfatasa intracelular que inactiva a la vía del fosfatidi-inositol fosfato 3 (PIP3); ésta vía cumple el rol de segundo mensajero intracelular de factores de crecimiento o integrinas extracelulares, ligándose a receptores dependientes de quinasa, permitiendo un crecimiento aumentado y supervivencia de las células malignas. ⁽³²⁾⁽³³⁾

Las mutaciones en cada uno de estos genes representan el 25-40% de melanoma familiar y del 24-50% de melanoma esporádico respectivamente

La tercera fase abarca la diferenciación celular, activación de genes encargados de la regulación del ciclo celular y la producción de melanina. El MITF (factor de transcripción asociado a microftalmía) es una proteína cuyas funciones son regular el desarrollo y diferenciación de los melanocitos, mantenerlos como células adultas, y específicamente el MITF-1 interviene en la producción de pigmento, además dentro de la función de supervivencia celular el incremento de la expresión del gen Bcl-2 cumple una función antiapoptótica de vital importancia ⁽³²⁾⁽³³⁾(Figura 7).

La alteración genómica del MITF descubierta en el melanoma maligno es una amplificación o ganancia genética en la región del cromosoma 3p14_3p13 que genera alteración de la maduración melanocítica y proliferación celular excesiva.

Para finalizar la cuarta fase del modelo de Clark está dada por la alteración en la adhesión e invasión celular, funciones mediadas por las proteínas cadherinas e integrinas. Las cadherinas al ser proteínas que mantienen el contacto intracelular pueden sufrir disociación mediante varias vías, por ejemplo al alterarse la WNT pierde la capacidad de inactivar a GSK3b Kinasa (molécula que degrada b-catenina), ésta se acumula en el núcleo de los melanocitos y se une a LEC-TCF (Factor linfoideo promotor de linfocitos T), provocando el aumento de factores como MITF-1, CCND1 y MMP-7 dando como resultado final el acrecentamiento de la proliferación y migración celular. También se asocia la vía WNT5a en la progresión de melanoma y la capacidad invasiva de las células neoplásicas. ⁽³²⁾⁽³³⁾ (Figura 7).

El desarrollo del crecimiento vertical del melanoma está dado por la sustitución de E-cadherina por N-cadherina permitiendo así la interacción con otras proteínas y la diseminación metastásica. La conversión del crecimiento radial a vertical está dado por la expresión de Vb3 integrina, que a su vez activa la expresión de MMP2 (metaloproteinasa tipo 2, enzima degradadora de colágeno) y aumenta la expresión de Bcl-2 dando como resultado la estimulación de la movilidad de las células melanocíticas y promoviendo la invasión. ⁽³²⁾⁽³³⁾

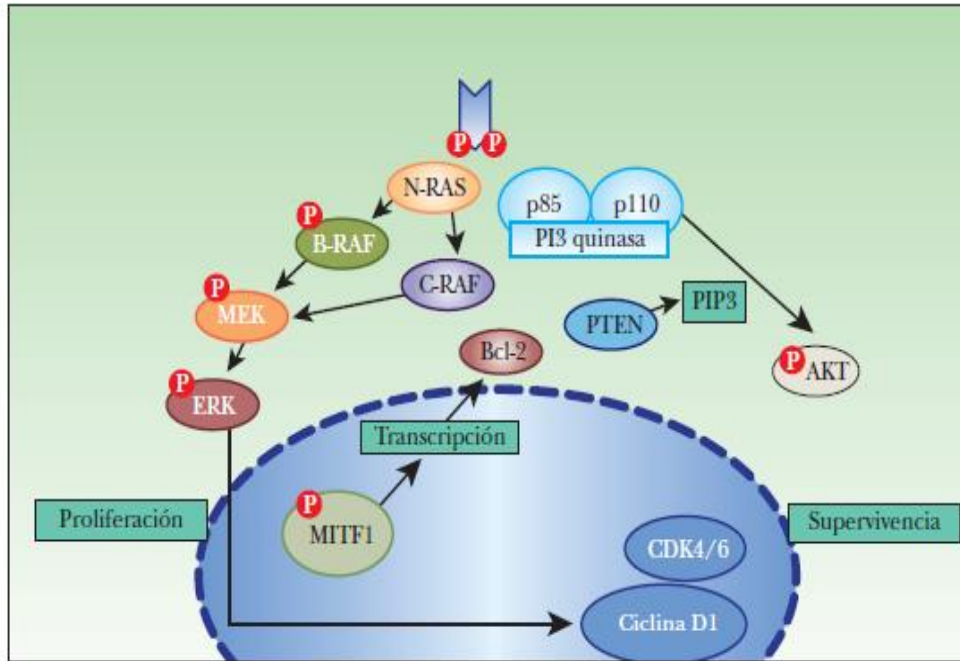


Figura 7. Mecanismos de la enfermedad. Vías de MAPK y de la PI3K.

N-RAS: neuroblastoma RAS viral oncogene homolog, BRAF: B-raf Proto-oncogene, MEK: mitogen extracellular signal-regulated kinase ,ERK: extracellular signal-regulated kinases, Bcl-2: B-cell lymphoma 2 , PTEN: phosphatase and tensin homolog, PIP3: fosfatidi-inositol fosfato 3, AKT: Proto-Oncogene Proteins c-akt.

Tomado de: Novedades en biología molecular y su aplicación en el diagnóstico y el tratamiento del melanoma. Actas Dermosifiliogr 2009.

Desde el punto de vista histopatológico se siguen los mismos pasos en el proceso de transformación de malignidad. El primer evento es una proliferación normal de melanocitos que conduce a la aparición de un nevus benigno. Clínicamente este se presenta como una lesión plana o ligeramente elevada ya sea con una coloración uniforme o un patrón regular de pigmento punteado en un fondo marrón oscuro. Histológicamente estas lesiones tienen un mayor número de melanocitos anidados a lo largo de la capa basal ⁽³²⁾ (Figura 8).

El segundo paso es el desarrollo de un crecimiento aberrante, esto puede ocurrir desde la presencia previa de un nevus benigno o en una nueva localización. Clínicamente estas

lesiones pueden ser asimétricas, de bordes irregulares, múltiples colores y de diámetros aumentados. Histológicamente tienen atipia citológica, aleatoria y discontinua. ⁽³²⁾

En el tercer paso, durante la fase de crecimiento radial, las células adquieren la habilidad de proliferar intraepidermalmente. Estas lesiones ya no muestran atipia al azar como en el paso anterior, en su lugar presentan células neoplásicas a lo largo de la lesión y las células pueden penetrar a la dermis papilar, solas, o en pequeños nidos. Clínicamente se suelen presentar como lesiones sobre elevadas. ⁽³²⁾

En la cuarta etapa las células que progresan a la fase de crecimiento vertical adquieren la capacidad de invadir toda la dermis papilar y formar un nódulo. Además, la invasión también puede progresar hacia la dermis reticular y tejido celular subcutáneo, donde poseen capacidad para formar tumores nodulares. ⁽³²⁾

El último paso está dado por la diseminación de las células tumorales a otras áreas de la piel y órganos, donde pueden proliferar y establecer un foco metastásico.

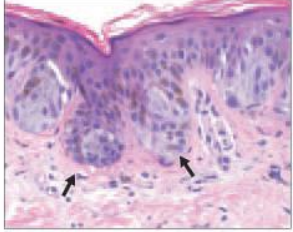
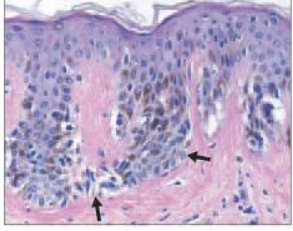
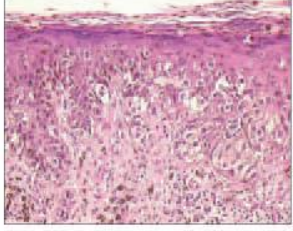
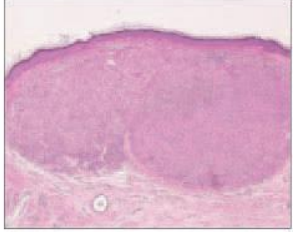
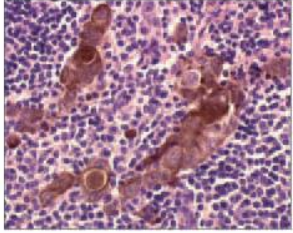
Histopathological Appearance	Description	Histologic Features
 <p data-bbox="336 465 459 488">Benign nevus</p>	<p data-bbox="608 226 667 248">Step 1</p> <p data-bbox="608 248 1118 427">The first event is a proliferation of structurally normal melanocytes leading to the benign nevus. Clinically, these nevi present as flat or slightly raised lesions with either uniform coloration or a regular pattern of dot-like pigment in a tan or dark brown background. Histologically, such lesions have an increased number of nested melanocytes along the basal layer (arrows).</p>	<p data-bbox="1177 226 1422 271">Proliferation of melanocytes Benign lesions</p>
 <p data-bbox="336 763 459 786">Dysplastic nevi</p>	<p data-bbox="608 524 667 546">Step 2</p> <p data-bbox="608 546 1118 703">The next step is the development of aberrant growth. This may occur within a preexisting benign nevus or in a new location. Clinically such lesions may be asymmetric, have irregular borders, contain multiple colors, or have increasing diameters. Histologically, such lesions have random and discontinuous cytologic atypia (arrows).</p>	<p data-bbox="1177 524 1310 568">Dysplastic cells Random atypia</p>
 <p data-bbox="309 1061 496 1084">Radial-growth phase</p>	<p data-bbox="608 822 667 844">Step 3</p> <p data-bbox="608 844 1118 1023">During the radial-growth phase, cells acquire the ability to proliferate intraepidermally. Clinically, they sometimes present as raised lesions. These lesions no longer display random atypia and instead show cytomorphic cancer throughout the lesion. In addition to the intraepidermal cancer, the cells can penetrate the papillary dermis singly or in small nests but fail to form colonies in soft agar.</p>	<p data-bbox="1177 822 1374 866">Intraepidermal growth Continuous atypia</p>
 <p data-bbox="304 1359 496 1382">Vertical-growth phase</p>	<p data-bbox="608 1120 667 1142">Step 4</p> <p data-bbox="608 1142 1118 1299">Lesions that progress to the vertical-growth phase acquire the ability to invade the dermis and form an expansile nodule, widening the papillary dermis. The cells can also extend into the reticular dermis and fat, are capable of growth in soft agar, and have the capacity to form tumor nodules when implanted in nude mice.</p>	<p data-bbox="1177 1120 1310 1142">Dermal invasion</p>
 <p data-bbox="304 1657 496 1680">Metastatic melanoma</p>	<p data-bbox="608 1417 667 1440">Step 5</p> <p data-bbox="608 1440 1118 1597">The final step in the model is the successful spread of cells to other areas of the skin and other organs, where they can successfully proliferate and establish a metastatic focus. These cells can grow in soft agar and can form tumor nodules that may metastasize when implanted in nude mice.</p>	<p data-bbox="1177 1417 1278 1440">Metastasis</p>

Figura 8. Mecanismos de la Enfermedad: Melanoma.

Tomado de: Miller A, Mihm M. Mechanisms of Disease: Melanoma. *N Engl J Med* 2006.

2.3.5. DIAGNÓSTICO

2.3.5.1. Diagnóstico Clínico

El diagnóstico temprano es el primer paso en el manejo de melanoma y en la reducción de la mortalidad, además de una anamnesis minuciosa, clínicamente cualquier lesión sospechosa debería ser evaluada bajo el concepto de “ugly duckling” y con la norma ABCDE:

A, asimetría

B, bordes irregulares

C, variaciones de color

D, diámetro >6mm

E, evolución, cambios recientes o aparición de síntomas (picor/dolor) o signos (sangrado/inflamación).⁽³⁾⁽³⁴⁾

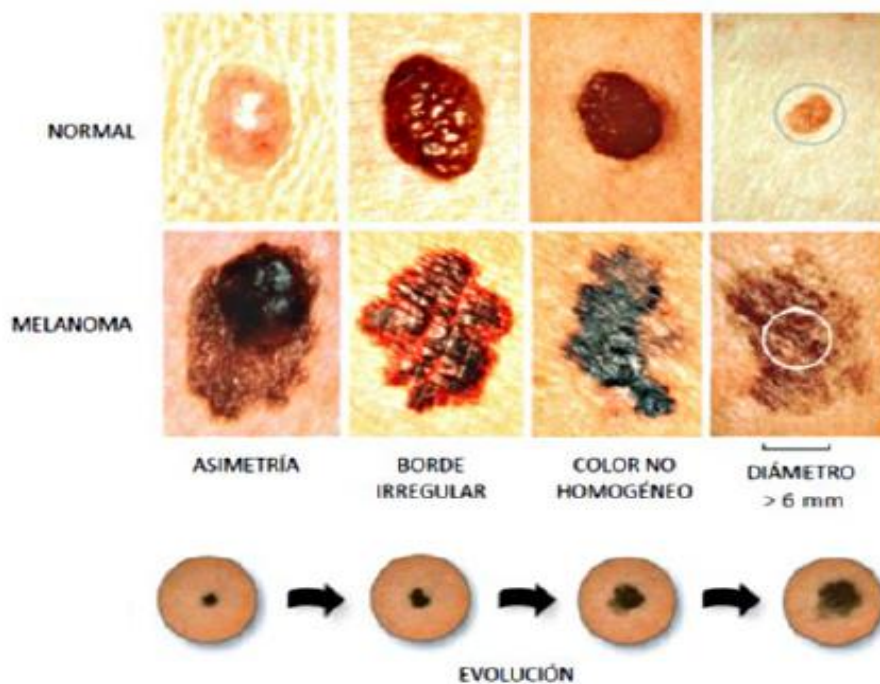


Figura 9. Regla ABCDE para la detección temprana de melanoma.

Tomado de: Fernández-Pérez, et al. Investigación contra el Cáncer; 2013 [citado 30 Oct 2015]. Disponible en: http://www.um.es/eubacteria/resistencia_talon_aquiles_melanoma.pdf

Sign	Implication
CHANGES IN COLOR	
Sudden darkening; brown, black	Increased number of tumor cells, the density of which varies within the lesion, creating irregular pigmentation
Spread of color into previously normal skin	Tumor cells migrating through epidermis at various speeds and in different directions (horizontal growth phase)
Red	Vasodilation and inflammation
White	Areas of regression or inflammation
Blue	Pigment deep in dermis, sign of increasing depth of tumor
CHANGES IN CHARACTERISTICS OF BORDER	
Irregular outline	Malignant cells migrating horizontally at different rates
Satellite pigmentation	Cells migrating beyond confines of primary tumor
Development of depigmented halo	Destruction of melanocytes by possible immunologic reaction and inflammation
CHANGES IN SURFACE CHARACTERISTICS	
Scaliness	Bleeding
Erosion	Ulceration
Oozing	Elevation
Crusting	Loss of normal skin lines
DEVELOPMENT OF SYMPTOMS	
Pruritus	Pain
Tenderness	

Figura 10. Signos Sugestivos de Malignidad en Lesiones Pigmentadas: relacionados con cambios de color, características de los bordes, cambios en la superficie de la lesión y síntomas acompañantes.

Tomado de: Habif T, Clinical Dermatology. A Color Guide to Diagnosis and Therapy 6ta Ed.

Parte de los métodos de cribaje no invasivos usados en esta patología es la dermatoscopia, microscopia de epiluminescencia o microscopia de superficie. La primera descripción detallada de la microscopia de superficie de la piel se debió a Johann Saphier, en 1920, quien acuñó por primera vez el término dermatoscopia; utilizó esta técnica en la evaluación de los capilares en condiciones normales y patológicas de la piel, e identificó las bases morfológicas del color de la piel. En 1994, Stolz desarrolló la regla nemotécnica del ABCD con microscopia, ésta técnica es ampliamente usada por los servicios de dermatología y evalúa cada parámetro con una puntuación específica, a diferencia de la nemotecnia usada como "screening", bajo las mismas siglas, en la cual solo se describen características macroscópicas de las lesiones. Paulatinamente han surgido varios algoritmos usados en dermatoscopia, como el método de Menzies y la regla de los 7 puntos de Argenziano cada uno con su valor diagnóstico específico. ⁽³⁴⁾

La dermatoscopia consiste en visualizar lesiones cutáneas mediante un sistema complejo de lentes, luz directa y un medio de inmersión que reduce notablemente la reflexión. La

sensibilidad y especificidad aportada por esta herramienta es de 91% y 86% respectivamente, pudiendo concluir que la dermatoscopia es un auxiliar diagnóstico muy útil para establecer correlación entre los hallazgos clínicos y patológicos de una lesión pigmentada. Y recordar que uno de los principales principios de la dermatoscopia es “a mayor número de colores más sospecha de malignidad”.⁽³⁴⁾

2.3.5.2. Diagnóstico Histopatológico

La realización de una biopsia y el reporte histológico están indicados ante cualquier lesión pigmentada de la piel, que ha cambiado sus características como color, tamaño, forma. Este procedimiento puede dividirse en:

- **Biopsia excisional:** siendo el método más seguro e indicado cuando se sospecha de melanoma, porque consiste en la extracción de la totalidad de la lesión con un margen de seguridad de 1-2 mm de piel aparentemente normal.
- **Biopsia incisional:** esta consiste en tomar la muestra de la zona sospechosa a la inspección clínica que denote mayor infiltración de la lesión.⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾

El reporte histológico debe basarse en los parámetros establecidos por la American Joint Committee on Cancer (AJCC) que incluye:⁽³⁷⁾

- **Grosor tumoral:** el grosor del tumor primario es el predictor más potente de supervivencia del melanoma y se lo puede hacer de dos maneras:
 - **Índice de Breslow:** Se evalúa midiendo en milímetros desde el aspecto más superficial de la capa de células granulares al punto más profundo de la invasión tumoral. Si la lesión es ulcerada, la medición deberá hacerse desde la base de la ulcera hasta la célula melanocítica más profunda. Los rangos establecidos son: ≤ 1.0 mm, $>1.01-2.0$ mm, $2.01-4.0$ mm y >4 mm.

- **Niveles de Clark:** es otro indicador de profundidad de tumor descrito por Clark como niveles anatómicos de invasión.

Nivel I	Invasión limitada a la epidermis
Nivel II	Invasión parcial de la dermis papilar
Nivel III	Invasión total de la dermis papilar
Nivel IV	Expansión a la dermis reticular
Nivel V	Penetración a tejido celular subcutáneo

Figura 11. Niveles de Clark

Tomado de: Kutlubay Z, Engin B, Serdaroğlu S, Tüzün Y. Current Management of Malignant Melanoma: State of the Art

- **Índice mitótico:** es el conteo de mitosis por mm^2 . El incremento de la actividad mitótica se asocia con un pobre diagnóstico, la presencia de al menos una mitosis por mm^2 tiene relación significativa con la supervivencia. ⁽³⁷⁾
- **Ulceración:** es el resultado de la combinación entre el defecto epidérmico o ausencia de estrato córneo, presencia de cambios reactivos y adelgazamiento, borramiento o hiperplasia reactiva de la epidermis circundante. ⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾
- **Infiltrado inflamatorio, se clasifica como:**
 - **Ausente:** no hay linfocitos entre las células tumorales
 - **No Intenso:** cuando el infiltrado es localizado o focal y no afecta a la totalidad de la fase vertical.
 - **Intenso:** afecta a todo el componente invasivo del tumor.

- **Invasión perineural:** o también llamado neurotropismo, es la invasión de células tumorales en el perineuro o endoneuro de los nervios.

- **Fase de crecimiento:** es el patrón de dirección del crecimiento celular.
 - **Radial:** las células malignas se encuentran limitadas a la epidermis (in situ) o pueden encontrarse también en la dermis pero formando nidos o bien aisladas, no hay presencia de mitosis.
 - **Vertical:** las células tumorales se extienden hacia la dermis formando nidos, en las que además se puede observar mitosis.

- **Satelitosis:** definida como cualquier nido celular metastásico discontinuo, mayor a 0.05 mm de diámetro, que se encuentre claramente separado por dermis normal (no fibrosis o inflamación) del componente principal de melanoma por una distancia de al menos 0.3 mm. ⁽³⁷⁾

- **Elastosis actínica:** es el cambio del tejido normal de la piel por depósitos anormales de fibras elásticas, degeneración de colágeno y microvasculatura dilatada, provocado por la exposición prolongada a la radiación solar.

2.3.5.3. Factores Pronósticos

El melanoma maligno es el tipo más mortal de los cánceres de piel. Las tasas de supervivencia del melanoma dependen si es detectado en las primeras etapas, esto es generalmente cuando el tamaño del tumor es pequeño y tratable. Después de un correcto diagnóstico, el pronóstico de melanoma es determinado por la evaluación de una serie de factores histopatológicos, tales como el grosor del tumor, los niveles de invasión, la presencia de ulceración, índice mitótico y el número de ganglios linfáticos metastásicos

involucrados. Factores pronósticos clínicos como la edad, sexo, localización anatómica del tumor pueden también ser utilizados para determinar la posible progresión del cáncer y las tasas de supervivencia del paciente. ⁽⁴⁰⁾

En el sistema de estadificación empleado por la AJCC ⁽³⁷⁾, el espesor tumoral es el factor pronóstico independiente, dominante, en la determinación del riesgo de metástasis y la supervivencia. La ulceración es el segundo factor de peor pronóstico, tanto así que su presencia en tumores de menos de 1 mm provoca una reducción en la tasa de supervivencia del 4%. Una alto recuento mitótico, la presencia de muchas células en fase mitótica, también se correlaciona con una mayor probabilidad de positividad en la biopsia de ganglio centinela, es decir mayor capacidad de diseminación de las células tumorales.

⁽³⁷⁾⁽⁴⁰⁾

2.3.6. CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA

El melanoma comienza ya sea de *novo* o se desarrolla a partir de una lesión preexistente, como un lunar congénito o atípico. Una clasificación en varios tipos diferentes se ideó después de observar que la anatomía microscópica del tumor en la periferia de la masa tumoral elevada era variable y poseía patrones característicos que pueden ser correlacionados con presentaciones clínicas. ⁽¹⁶⁾

Clark et al., define cuatro tipos principales de melanoma basado en gran medida en el patrón de crecimiento de sus partes intraepiteliales y son:

2.3.6.1. Melanoma de Extensión Superficial (MES): es el tipo más común (70% de los casos), entre la cuarta y quinta década de vida, puede ocurrir a cualquier edad y en cualquier parte del cuerpo y es más común en las personas de raza blanca. Se presenta principalmente en zonas expuestas de manera intermitente al sol sobre todo en

extremidades inferiores en mujeres y en dorso en hombres. Generalmente es plano e irregular en forma y color, con sombras variables de negro y café. La fase de crecimiento radial puede durar meses o por más de 10 años (Figura 12). Los nódulos aparecen cuando la lesión es de aproximadamente 2,5 cm de diámetro. ⁽¹⁶⁾⁽³⁸⁾

Histológicamente tiene un componente intra-epidérmico que se extiende unas pocas crestas epiteliales más allá de la dermis, se encuentran melanocitos atípicos dispersos como “perdigones” o también pequeños nidos de ellos dentro de la epidermis y en ocasiones en estructuras epiteliales anexas. Los melanocitos neoplásicos son grandes, se caracterizan por tener abundante citoplasma, pigmento melánico disperso, vesículas nucleares y nucléolo prominente. Se puede observar regresión, manifestándose como una zona dentro de la epidermis en la que los melanocitos neoplásicos están disminuidos en comparación con el resto de la lesión y acompañados de un infiltrado de linfocitos y melanófagos, engrosamiento de la dermis papilar, telangiectasias, fibrosis, y pérdida del patrón de crestas reticulares en proporciones variables. ⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾

SUPERFICIAL SPREADING MELANOMAS

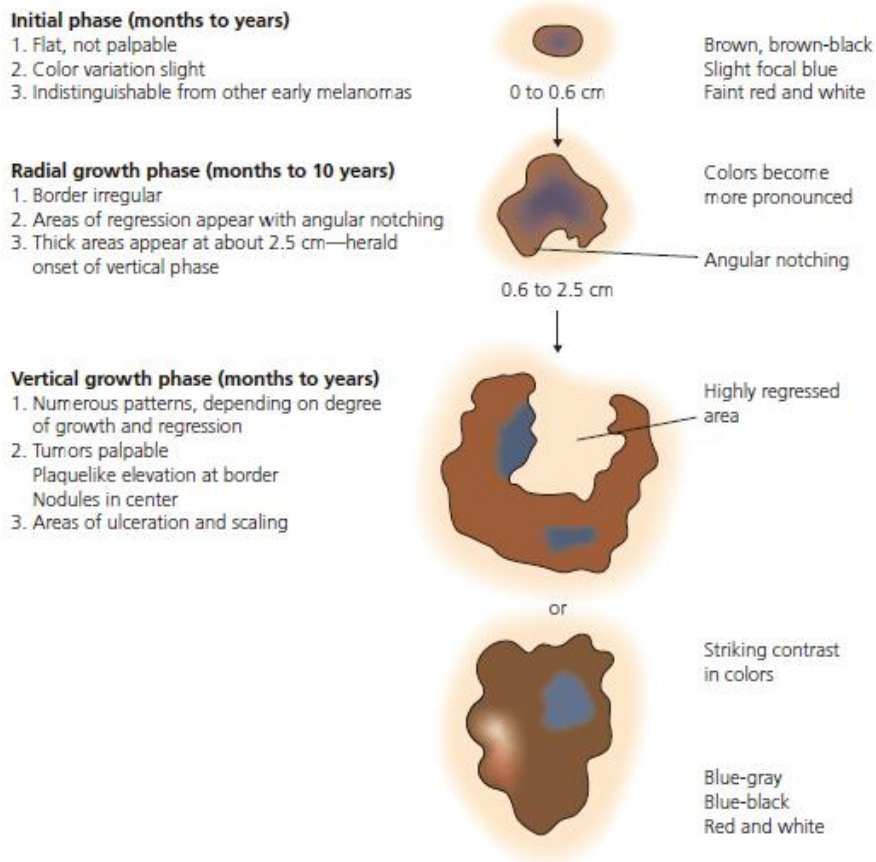


Figura 12. Fases de desarrollo del melanoma de extensión superficial

Tomado de: Habib T, Clinical Dermatology. A Color Guide to Diagnosis and Therapy 6ta Ed.

2.3.6.2. Melanoma Nodular (MN): Constituye alrededor del 15 a 30% de los casos en pacientes de aproximadamente 50-60 años, tiende a afectar más al sexo masculino en una proporción 2:1. Aparece en cualquier parte del cuerpo pero principalmente en tronco y extremidades, presenta exclusivamente fase de crecimiento vertical, lo cual condiciona su comportamiento agresivo. Todos los nódulos de melanoma maligno comienzan como máculas. Las máculas se extienden horizontalmente para formar parches y posterior a eso verticalmente para formar pápulas y luego nódulos (Figura 13). La diferencia entre un nódulo de melanoma que se desarrolla en un MSE, un LMM, o un MAL y un melanoma "nodular" es que un melanoma nodular no tiene parche o componente de placa detectable cuando se realiza la inspección de la lesión. Generalmente empieza como un

área elevada de color azul-negro oscuro o rojo-azulado, aunque algunos son amelanóticos, al observarlos de cerca a veces pueden revelar manchas de pigmentación que se sitúan de forma asimétrica dentro del nódulo. Puesto que el pronóstico de los melanomas es dependiente de espesor tumoral este tipo histológico puede anunciar mayor riesgo de metástasis. ⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾

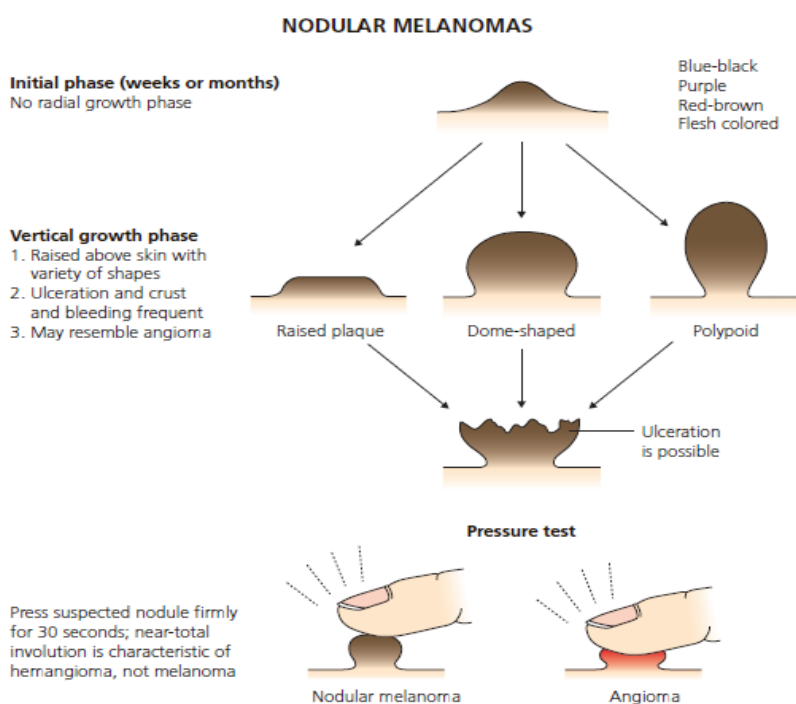


Figura 13. Fases de desarrollo del melanoma nodular

Tomado de: Habif T, Clinical Dermatology. A Color Guide to Diagnosis and Therapy 6ta Ed.

2.3.6.3. Melanoma Lentigo Maligno (LMM): Representa aproximadamente el 10 al 15% de los casos, entre los 70 y 80 años. Ocurre más comúnmente en la piel dañada por exposición acumulada al sol, en la cara, el cuello y los brazos, por lo que también se lo conoce como melanoma in situ. Las áreas de piel anormal generalmente son grandes, planas y de color bronceado con manchas cafés entremezcladas. ⁽¹⁶⁾⁽³⁸⁾⁽⁴⁰⁾

Presenta un lento crecimiento a expensas de una prolongada fase radial, con el tiempo, un área indurada o una placa puede desarrollarse como un signo de invasión (Figura 14). Comienza como una proliferación de melanocitos individuales en la capa basal de la epidermis y no suele encontrarse abundante elastosis. Los melanocitos neoplásicos más a menudo tienen núcleos hiper cromáticos, escaso citoplasma, y formas anguladas. (38)(39)(40)

Es comparativamente el tipo histológico de mejor pronóstico.

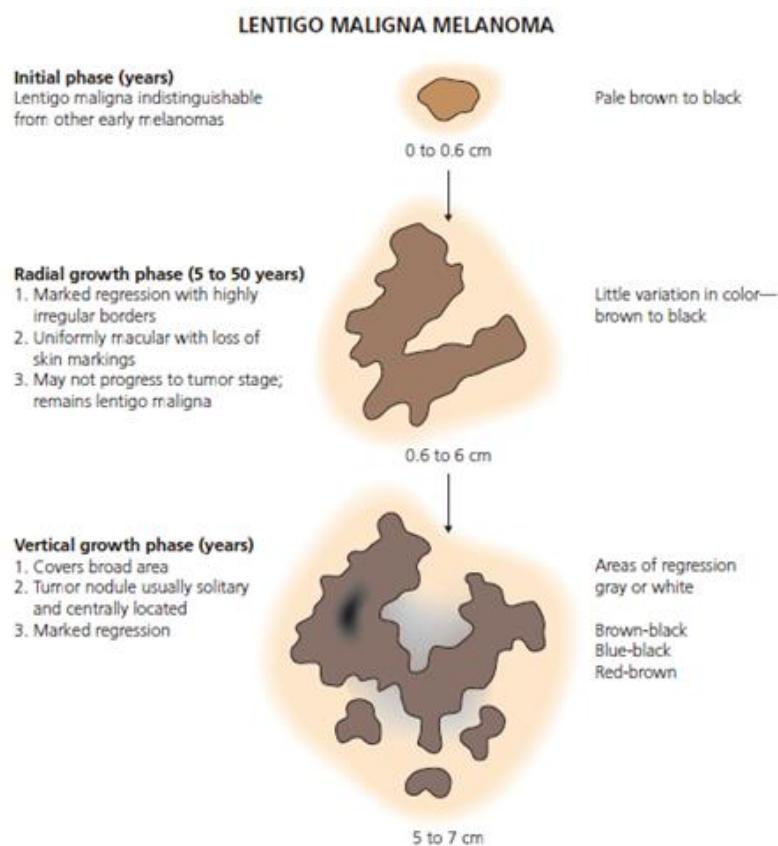


Figura 14. Fases de desarrollo del melanoma lentigo maligno

Tomado de: Habif T, Clinical Dermatology. A Color Guide to Diagnosis and Therapy 6ta Ed.

2.3.6.4. Melanoma Lentiginoso Acral (MAL): Es la forma menos común de melanoma en caucásicos, se presenta en el 2 a 8% de los pacientes de raza blanca y en el 60 al 72% en raza negra. La edad aproximada de aparición es a los 65 años. Generalmente ocurre en las palmas de las manos, las plantas de los pies o por debajo de las uñas y es

más común en las personas de raza negra, tiene predilección por las zonas de presión, que incluyen el dedo gordo del pie, el talón, y la cara lateral de la planta del pie. La lesión inicial está dada como una mácula asimétrica color marrón-negro, las máculas progresarán con el tiempo hasta convertirse en para placas irregulares que pueden ulcerarse. ⁽¹⁶⁾⁽³⁹⁾

El melanoma de la unidad ungueal es más común en el primer dedo del pie, aunque puede afectar a cualquier dígito. Las manifestaciones tardías de melanoma subungueal incluyen onicolísis, una masa subungueal, y la erosión a través la lámina ungueal. ⁽³⁹⁾

Es importante destacar que tanto el tipo de extensión superficial como el nodular se pueden presentar en sitios acrales (Figura 15).

Histológicamente en sus inicios presenta un patrón de crecimiento basilar en el que predominan los melanocitos individuales, estos melanocitos son igualmente de forma angulada y cuentan con núcleos hipercromáticos y escasa citoplasma. ⁽³⁹⁾

Melanoma Acro-Lentiginoso
2-8% de melanomas en población caucásica. 30-75% de melanomas en personas de raza negra, asiáticos e hispanos. Localización más frecuente en palmas y plantas. Bajo superficie de la uña: signo Hutchinson

Figura 15. Melanoma Acro-lentiginoso

Tomado de: Habif T, Clinical Dermatology. A Color Guide to Diagnosis and Therapy 6ta Ed.

2.3.6.5. Otras Variedades de Melanoma:

- **Melanoma de la Mucosa:** Las localizaciones más frecuentes son las superficies mucosas de la cabeza y el cuello (cavidades nasal, oral y retina) y la mucosa vulvar o anorrectal. ⁽¹⁶⁾
- **Melanoma Desmoplásico-Neurotrópico:** es un subtipo raro, agresivo en forma local y asociado a una tasa elevada de recurrencias locales. Se desarrolla con mayor frecuencia en la piel de la cabeza y el cuello expuesta al sol de individuos de edad avanzada, por lo general durante la sexta y la séptima décadas de la vida. Puede variar en su color, tiende a ser firme y se caracteriza por tener el aspecto de cicatriz por lo que se puede confundir con una cicatriz tipo quiste o queloide. ⁽¹⁶⁾

2.4. INMUNOHISTOQUÍMICA

2.4.1 DECLARACIÓN DE BÚSQUEDA

La búsqueda de información se realizó a través de revistas médicas científicas y buscadores académicos, usando las siguientes palabras claves en los idiomas inglés y español: melanoma maligno, lesiones melanocíticas, inmunohistoquímica, dermatopatología, citología, marcadores, S-100, HMB-45, MELAN-A. Se incluyeron además filtro como: fechas de publicación, tipos de estudio y disponibilidad de textos en formato completo. Los artículos se seleccionaron según la pertinencia del título, del resumen y de la relación que tuvieron con las preguntas de investigación planteadas en esta tesis. Los artículos nombrados a continuación fueron tomados en cuenta para la redacción de los marcadores inmunohistoquímicos en el marco teórico y discusión.

Resultados de la Búsqueda:

AMERICAN JOURNAL CLINICAL PATHOLOGY (AJCP): 1694 artículos relacionados, de los cuales según nuestro interés de búsqueda se seleccionaron los siguientes:

- Immunohistochemical Evaluation of Necrotic Malignant Melanomas.
- Comparison of Five Antibodies as Markers in the Diagnosis of Melanoma in Cytologic Preparations.
- Malignant Melanoma 2003: Predisposition, Diagnosis, Prognosis, and Staging.
- Primary Melanoma of the Skin and Cutaneous Melanomatous Metastases.

AMERICAN JOURNAL OF DERMATOPATOLOGY: 440 resultados

- S100 Negative Junctional Melanocytic Proliferations.
- Melan-A: not a helpful marker in distinction between melanoma in situ on sun-damaged skin and pigmented actinic keratosis.
- Evaluation of the role of routine melan-A immunohistochemistry for exclusion of microinvasion in 120 cases of lentigo maligna.
- Utilization and Utility of Immunohistochemistry in Dermatopathology.
- Diagnostic utility and comparative immunohistochemical analysis of MITF-1 and SOX10 to distinguish melanoma in situ and actinic keratosis: a clinicopathological and immunohistochemical study of 70 cases.
- Differences in tumor thickness between hematoxylin and eosin and Melan-A immunohistochemically stained primary cutaneous melanomas.
- Immunohistochemical double stains against Ki67/MART1 and HMB45/MITF: promising diagnostic tools in melanocytic lesions.

PUBMED: 321 resultados

- Immunohistochemistry in Dermopathology.
- S-100 protein family and its application in clinical practice.
- The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A).
- Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma.

ANNAL OF ONCOLOGY: 73 resultados

- Biomarkers in Melanoma.

2.4.2. GENERALIDADES DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica constituye en la actualidad una herramienta diagnóstica que ha revolucionado la histopatología y se ha convertido en pieza fundamental en la dermatopatología.

Su descubrimiento inicia en la Universidad de Harvard en 1941, gracias a la acción de Albert H. Coons, Hugh Creech, Norman Jones y Ernst Berlinier⁴⁰ quienes desarrollaron la metodología de anticuerpos marcados con fluorescencia, con lo que lograron el estudio de diversos antígenos, identificación de proteínas tisulares, complejos inmunes, antígenos virales en células infectadas y antígenos tumorales en diversas neoplasias, sentando así las bases de la inmunohistoquímica actual. ⁽⁴⁰⁾

Posteriormente, varios investigadores fueron aportando con hallazgos importantes, desde el descubrimiento de la estructura de las inmunoglobulinas por Rodney Porter y Gerald Edelman⁴⁰ en 1959, hasta la creación de anticuerpos monoclonales en 1984 por Cesar

Milstein, Georges JF Köhler y Niels K Jerne⁴⁰ quienes recibieron el Premio Nobel de Medicina por su aportación en la producción de anticuerpos *in vitro*.⁽⁴⁰⁾

La inmunohistoquímica es una técnica esencial en el diagnóstico anatómico-patológico de las enfermedades tumorales, principalmente en la determinación de la estirpe o la diferenciación de las neoplasias, además que permite reconocer la estructura molecular de un tejido. Es una potente herramienta que facilita la detección y visualización de moléculas de proteínas en las células o en su superficie a través de microscopía tradicional. Es de gran utilidad en el diagnóstico de tumores metastásicos de origen primario desconocido, tumores de partes blandas, linfomas, etc; además que sirven también como factor pronóstico en varios tipos de neoplasias.⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽⁴¹⁾

Estos procedimientos inmuno-enzimáticos demuestran una variedad de antígenos presentes en las células o los tejidos, utilizando anticuerpos mono o policlonales marcados, basándose en la capacidad de estos anticuerpos para unirse específicamente a los correspondientes antígenos. La reacción se hace visible solo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o que produce coloración.⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾⁽⁴¹⁾

Según el sitio de localización, la inmunomarcación de antígenos celulares puede presentarse en la membrana, en el núcleo, en el citoplasma, o de manera mixta (citoplasma y núcleo) como la proteína S-100, así como también en localizaciones extracelulares; por lo tanto, es necesario que el patólogo sepa reconocer las características generales de los antígenos, los tejidos que pueden reaccionar a estas coloraciones, la localización celular donde se dará la reacción, y sobre todo, debe tener en mente las posibles reacciones cruzadas inespecíficas de cada anticuerpo.⁽⁴⁰⁾

“Existen 2 factores que influyen en la inmunomarcación: el factor preanalítico (intrínseco) y el factor analítico (extrínseco). El factor pre-analítico se refiere a las características del tejido y la preservación adecuada de las características antigénicas que dependerá del tipo de fijador empleado, de la fijación adecuada, y del tiempo de la

fijación. El formol buffer al 10% es el fijador más utilizado, debido a que su pH influencia directamente en la conservación antigénica de los tejidos y su variación podría alterar la estructura proteica de los epítopes. Algunos procedimientos técnicos, como el sobrecalentamiento del tejido, la descalcificación y la congelación, también pueden afectar la preservación antigénica. Los factores extrínsecos son los elementos externos al tejido que pueden controlarse en el laboratorio de inmunohistoquímica e incluyen: el tipo de anticuerpo utilizado, la sensibilidad y dilución, el sistema de detección, los cromógenos empleados, el método de recuperación utilizado y la interpretación de la reacción por el patólogo.”⁽⁴⁰⁾

2.4.2.1. Principios y Procedimientos

La inmunohistoquímica se puede realizar en tejidos de biopsia y de autopsia, generalmente fijados en formol e incluidos en parafina, siendo estos los pasos fundamentales para el correcto desarrollo de las técnicas. Una fijación inadecuada impide cualquier resultado fiable.⁽⁴¹⁾

“En general, la tinción inmunohistoquímica junto con el sistema de detección, permite la visualización de antígenos a través de la aplicación secuencial de un anticuerpo específico (anticuerpo primario) al antígeno, un anticuerpo secundario (anticuerpo de unión) al anticuerpo primario, un complejo enzimático y un sustrato cromogénico, con etapas de lavado intermedias. La activación enzimática del cromógeno da lugar a un producto de reacción visible en el sitio del antígeno.”⁽⁴²⁾

Para la interpretación de las tinciones se debe procesar un control positivo y negativo del tejido que pueden ser células o componentes que se reconozcan con la tinción. Los tejidos de control deben ser procesados de manera idéntica al de los cortes en estudio.

“Las muestras de control positivo deben examinarse en primer lugar para asegurarse de que todos los reactivos funcionan correctamente. La presencia de un producto final de color marrón en el lugar del antígeno diana, indica reactividad positiva.”⁽⁴²⁾

“Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.”⁽⁴²⁾

“Las muestras de control negativo deben ser examinadas para comprobar el marcado específico del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en las muestras de control negativo confirmará la especificidad del anticuerpo primario.”⁽⁴³⁾

Muchos de los problemas que se informan en la literatura, se atribuyen a los problemas técnicos y metodológicos, principalmente en lo relacionado a la conservación de los tejidos y al procesamiento de los mismos. Es por esto que el uso de protocolos estandarizados para realizar diagnósticos inmunohistoquímicos es de vital importancia, así como también la realización de controles continuos de calidad, para mantener la acreditación correspondiente en los laboratorios especializados en la materia.

2.4.3. PROTEÍNA S-100

Es uno de los primeros marcadores utilizados para el diagnóstico de melanoma maligno. Es una proteína que fue detectada inicialmente en las células gliales del sistema nervioso central, y obtuvo su nombre debido a la solubilidad en sulfato de amonio al 100% en pH neutro. Fue identificada por B.W.Moore en 1965.⁴⁴ En 1981 Gaynor y sus colaboradores¹² descubrieron que la proteína S-100 se encontraba en las células humanas de melanoma, y posteriormente la aplicaron como un indicador diagnóstico de este tipo de tumor.⁽⁴⁴⁾⁽¹²⁾

Las proteínas de la familia S-100 son pequeñas, ácidas, de 10-12 kDa y se han identificado 25 proteínas pertenecientes a este grupo.⁴⁴ Su función no se ha determinado con precisión, sin embargo, se cree que su acción se basa en el paso del calcio intracelular, en el ensamblaje de los microtúbulos o en ambos.⁽¹⁰⁾

Existen 2 subunidades (α y β), que forman tres isotipos: a) proteína S-100 $\alpha\alpha$ expresada en el músculo; proteína S-100 $\alpha\beta$ expresada en melanocitos, células de la glía, condrocitos y células mioepiteliales de ovillos secretores de unidades ecrinas y apocrinas; y c) proteína S-100 $\beta\beta$ expresada en células de Langerhans y células de Schwann.⁽¹⁰⁾

La inmunoreactividad debería ser nuclear y citoplasmática para considerar un resultado válido. Estudios con microscopía electrónica han verificado la presencia de ésta proteína en ambos compartimentos intracelulares tanto en melanocitos normales como en neoplásicos.⁽¹²⁾⁽⁴⁴⁾

Muchos anticuerpos se han desarrollado para el reconocimiento de la proteína S-100, algunos de los cuales son dímero-específicos. En la práctica general los anticuerpos reconocen a los 3 isotipos de la proteína, para que sea usado satisfactoriamente como una herramienta de alta sensibilidad, capaz de detectar todas las células que contienen a la proteína S-100, es por eso que se considera que más del 98% de casos de melanoma maligno son S-100 positivos.⁽¹²⁾⁽⁴⁴⁾

Otros tipos de tumores sensibles al marcador S-100 que deben ser considerados en el diagnóstico diferencial de lesiones melanocíticas incluyen varios carcinomas pobremente diferenciados, proliferaciones histiocíticas, gliomas, tumores de la vaina de nervios periféricos, y lesiones de células de Langerhans, lo que limita su especificidad como marcador de neoplasias melanocíticas.⁽¹²⁾⁽⁴⁴⁾

Existen varios tipos de melanoma poco comunes como el melanoma desmoplásico y de células fusiformes, que son sensibles pero no específicos para el marcador S-100.

Un gran reto diagnóstico es el melanoma metastásico principalmente en ganglio centinela, sobre todo cuando se intenta identificar pequeños focos celulares donde el muestreo y seccionamiento de los tejidos es indispensable, es entonces donde interviene la inmunohistoquímica como herramienta diagnóstica donde una de sus principales utilidades es resaltar estos pequeños grupos celulares. Los marcadores más comúnmente usados para melanoma metastásico son el S-100, HMB-45, MELAN-A/MART-1. El S-100 es altamente sensible, sin embargo es expresado en múltiples tipos de células incluyendo células dendríticas y ciertos macrófagos, es por eso que su interpretación en nódulos linfoides puede ser dificultosa, por lo que es recomendable asociarlo con otros marcadores. ⁽¹⁴⁾

2.4.4. HMB-45 Y MELAN-A

A inicios del año 1980s, la disponibilidad de la tecnología acerca de anticuerpos monoclonales fue aplicada para buscar reactivos específicos para melanoma, no solo por la necesidad diagnóstica sino también para la utilidad terapéutica. ⁽¹²⁾

En la actualidad se ha desarrollado un grupo de anticuerpos monoclonales para determinar glucoproteínas procedentes del linaje melanocítico. Este grupo se denomina gp-100 y corresponde al c-DNA de donde ha sido clonada, del cual dos proteínas han sido codificadas, éstas son: gp-100 (peso molecular 100 kd) y gp-10 (peso molecular 10 kd). Otro producto de la traducción de cDNA relacionado con gp-100-C1 es la proteína melanocítica llamada Pmel-17, ambas proteínas son localizadas en las membranas internas de los pre-melanosomas tipo 1,2 y 3 y son reconocidas por los linfocitos T citotóxicos. ⁽¹²⁾

Los anticuerpos que reconocen a este grupo de proteínas gp-100/Pmel-17 incluyen: MART-1 (melanoma antigen recognize by T cells-1), conocido también como MELAN-A y HMB-45, han demostrado tener varios niveles de sensibilidad y especificidad para

melanocitos, nevus y otros tipos de melanomas, así como también de otras líneas celulares y tumorales. En la práctica éstos marcadores han sido mayormente utilizados como agentes confirmatorios de la positividad del S-100 en neoplasias melanocíticas.⁽¹²⁾⁽¹⁴⁾

El MELAN-A es una proteína que forma parte de la membrana del premelanosoma, producto del gen MART-1, se expresa en melanocitos normales, nevus y melanomas, además de células retinales, corteza suprarrenal, ovario y células de Leydig del testículo. Su tinción es más intensa que la de la proteína S-100, y juntas potencian la capacidad de diferenciación de la estirpe melanocítica.⁽¹⁰⁾⁽¹⁴⁾

Es difícil reconocer los melanocitos intraepidérmicos en una tinción con hematoxilina-eosina en piel con importante daño actínico, complicando la diferenciación entre queratinocitos pigmentados y la verdadera densidad melanocítica, es aquí donde el rol de la inmunohistoquímica juega un papel importante para precisar el diagnóstico. El MELAN-A ha sido ampliamente valorado en este aspecto pero a la vez se ha visto que este marcador podría incrementar los falsos positivos debido a una percepción errónea del número de melanocitos, ya que la inmunotinción abarca los melanocitos y sus dendritas citoplasmáticas hasta rodear los queratinocitos vecinos, pudiendo confundir el diagnóstico de melanoma con queratosis actínica pigmentada ó una piel con daño actínico crónico.⁽¹⁰⁾⁽¹⁴⁾

El MART-1/MELAN-A tiene la capacidad de distinguir las células tumorales de ciertos tipos de carcinoma adrenocortical y de tumores de los cordones sexuales, se cree que esto se debe a que estos marcadores reconocen un epítipo que comparte características moleculares con las proteínas gp-100 y Pmel-17 debido a que no se evidenció una diferenciación melanocítica en dichas neoplasias.⁽¹²⁾

El HMB-45 es un anticuerpo monoclonal que actúa al unirse con la glucoproteína gp-100 del premelanosoma, anteriormente mencionado. Su función es identificar a melanocitos

inmaduros, activados e intraepidérmicos. Es un marcador más específico que la proteína S-100 pero menos sensible (Tabla 1), una característica importante a considerar de ese marcador es que puede generar reacción positiva en nevus benignos, nevus de Spitz y en melanocitos que se sobreponen a una cicatriz. ⁽¹⁰⁾⁽¹²⁾

El MELAN-A y HMB-45 generan tinción citoplasmática que se considera positiva cuando la reacción es mayor al 10% de células tumorales. ⁽⁴⁵⁾

Ninguno de los anticuerpos mencionados anteriormente poseen una positividad de la tinción mayor al 10% en melanomas de células fusiformes, desmoplásicos y neuroides, ya que estas variantes neoplásicas típicamente manifiestan una evolución desde el fenotipo melanocítico hacia uno fibroblástico o tipo célula de Schawnn, perdiendo en este proceso su habilidad para sintetizar pre-melanosomas y proteínas relacionadas con estos organelos. ⁽¹²⁾⁽⁴⁵⁾

Tabla 5. Comparación de la Sensibilidad, Especificidad y Valor Predictivo Positivo/Negativo de los Marcadores Inmunohistoquímicos para Diagnóstico de Melanoma Maligno Cutáneo

	Sensibilidad	Especificidad	Valor Predictivo Positivo	Valor Predictivo Negativo
S-100	88	70	78	82
HMB-45	92	97	97	92
MELAN-A	95	97	97	94
S-100+/HMB-45+	80	100	100	80
*Mitf+/Melan A+	95	100	100	94

*Mitf, factor de transcripción de microftalmía

*Todos los valores han sido reportados en porcentajes

Fuente: Comparison of Five Antibodies as Markers in the Diagnosis of Melanoma in Cytologic Preparations

Modificado por: Dayana Pita y Karina Rosillo

2.5. JUSTIFICACIÓN

El melanoma ha tenido un claro y sostenido aumento en la incidencia a nivel mundial. En Estados Unidos este aumento ha sido a razón de 2.6% anual en la población general y en el Ecuador el aumento de la incidencia estandarizada fue de hasta 0.9 por cada 100.000 habitantes en hombres y 0.1 por 100.000 habitantes en mujeres durante los años 2006-

2010, según los datos del libro de Registro Nacional de Tumores de SOLCA Quito del 2010. ⁽⁷⁾

La incidencia de melanoma es relativamente baja en comparación con otros carcinomas pero la tasa de mortalidad es elevada por tratarse de una malignidad altamente agresiva. Este aumento guarda también relación con la falta de progreso diagnóstico y terapéutico frente a esta enfermedad.

Actualmente el incremento incipiente de casos de melanoma maligno ha hecho que el interés por la investigación de esta patología sea escaso en nuestro país, es por esto que hemos enfocado nuestra atención en la realización de este estudio, con el propósito de determinar la utilidad de técnicas inmunohistoquímicas en la confirmación diagnóstica del melanoma maligno, para así aportar al progreso diagnóstico, con el fin de mejorar el manejo integral de los pacientes.

2.6. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe correlación de los marcadores inmunohistoquímicos S-100, HMB-45, MELAN-A con las variables histopatológicas, localización de la lesión y la supervivencia, de pacientes diagnosticados de melanoma maligno en el centro de la piel (CEPI) durante Enero del 2012 hasta Septiembre del 2015?

2.7. OBJETIVOS

2.7.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la utilidad de los marcadores inmunohistoquímicos (S-100, HMB-45, MELAN-A), y la relación entre características histopatológicas, localización de la lesión y supervivencia de pacientes diagnosticados de melanoma maligno en el Centro de la Piel (CEPI).

2.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprobar la utilidad de los marcadores inmunohistoquímicos (S-100, HMB-45 y MELAN A) en la confirmación diagnóstica de melanoma cutáneo.
- Demostrar la asociación de las variables histopatológicas usando la tinción hematoxilina-eosina con el resultado de los marcadores inmunohistoquímicos (S-100, HMB-45 y MELAN A).
- Asociar la localización de la lesión con el resultado de los marcadores inmunohistoquímicos (S-100, HMB-45 y MELAN A).
- Comparar el índice de Breslow con tinción hematoxilina-eosina versus el índice de Breslow con tinción inmunohistoquímica.
- Comprobar la relación entre las variables demográficas género-edad, la localización de la lesión, variables histopatológicas, supervivencia de los pacientes.

2.8 HIPÓTESIS

- Los marcadores inmunohistoquímicos son útiles para la confirmación diagnóstica de melanoma cutáneo.
- Existe relación entre los marcadores inmunohistoquímicos S-100, HMB-45, MELAN-A con las variables histopatológicas, localización de la lesión y la supervivencia de los pacientes con melanoma maligno, diagnosticados en el centro de la piel (CEPI) durante el año 2012-2015.
- Existe diferencia entre el índice de Breslow con tinción hematoxilina-eosina versus el índice de Breslow con tinción inmunohistoquímica.

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1. TIPO DE PROYECTO

Este proyecto presenta características de tipo investigativo, basándose en la recolección de datos desde historias clínicas y en resultados obtenidos a partir de la aplicación de marcadores inmunohistoquímicos en muestras histopatológicas, que luego de ser analizados nos permitan emplear métodos más precisos o complementarios en el diagnóstico de melanoma maligno cutáneo.

3.2. TIPO DE ESTUDIO

El estudio realizado es de tipo transversal retrospectivo, cumpliendo con características de una investigación analítica descriptiva y observacional.

3.3. LUGAR Y PERÍODO EN EL QUE SE REALIZÓ LA INVESTIGACIÓN

El análisis inmunohistoquímico fue realizado en el Laboratorio particular IHQRRP con la dirección del especialista en patología, en el período comprendido entre septiembre a octubre del 2015.

3.4. UNIVERSO Y MUESTRA

Del archivo del servicio de patología del Centro de la Piel (CEPI) se recolectaron los datos clínicos, placas e informes histopatológicos y bloques de parafina de los pacientes con diagnóstico de melanoma maligno, quienes conformaron el universo total de nuestro estudio.

3.4.1. PROCEDIMIENTOS DE DIAGNÓSTICO E INTERVENCIÓN

Los tejidos conservados en bloques de parafina fueron previamente procesados y fijados según los protocolos utilizados por el personal de patología del Centro de la Piel (CEPI).

Según el protocolo para tinción inmunohistoquímica de Roche® (ver detalles de procedimientos manual y automatizado en Anexo 1), modificado en el laboratorio, se siguieron los siguientes pasos:

1. Mantener refrigerados los bloques de parafina a una temperatura de 15-25°C hasta obtener una consistencia adecuada previa a la realización de los cortes.
2. Cortar los bloques congelados de parafina a un grosor de 3 micras (μ). Realizar tres cortes por bloque.
3. Colocar los cortes en agua caliente (60°) y pescarlos en un portaobjetos especial para inmunohistoquímica.
4. Rotular adecuadamente los portaobjetos.
5. Secar los portaobjetos a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, preferiblemente toda la noche.
6. Desparafinizar los cortes con ayuda de una plancha caliente a una temperatura menor a 60°.
7. Pasar por alcohol Xilol los portaobjetos para eliminación de residuos de parafina.
8. Secar los portaobjetos a temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos.
9. Colocar la etiqueta de código de barras adecuada para cada marcador en portaobjetos secos.
10. Ubicar las placas etiquetas en la equipo Benchmark IHC/ISH Gx de Roche.
11. Poner los anticuerpos primarios (S-100, HMB-45 y MELAN A), los dispensadores del KIT *ultraView* Universal DAB Detection de Ventana y los reactivos accesorios necesarios en la bandeja de reactivos y colocarla en el módulo de tinción automatizado.

12. Comprobar los líquidos a granel y los residuos.
13. Iniciar módulo de tinción automatizado, duración aproximada tres horas.
14. Al terminar el proceso, lavar y deshidratar las placas con alcoholes: metanol, isopropílico y xilol.
15. Realizar el montaje del cubreobjetos con instofluid.
16. Valorar al microscopio.

3.4.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

1. Disponibilidad de placas histológicas y bloque de parafina sobre el que se ha realizado el diagnóstico de melanoma maligno
2. Disponibilidad de historias clínicas de pacientes con diagnóstico de melanoma maligno incluidos en el estudio.
3. Buena preservación y fijación del tejido.

3.4.3. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

1. Pacientes con diagnóstico de melanoma maligno localizado en región genital y mucosas.
2. Cortes histopatológicos con material insuficiente para la realización de los estudios inmunohistoquímicos.
3. Muestra sin diagnóstico histopatológico de melanoma.

3.5. MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE MUESTRA

Los datos utilizados en este estudio han sido recolectados a partir de historias clínicas realizadas en el centro de la piel (CEPI) desde enero del 2012 hasta septiembre del 2015, en pacientes con diagnóstico de melanoma maligno. Inicialmente se encontraron 43 presuntos casos clínicos de melanoma a través del buscador virtual en la base de datos CEPI, de los cuales bajo los criterios de inclusión y exclusión fueron seleccionados 25 pacientes.

Adicionalmente se utilizaron placas histológicas y bloques de parafina previamente obtenidos desde las biopsias de las lesiones sugerentes de esta patología, mediante las cuales se llegó al diagnóstico definitivo de melanoma maligno.

Las muestras histológicas de los pacientes seleccionados fueron transportadas a un laboratorio de patología, privado, donde, con ayuda de microscopia tradicional se escogió la placa teñida con hematoxilina-eosina y su bloque de mejor calidad.

La valoración de supervivencia se realizó mediante llamada telefónica, no se especificó la causa de muerte.

3.6. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DIMENSIÓN	DEFINICIÓN	INDICADOR	ESCALA
Edad	Categórica ordinal	De 15 a ≥ 75 años	Tiempo que ha vivido una persona	Años	Categoría: 1 = Grupo I: 15-29 2 = Grupo II: 30-44 3 = Grupo III: 45-59 4 = Grupo IV: 60-74 5 = Grupo V: ≥ 75
Género	Categórica nominal	- Masculino - Femenino	Condición orgánica que distingue a los hombre de las mujeres	Masculino y Femenino	Categoría: 1 = Masculino 2 = Femenino
Localización de la lesión	Categórica nominal	Localización anatómica de la lesión	Ubicación topográfica de la lesión primaria	- Cabeza y Cuello (CC) - Tronco (T) - Extremidades superiores (ES) - Extremidades inferiores (EI) - Palmas y plantas (PP)	Categoría: 1 = CC 2 = T 3 = ES 4 = EI 5 = PP
Clasificación Histológica	Categórica nominal	Subtipos de melanoma cutáneo maligno	Clasificación actual usada para la diferenciación de los subtipos de melanoma maligno	- Extensión Superficial (ES) - Nodular (N) - Lentigo Maligno (LM) - Acro-Lentiginoso (AL) - Otros (O)	Categoría: 1 = ES 2 = N 3 = LM 4 = AL 5 = O
Fase de crecimiento	Categórica nominal	Orientación de la invasión de células tumorales	Dirección de la invasión de las células tumorales	- Vertical - Radial	Categoría: 1 = Vertical 2 = Radial

Niveles de Clark	Categórica ordinal	Invasión del tumor en las capas de la piel	Grado o nivel de invasión del tumor en las distintas capas de la piel.	<ul style="list-style-type: none"> - Nivel I: limitada a la epidermis. - Nivel II: hasta dermis papilar, no alcanza interface dérmica papilar reticular. - Nivel III: expande en dermis papilar. - Nivel IV: dermis reticular sin tejido subcutáneo. - Nivel V: afecta tejido subcutáneo. - No valorable (NV) 	Categoría: 1 = Nivel I 2 = Nivel II 3 = Nivel III 4 = Nivel IV 5 = Nivel V 6 = NV
Índice de Breslow	Categórica ordinal	De < 1 mm a > 4 mm	Medición milimétrica del grosor del tumor	<ul style="list-style-type: none"> - < 1 mm - 1-2 mm - 2-4 mm - > 4 mm - No valorable (NV) 	Categoría: 1 = < 1 mm 2 = 1-2 mm 3 = 2-4 mm 4 = > 4 mm 5 = NV
Elastosis Actínica	Categórica nominal	<ul style="list-style-type: none"> - Presente - Ausente 	Cambios degenerativos de fibras elásticas de colágeno por efecto de radiación UV.	<ul style="list-style-type: none"> - Presente - Ausente - No valorable (NV) 	Categoría: 1 = Presente 2 = Ausente 3 = NV
Infiltrado Inflamatorio	Categórica nominal	<ul style="list-style-type: none"> - Presente - Ausente 	Presencia de células inflamatorias entre células tumorales	<ul style="list-style-type: none"> - Presente - Ausente - No valorable (NV) 	Categoría: 1 = Presente 2 = Ausente 3 = NV
Infiltrado Perineural	Categórica nominal	<ul style="list-style-type: none"> - Presente - Ausente 	Invasión de células tumorales en el perineuro o endoneuro del nervio	<ul style="list-style-type: none"> - Presente - Ausente - No valorable (NV) 	Categoría: 1 = Presente 2 = Ausente 3 = NV

Ulceración	Categórica nominal	- Presente - Ausente	Es el defecto epidérmico con ausencia de estrato córneo	- Presente - Ausente - No valorable (NV)	Categoría: 1 = Presente 2 = Ausente 3 = NV
Índice de mitosis	Categórica nominal	< 1 mitosis / mm ² > 1 mitosis / mm ²	Es el contaje de número de mitosis por mm ²	- Presente - Ausente - No valorable (NV)	Categoría: 1 = Presente 2 = Ausente 3 = NV
Satelitosis	Categórica nominal	- Presente - Ausente	Nidos tumorales mayores a 0.05mm separados a 0.3 mm del tumor	- Presente - Ausente - No valorable (NV)	Categoría: 1 = Presente 2 = Ausente 3 = NV
Supervivencia	Categórica nominal	- Vivo - Muerto	Conservación de la vida después de haber sido diagnosticado de melanoma maligno.	- Vivo - Muerto - No determinado (ND)	Categoría: 1 = Vivo 2 = Muerto 3 = ND
S-100	Categórica nominal	- Positivo - Negativo	Marcador inmunohistoquímico, para detección de células melanocíticas.	- Positivo - Negativo	Categoría: 1 = Intenso Positivo 2 = Débil Positivo 3 = Negativo
HMB-45	Categórica nominal	- Positivo - Negativo	Anticuerpo monoclonal, útil en tinción citoplasmática de células melanocíticas.	- Positivo - Negativo	Categoría: 1 = Intenso Positivo 2 = Débil Positivo 3 = Negativo
MELAN-A	Categórica nominal	- Positivo - Negativo	Marcador inmunohistoquímico, que reconoce grupo de proteínas GP-100/Pmel17	- Positivo - Negativo	Categoría: 1 = Intenso Positivo 2 = Débil Positivo 3 = Negativo

Realizado por: Dayana Pita y Karina Rosillo.

3.7. MÉTODO DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados tanto de los análisis inmunohistoquímicos como los obtenidos en las historias clínicas; fueron correctamente tabulados e ingresados en el programa estadístico SPSS 20. En base a la matriz de datos se generaron tablas de frecuencias para poder valorar porcentualmente y en valores absolutos las distintas variables. Además se realizaron tablas de contingencia con n filas en el plano X y n columnas en el plano Y , lo que nos permitió asociar las variables estudiadas. Debido a la distribución no homogénea del total de casos utilizados en el estudio todas las pruebas de significancia fueron anuladas. Por este motivo se procedió a realizar Análisis de Componentes Principales (PCA, por sus siglas en inglés). Este tipo de análisis multivariado nos permite reducir las dimensiones de un conjunto de datos, para realizar un análisis exploratorio mediante la generación de gráficos de dispersión, con el objeto de determinar agrupaciones predictivas, o demostrar la independencia de las variables en el caso de no observar agrupaciones. Adicionalmente, la reducción de dimensiones nos permite explicar en el menor número de componentes la varianza observada en el conjunto de datos. El PCA se basa en las correlaciones existentes entre las variables analizadas. Antes de realizar este análisis se debe realizar el Test de Bartlett y/o el Índice KMO, los cuales nos permiten comprobar que la correlación entre las variables es lo suficientemente grande. El test de Bartlett parte de la hipótesis nula de que la matriz de coeficientes de correlación no es significativamente distinta a la matriz de identidad, se rechaza la misma si los valores de significancia de la prueba son menores o iguales a 0.05. Por otro lado, el índice KMO compara los valores de las correlaciones entre las variables y sus correlaciones parciales, puede presentar valores entre 0 y 1. Si el índice KMO es próximo a cero el PCA no sería relevante.

3.7. ASPECTOS BIOÉTICOS

La realización de esta investigación no requirió contacto directo con los pacientes debido a que se recogió la información de las historias clínicas de la base de datos CEPI y se trabajó con bloques de parafina de biopsias tomadas previamente por personal del centro, bajo consentimiento informado de los pacientes (Anexo 2).

Se mantuvo total confidencialidad reemplazando los nombres de los pacientes por códigos numéricos previamente determinados según el orden de estudio de las biopsias.

Se respetó los principios bioéticos establecidos en el tratado de Helsinki.

Se siguieron los protocolos establecidos por el laboratorio particular IHQRRP para la manipulación y estudio adecuado de las muestras.

Los autores declaramos que no existió ningún conflicto de interés para la realización de este estudio.

3.8. ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

Limitaciones:

- La muestra del estudio fue muy pequeña.
- Historias clínicas y reportes histopatológicos incompletos.
- Alto costo del estudio inmunohistoquímico.

Recursos utilizados:

- Investigadores
- Colaboradores en laboratorio y patología.
- Historias clínicas y reportes histopatológicos de cada uno de los pacientes con diagnóstico de melanoma maligno.
- Placas con tinción de hematoxilina-eosina y bloques de parafina.
- Equipos especiales de laboratorio de patología.

- Equipo de inmunotinción Benchmark Gx.
- Reactivos específicos para inmunohistoquímica

Presupuesto: el estudio fue autofinanciado por los autores.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

Los resultados de este estudio fueron obtenidos a partir de la recolección de información de historias clínicas, visualización con microscopía tradicional de placas histológicas con tinción hematoxilina-eosina y estudios inmunohistoquímicos realizados a partir de cortes de tejidos previamente fijados en bloques de parafina.

Todo el material utilizado para este estudio fue trasladado del área de patología del CEPI a un laboratorio particular, donde se escogieron y procesaron adecuadamente las muestras para el estudio inmunohistoquímico.

Inicialmente se encontraron 43 presuntos casos clínicos de melanoma maligno a través el buscador virtual en la base de datos CEPI, de los cuales bajo los criterios de inclusión y exclusión quedaron 25 pacientes.

4.1. ESTADÍSTICOS DESCRIPTIVOS

Dentro de los resultados descriptivos se obtuvieron frecuencias para cada una de las variables analizadas. Se analizó inicialmente la variable género para dividir nuestra población en masculino y femenino, con resultados similares para femenino con 56% y masculino 44% (Tabla 6). La edad se dividió en cuatro grupos etarios, Grupo I de 15-29 años, Grupo II de 30 a 44 años, Grupo III de 45-59 años, Grupo IV de 60-74 años y Grupo V >75 años. El 32% de los casos incluidos pertenece al grupo etario IV (60 – 74 años) y el 4% al grupo I (15 – 29 años) (Tabla 6).

El predominio de localización de la lesión fue en cabeza y cuello con un 64%, palmas y plantas con el 12% y tronco, extremidades superiores e inferiores con el 8% cada una (Tabla 7).

En las variables histopatológicas analizadas se observó mayor frecuencia en la clasificación histopatológica lentigo maligno (40%), seguido del tipo nodular (36%). La fase de crecimiento predominante fue vertical (76%) a diferencia de la fase radial con 24%. La elastosis actínica estuvo presente en el 56% de casos, el infiltrado inflamatorio no intenso en el 72%, el infiltrado perineural en el 28% y la satelitosis en el 8%. (Tabla 8) (Ver fotos 2-7).

En la valoración de la profundidad tumoral se determinó que los Niveles de Clark más frecuentes fueron Nivel I y III con el 28% cada uno, y los índices de Breslow <1 mm en ambas tinciones con el 56% en HE y 48% en IHQ (Tabla 9).

La ulceración estuvo presente en el 32% y el índice de mitosis en el 88% (Tabla 10) (Ver fotos 8-9).

La tinción de los marcadores inmunohistoquímicos se valoró según de la intensidad de la misma, catalogándola como intenso positivo, débil positivo y negativo. Con el marcador S-100, el 64% fueron intensos positivos, el 28% débiles positivos y el 8% negativos. En el HMB-45 el 100% fueron positivos, de los cuales el 84% fueron intensos positivos. Con el marcador MELAN-A se obtuvo un total de 72% de intensos positivos, 24% débiles positivos y 4% negativos (Tabla 11) (Ver fotos 10-11).

Sin especificar la causa de muerte, hasta la fecha del análisis, en la variable supervivencia se encontraron 17 casos vivos, 7 muertos y 1 no determinado (Tabla 12).

4.2 ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES

Debido a que las variables analizadas en nuestro estudio fueron cualitativas tipo nominal u ordinal, se midieron las relaciones existentes mediante tablas de contingencia, usando pruebas de significación y asociación.

Se realizó asociaciones entre las variables demográficas género-edad con las siguientes variables: localización de la lesión, histopatológicas, supervivencia y marcadores inmunohistoquímicos, los resultados fueron:

- i. Localización de la lesión: del 100% de nuestra población, el 64% de melanomas se localizaron en cabeza y cuello para hombres y mujeres, de los cuales el 54.5% fue en hombres y el 71.4% en mujeres. Esta localización se encontró mayoritariamente en el grupo de edad III y IV (45-59 y 60-74 años) para género masculino con 18.2% cada uno, y en el grupo V (> 75 años) para el género femenino con el 42.9% (Tabla 13).
- ii. Clasificación histopatológica: el tipo histológico más común en el género masculino fue Lentigo Maligno con 45.5% presentándose mayormente en el grupo de edad IV (60-74 años). En el género femenino el mayor porcentaje (42.9%) se observó en el tipo nodular seguido de Lentigo maligno (35.7%), con igual número de casos en los dos tipos para la edad mayor a 75 años (grupo V) (Tabla 14).
- iii. Elastosis actínica: el daño actínico se evidenció en el 56% de nuestros casos, principalmente en mujeres mayores a 75 años (42.9%) (Tabla 15).
- iv. Supervivencia: sin especificar la causa de muerte, el número total de casos fallecidos fue 7 correspondiente al 28%, de los cuales 4 (28.6%) pertenecieron a mujeres mayores de 75 años. Se reportó solo 1 caso como no determinado (Tabla 16).
- v. Marcadores Inmunohistoquímicos: las tinciones realizadas para los tres marcadores S-100, HMB-45 y MELAN-A fueron positivos en la gran mayoría de casos sin distinción significativa por grupo etario ni género (Tabla 17).

Otra variable analizada fue la localización de la lesión con las siguientes variables histopatológicas:

- i. Clasificación histopatológica: en los melanomas de localización en cabeza y cuello, los tipos histológicos más frecuentes fueron lentigo maligno y nodular con 36% y 20% respectivamente (Tabla 18).
- ii. Elastosis actínica: se presentó únicamente en los melanomas localizados en cabeza y cuello de 14 casos que corresponden al 56%. Se reportaron 2 casos no determinados (Tabla 19).
- iii. Ulceración: del total de positivos, se observó su presencia en cabeza y cuello con el 16% y extremidades superiores e inferiores con el 8% cada una. (Tabla 20).

Se analizó la variable clasificación histopatológica asociada a la fase de crecimiento, en donde los casos de tipo histológico nodular presentaron crecimiento vertical en su totalidad, correspondiente al 36%, mientras que el tipo lentigo maligno presentó mayoritariamente crecimiento radial con el 24%, pero también presentó patrón de crecimiento vertical (16%). Los casos de lentigo maligno fueron los únicos en los que se observó patrón de crecimiento radial (Tabla 21).

La fase de crecimiento y la clasificación histopatológica se analizaron en conjunto con las siguientes variables:

- i. Supervivencia: el tipo nodular con crecimiento vertical, fue el que más se asoció con casos reportados como fallecidos con el 15.8% (Tabla 22).
- ii. Niveles de Clark: se pudo observar que los tumores de tipo nodular con crecimiento vertical presentaron mayor profundidad, alcanzando los Niveles III, IV y V de Clark con un porcentaje de 15.8% en cada uno, a diferencia del tipo lentigo maligno con crecimiento radial, del cual todos los casos se encontraron en Nivel I (Tabla 23).
- iii. Breslow Hematoxilina-eosina: podemos corroborar que la mayor profundidad fue observada en los tipos nodulares con crecimiento vertical, siendo éstos los únicos casos reportados con índices de Breslow de 2-4 mm y > a 4 mm con un

porcentaje de 15.8 y 21.1% respectivamente. En lo que respecta a los tumores tipo lentigo maligno con crecimiento radial el 100% fueron <1 mm y el 15.8% también fueron menores a 1 mm pero con patrón de crecimiento vertical. Los casos observados en los tipos acro-lentiginoso y de extensión superficial alcanzaron un índice de Breslow entre < 1 mm a 1-2 mm (Tabla 24).

- iv. Breslow Inmunohistoquímica: encontramos que de igual manera la mayor profundidad fue observada en el melanoma nodular con fase de crecimiento vertical, con un 26.3% en el Breslow 2-4 mm y con el 15.8% en el mayor a 4 mm. Los tumores lentigo maligno se mantuvieron en menos de 1 mm con el 15.8% en el crecimiento vertical y con 100% en el radial (Tabla 25).

Se realizó también una tabulación cruzada entre la variable clasificación histopatológica y los marcadores inmunohistoquímicos S-100, HMB-45 y MELAN-A, en donde se observó que la mayor sensibilidad (100%) se presentó con el marcador HMB-45, seguido del MELAN-A que fue positivo en el 96%, con un caso negativo (lentigo maligno); y por último el marcador S-100 tuvo una positividad del 92% con 2 casos negativos (1 nodular, 1 acro-lentiginoso) (Tabla 26).

Para valorar el grosor y la profundidad tumoral realizamos los siguientes cruces de variables:

- i. Niveles de Clark con Índice de Breslow HE: Se observó que 28% de los casos fueron Clark I y Breslow < 1mm, 16% fueron Clark III y Breslow < 1mm y el 8% correspondió para cada uno de los siguientes: Clark III con Breslow 1-2 mm, Clark IV con Breslow > 4 y Clark V con Breslow > 4 mm (Tabla 27).
- ii. Niveles de Clark con Índice de Breslow IHQ: Se observó que 28% de los casos fueron Clark I y Breslow < 1mm, 12% fueron Clark III y Breslow 2-4mm y el 8% correspondió para Clark V y Breslow > 4 mm (Tabla 28).

- iii. Breslow HE con Breslow IHQ: de los 25 casos, en el rango < 1 mm, 56% correspondieron a Breslow HE y 48% a Breslow IHQ, en el rango 1-2 mm, 12% pertenecieron a Breslow HE y 16% a Breslow IHQ; de 2-4 mm, 12% a Breslow HE y 20% a Breslow IHQ, y > 4 mm, 16% a Breslow HE y 12% a IHQ (Tabla 29).

Aunque no se registró significancia estadística en la mayoría de las variables, se encontraron asociaciones significativas con Chi cuadrado $p < 0,05$ pero el manejo de estos resultados debe ser cuidadoso porque el alto porcentaje de recuentos menores a 5 anula la significancia.

4.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES (PCA)

A continuación se realizó un PCA con todas las variables analizadas en este estudio, con la finalidad de reducir nuestros datos y lograr la visualización de grupos homogéneos que tengan relación entre sí. En éste análisis se encontraron las siguientes correlaciones: grupo etario y localización de la lesión ($CC = -0,376$, $p = 0,032$), grupo etario y elastosis actínica ($CC = -0,539$, $p = 0,003$). La elastosis actínica se relacionó también con la localización de la lesión ($CC = 0,624$, $p \leq 0,001$) y con la ulceración ($CC = -0,396$, $p = 0,025$). Se observó además correlación significativa de la clasificación histopatológica con infiltrado perineural ($CC = 0,515$, $p = 0,004$), índice de Breslow HE ($CC = -0,370$, $p = 0,034$) e índice de Breslow IHQ ($CC = -0,372$, $p = 0,034$) (Tabla 30, Figura 16).

Con respecto a la profundidad del tumor, observamos relación de la fase de crecimiento con niveles de Clark ($CC = -0,717$; $p \leq 0,001$), con índice de Breslow HE ($CC = -0,434$; $p = 0,015$) y con Breslow IHQ ($CC = -0,439$; $p = 0,006$). Niveles de Clark con índice de Breslow tinción HE y tinción IHQ ($CC = 0,764$; $p \leq 0,001$ cada una), además índice de Breslow HE con el índice de Breslow IHQ ($CC = 0,878$; $p \leq 0,001$) (Tabla 30, Figura 16).

Dentro de las variables histopatológicas pronósticas, se observaron las siguientes correlaciones significativas: satelitosis con ulceración ($CC = -0,377$; $p = 0,032$), ulceración con niveles de Clark ($CC = -0,455$, $p = 0,011$) y con índice de Breslow HE ($CC = -0,407$, $p = 0,022$) (Tabla 30, Figura 16).

La supervivencia se asoció a los niveles de Clark ($CC = 0,344$, $p = 0,046$), al índice de Breslow tinción IHQ ($CC = 0,425$, $p = 0,017$) y a la ulceración ($CC = -0,471$, $p = 0,009$) (Tabla 30, Figura 16).

Todas estas correlaciones fueron verificadas con la medida de adecuación de muestreo KMO, que tuvo un valor mayor a 0,05 (0,512), y un test de Bartlett altamente significativo ($p \leq 0,001$) (Tabla 31).

El porcentaje acumulado de varianza en dos componentes explicó el 39,48% de relación existente entre todas las variables del estudio; para explicar el 100% necesitaríamos 18 componentes (Tabla 32).

Se ve que al excluir las variables demográficas edad y sexo, además de localización y supervivencia, se mantienen las mismas correlaciones y significancias, pero aumenta el valor de KMO a 0,608, lo que nos indica que el muestreo es más significativo y la correlación es más fuerte al retirar estas variables. El porcentaje acumulado de varianza en dos componentes explicó el 45,98% de relación existente entre las 14 variables examinadas (Tabla 33-35, Figura 17).

Al realizar un PCA entre las variables histopatológicas-pronósticas, supervivencia y marcadores inmunohistoquímicos (Tabla 36, Figura 18), se mantuvieron las significancias observadas en la Tabla 30, y al comparar las magnitudes de los coeficientes de correlación se obtuvo un índice KMO de 0,611 y un Test de Bartlett altamente significativo ($p \leq 0,001$) (Tabla 37).

El porcentaje acumulado de la varianza obtenida en dos ejes solo explica el 52,64% de la relación de nuestras variables, es decir, se necesitan el mismo número de ejes que de variables para explicar el 100% (Tabla 38, Figura 36).

CAPÍTULO V

5. DISCUSIÓN

Este estudio se realizó con un total de 25 pacientes previamente diagnosticados de melanoma maligno en el CEPI de la ciudad de Quito, donde los casos reportados fueron 56% para el género femenino versus el 44% para el género masculino. El mayor número de casos se observó en el grupo > 75 años. Según los datos encontrados en el RNT de la ciudad de Quito, se reporta una incidencia mayor en el género femenino hasta el año 2005, pero en el último período 2006-2010 la incidencia es mayor para el sexo masculino. Estadísticas similares se reportan en la epidemiología mundial del melanoma. ⁽⁷⁾⁽⁴⁶⁾⁽⁴⁷⁾

La localización predominante para hombres y mujeres en nuestro grupo de estudio fue cabeza y cuello con el 64%, de los cuales el 36% fueron lentigo maligno, siendo éste el tipo histológico de mayor incidencia en nuestro estudio al representar el 40% de todos nuestros casos de melanoma. Éste tipo histológico se observó principalmente en hombres de entre 45-74 años con el 45.5%, a diferencia de las mujeres en quienes predominó el tipo nodular con el 42.9% en mayores de 75 años.

Según un estudio realizado por Torres M ⁽²⁹⁾ en la ciudad de Quito, con 279 pacientes de SOLCA y del Hospital Gonzalo González en el año 2008, se reportó que la localización mayormente afectada fue en extremidades inferiores en ambos sexos con el 39.1%, igualmente a lo notificado por la IARC ⁽²⁸⁾ en el 2013. Se encontró además que el melanoma lentiginoso-acral fue el más prevalente con un 38.7% seguido del nodular con 24.7%, mientras que la menor proporción se observó en pacientes con melanoma de extensión superficial y lentigo maligno con 20 y 16.5% respectivamente ⁽²⁹⁾. Es importante recalcar que nuestra muestra fue recogida de un centro dermatológico de Quito (CEPI).

En las estadísticas mundiales ⁽⁴⁰⁾⁽⁴⁶⁾ el tipo histológico de mayor incidencia es el melanoma de extensión superficial, teniendo en cuenta que afecta sobre todo a

poblaciones jóvenes, caucásicas ⁽¹⁶⁾⁽⁴⁸⁾, con mayor localización en extremidades inferiores en mujeres y en tronco en hombres. Esto podría deberse a la exposición intermitente a la radiación UV ⁽⁴⁸⁾, además de quemaduras producidas ocasionalmente por la cultura del bronceado en fototipos de piel I y II ⁽⁶⁾⁽¹⁶⁾⁽⁴⁶⁾ y por las tendencias actuales del uso de cámaras de bronceo, que se ha asociado con un significativo incremento en el riesgo de desarrollar melanoma ⁽⁴⁹⁾.

Una de las variables estudiadas fue la elastosis actínica, debido a la latitud en la que se encuentra nuestro país y a la radiación solar a la que se expone nuestra población. Encontramos que en el total de nuestra muestra, el 56% presentó daño actínico con mayor localización en cabeza y cuello, con un predominio por el género femenino en el grupo de edad mayor a 75 años. Estos datos no tuvieron significancia estadística pero son relevantes debido a la relación que existe con los patrones de exposición solar acumulativos por factores ocupacionales, culturales y la escasa protección a la radiación UV.

Al observar las variables de profundidad tumoral como los Niveles de Clark y el índice de Breslow asociados al tipo histológico y a su fase de crecimiento, pudimos corroborar lo citado en la literatura, en donde se menciona que el tipo histológico nodular presenta crecimiento vertical asociándose con la mayor profundidad alcanzada en las capas de la piel. ⁽¹⁶⁾⁽⁴⁰⁾⁽³⁸⁾

En nuestro estudio evidenciamos que al comparar los índices de Breslow con las dos tinciones, el tipo histológico predominante seguía siendo el melanoma nodular con fase de crecimiento vertical, pero observamos un aumento de éstos casos para el rango de 2-4 mm de 15.8% con la tinción HE a 26.3% con la tinción IHQ. De los dos casos reportados para melanoma Acro-lentiginoso con índice de Breslow menor a 1 mm en la tinción HE, se observó que la medición realizada con la tinción IHQ fue mayor en uno de ellos, ubicándolo en el rango de 2-4 mm.

Al medir el grosor tumoral comparando el índice de Breslow HE con Breslow IHQ encontramos: de los 25 casos, en el rango < 1 mm, 56% correspondieron a Breslow HE y 48% a Breslow IHQ, en el rango 1-2 mm, 12% pertenecieron a Breslow HE y 16% a Breslow IHQ; de 2-4 mm, 12% a Breslow HE y 20% a Breslow IHQ, y > 4 mm, 16% a Breslow HE y 12% a Breslow IHQ. A pesar de no revelar significancia estadística, con estos resultados evidenciamos que el uso de la tinción inmunohistoquímica puede variar la medición real del grosor tumoral, haciendo de esta una herramienta útil para precisar la profundidad de la neoplasia.

Casos similares se reportan en un estudio realizado con 99 biopsias de melanoma, publicado en el American Journal of Dermatopathology ⁽⁵⁰⁾ en el 2013, donde realizan la comparación de la medición del grosor tumoral usando la tinción HE y el marcador inmunohistoquímico MELAN-A. Concluyen que en el 59.6% de los casos se encontró mayor grosor tumoral con la tinción inmunohistoquímica, reclasificando al 33% de melanomas in situ como melanomas invasivos. Este estudio recomienda el uso de marcadores inmunohistoquímicos en la evaluación primaria del melanoma, especialmente en casos de melanoma in situ, debido a que con la tinción HE no es fácil reconocer células neoplásicas melanocíticas principalmente en secciones de la muestra donde exista intenso infiltrado inflamatorio, células histiocíticas con melanina en la parte superior de la dermis, cambios fibróticos extensos o fenómenos de regresión que puedan omitir el diagnóstico de melanoma.

Debido a la muestra pequeña (n = 25) y a la gran cantidad de variables nominales en nuestro banco de datos (que no presentaron correlaciones estadísticamente significativas), decidimos realizar un análisis de componentes principales (PCA), el mismo que tiene como objetivo disminuir y simplificar la información obtenida, con la finalidad de encontrar grupos homogéneos de variables que se correlacionen entre sí. En éste análisis factorial se observó que hubo relación del grupo de edad con la localización de la

lesión, y con elastosis actínica. Se observó además correlación significativa de la clasificación histopatológica con el infiltrado perineural, con el índice de Breslow HE y con el Breslow IHQ. Con respecto a la profundidad del tumor, observamos relación de los niveles de Clark con los dos índices de Breslow, además se observó relación significativa entre éstos índices. Todas estas variables discutidas anteriormente, fueron asociadas en tablas de contingencia para determinar su dependencia, pero debido a la muestra pequeña, éstas no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, en el PCA si se observaron correlaciones con un KMO de 0,512 y una $p \leq 0,001$, confirmando su relación, por lo que sugerimos realizar un estudio de este tipo con mayor población.

Según la AJCC ⁽³⁷⁾, existen variables que se asocian con el pronóstico y la supervivencia de los pacientes; es por eso que hemos agrupado a las variables ulceración, índice de mitosis, índice de Breslow HE e IHQ como variables pronósticas, y las hemos asociado entre sí y con la supervivencia. En el PCA observamos que estas variables fueron significativas entre sí. Existen varias guías y estudios que respaldan la utilización de éstas variables como datos pronósticos. ⁽³⁵⁾⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾

Se realizó una tabulación cruzada entre la variable clasificación histopatológica y los marcadores inmunohistoquímicos S-100, HMB-45 y MELAN-A, en donde se observó que la mayor sensibilidad (100%) se presentó con el marcador HMB-45, seguido del MELAN-A que fue positivo en el 96%, con un caso negativo (lentigo maligno); y por último el marcador S-100 tuvo una positividad del 92% con 2 casos negativos (1 nodular, 1 acrolentiginoso).

A pesar de que en la mayoría de estudios se menciona a la proteína S-100 como el marcador más sensible para células melanocíticas, en nuestro estudio se reportaron casos negativos, en los cuales los otros dos marcadores fueron positivos, reafirmando el diagnóstico de melanoma cutáneo. Se han reportado casos en donde el S-100 resulta negativo en la unión dermoepidérmica sobretodo en piel con daño actínico, en

comparación con la positividad de otros marcadores como HMB-45 y Melan-A; además es importante conocer que existen otras causas para obtener resultados negativos, como la falta de expresión de la proteína S-100 o a la falla del clon utilizado en la inmunotinción. ⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾

Como hemos revisado en la literatura, ninguno de los marcadores inmunohistoquímicos tienen una sensibilidad y especificidad del 100%; debido a esto, es recomendable el uso de varios marcadores para potenciar su especificidad, con la finalidad de obtener un diagnóstico preciso. ⁽⁴⁵⁾

La combinación de marcadores inmunohistoquímicos también es de ayuda para detectar diferenciación melanocítica en lesiones con daño actínico, cambios fibróticos o áreas necróticas. ⁽⁵³⁾

Debido a que el melanoma puede metastatizar a cualquier lugar por su agresividad, y por su origen embriológico podrían desarrollarse melanomas en otros lugares del cuerpo que no sean la piel, es por eso que una de las principales utilidades de la IHQ es su uso en melanomas metastásicos o para distinguir una neoplasia con características de células cutáneas localizada en cualquier parte del cuerpo. ⁽⁵⁴⁾

Es importante aclarar que el procesamiento de tejidos, desde la toma de muestra hasta la interpretación histopatológica requiere de un preciso y delicado manejo debido a que esto influye en la veracidad y certeza de la interpretación de los resultados, así como también es importante recalcar que todos los estudios realizados en laboratorio son operadores-dependientes, por ende podrían existir diferencias en la apreciación de los resultados.

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

6.1. CONCLUSIONES

- Los marcadores inmunohistoquímicos son útiles para la confirmación diagnóstica y certera del melanoma maligno cutáneo, se debe tomar en cuenta que el resultado positivo o negativo de un solo marcador no confirma ni excluye el diagnóstico de melanoma, estos marcadores deben ser usados de manera conjunta.
- Se pudo concluir que no se encontró asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y las variables histopatológicas, ambos nos permiten un diagnóstico complementario. Desde la histología se evalúan las características morfológicas de los tejidos, mientras que con la inmunohistoquímica se confirma un diagnóstico mediante una reacción antígeno anticuerpo.
- No se pudo evidenciar relación entre la localización de la lesión y los marcadores inmunohistoquímicos.
- Se pudo observar la utilidad de los marcadores inmunohistoquímicos al encontrar diferencia significativa entre el índice de Breslow HE versus el índice de Breslow con IHQ, permitiendo una medición más precisa del grosor tumoral.
- Al no ser factores pronósticos, no se obtuvo relación entre los diferentes marcadores y la supervivencia.
- La inmunohistoquímica es de gran utilidad porque sirve como herramienta diagnóstica desde etapas tempranas, no se necesita de gran afectación tisular porque como ya se mencionó, depende de la presencia de antígenos celulares.
- La tinción hematoxilina-eosina debe ser la primera herramienta usada para determinar características histopatológicas ante la sospecha de una lesión pigmentada, pero es necesario recalcar que cuando existen dudas diagnósticas esta debe ser complementada con exámenes más específicos, como la inmunohistoquímica.

- La inmunohistoquímica es una técnica de alta complejidad, en la cual la veracidad de los resultados depende de la sensibilidad de los equipos y la fiabilidad de los reactivos utilizados.

6.2. RECOMENDACIONES

- La historia clínica dermatológica completa juega un rol de vital importancia en la aproximación diagnóstica de cualquier patología y más aún de cualquier neoplasia cutánea, es por esto que en ella se deben destacar datos elementales como las características de la lesión, antecedentes familiares, actividades laborales y patrones de exposición solar.
- Podría utilizarse una herramienta de recolección de información y de reporte histopatológico específico para tumores cutáneos, como el documento anexo en esta tesis (Anexo 3), con el fin de evitar la exclusión de datos relevantes para llegar a un diagnóstico certero.
- Se sugiere que este estudio debería ser ampliado con una población que abarque mayor heterogeneidad de casos, es decir al menos cinco diagnósticos por tipo histopatológico, para de esta manera evitar la anulación de las pruebas estadísticas.
- Se debería realizar el estudio partiendo de la toma de biopsias de las lesiones, para así lograr una comparación real entre la tinción hematoxilina-eosina con la tinción inmunohistoquímica.
- La extirpación de la lesión debería ser completa, respetando los bordes quirúrgicos, cumpliendo así con la recomendación de las guías internacionales, y de esta manera obtener una valoración adecuada de todos los parámetros histopatológicos.
- En vista de la funcionalidad encontrada en esta tesis, se recomienda la utilización de marcadores inmunohistoquímicos en la confirmación diagnóstica de melanoma y la diferenciación de la estirpe melanocítica en cualquier tumor que se sospeche provenga de ésta.

- La técnica inmunohistoquímica debe realizarse bajo protocolos estandarizados, con equipos calibrados y personal especializado en el manejo de tejidos y reactivos, ya que la interpretación de los resultados no solo dependerá del criterio del especialista (operador-dependiente) sino también del resultado de este proceso.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹ de Vries E., Coebergh JW. Cutaneous malignant melanoma in Europe. Eur J Cancer. 2004

² PG., Lang. Current concepts in the management of patients with melanoma. s.l. : Am J Clin Dermatol, 2002, Vol. 6.

³ Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller A, Leffell D. Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine. Vol 1 & 2, 7th Edition. New York: McGraw Hill; 2008.

⁴ Lens MB., Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. s.l. : Br J Dermatol, 2004.

⁵ Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer [Internet] 2013. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>

⁶ Oliveros C, Bravo J, Zambrano A, Cepeda M. Tendencia de la incidencia y la mortalidad en melanoma maligno en los últimos 60 años y análisis de los datos del Registro Poblacional (sic.) de Cáncer de Cali. Rev Asoc Colomb Dermatol [Internet]. 2012 [cited 21 October 2015];20(3):255-264. Available from: <http://revistasocolderma.org/files/Tendencia%20de%20la%20incidencia%20y%20la%20mortalidad%20en%20melanoma.pdf>

⁷ Registro Nacional de Tumores, SOLCA. Epidemiología del Cáncer en Quito 2006-2010. Quito : s.n., 2014

⁸ Rogers, G.S and S.M. Braun,. Prognostic Factors. Dermatol Clin. 2002, págs. 647-58.

⁹ Ortiz S, Vidal I, Lopez Ma. J, Martinez E. Anatomía Patológica del Melanoma Cutáneo. Consejería de Sanidad y Política Social Servicio Murciano de Salud [Internet]. 2011 [citado 12 Oct 2015]; 52-116. Disponible en: https://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/231551-MELANOMA_WEB.pdf1.3.5.3

¹⁰ Fuertes L, Santoja C, Kutzner H, Requena L. Inmunohistoquímica en Dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia (parte ii). 03, Madrid : Elsevier, 10 de Oct de 2012, Actas Dermo-Sifiliográficas, Vol. 104

¹¹ Barrionuevo C, Seminar V, Maita R, Ruben R, Jara D. Inmunohistoquímica en Lesiones Cutáneas Melanocíticas: Utilidad de los Marcadores Antígeno S100, HMB-45, Cromogranina A y Proteína p53. 4, 1999, Anal Facul Med, Vol. 60.

¹² Dabbs D. Diagnosis Immunohistochemistry. 1th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2002. P. 150-151

¹³ Sedaghat F, Notopoulos A. S-100 protein family and its application in clinical practice. Hippokratia [Internet]. 2008 [citado 18 Oct 2015]; 12 (4): 198-204. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2580040/>

¹⁴ Ferringer T. Immunohistochemistry in Dermopathology. Arch Pathol Lab Med [Internet]. 2015 [citado 18 Oct 2015]; 139(1):83-105. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25549146>

¹⁵ Merino J, Noriega MJ. Fisiología General. La Piel: Estructura y Funciones. Universidad De Cantabria. [Internet]. 2010 [citado 15 Agost 2015]. Disponible en: <http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-general/materiales-de-clase-1/bloque-ii/Tema%2011-Bloque%20II La%20Piel.%20Estructura%20y%20Funciones.pdf>

¹⁶ Wolff K, Goldsmith L, Katz S, Gilchrest B, Paller A, Leffell D. Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine. Vol 1 & 2, 7th Edition. New York: McGraw Hill; 2008.

¹⁷ Zurita Malavé EH, Gallardo A, Cohen R, Ferreiro M. Embriología cutánea. Dermatología Venezolana [Internet]. 2009 [citado 10 Agost 2015]; 46 (4): 6-11. Disponible en: <http://revista.svderma.org/index.php/ojs/article/viewFile/52/52>

¹⁸ Aris M. Origen del melanocito normal y maligno. Acta Bioquím Clín Latinoam [Internet]. 2009 [citado 10 Agost 2015]; 43 (3): 333-337. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53516747007>.

-
- ¹⁹ Concepción D, Determinantes Estructurales del Procesamiento y la Actividad Catalítica de Tirosinasa. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Inmunología [Internet]. 2003 [cited 21 October 2015];5-33. Available from: <file:///C:/Users/user/Downloads/OlivaresSanchez.pdf>
- ²⁰ Baltazares M, Rodríguez H, Ortega J, Sotres A. Sistema endotelina. Rev Inst Nal Enf Resp Mex. [Internet] 2005. [Citado 25 Oct 2015]; 18(4):308-320. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/iner/in-2005/in054j.pdf>
- ²¹ Siobhán J, Ian J. MGF (KIT Ligand) Is a Chemokinetic Factor for Melanoblast Migration into Hair Follicles. Elsevier D.B [Internet] 2000. [Citado 22 Oct 2015]; 225(2):424-436. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160600998567>
- ²² Günther J, Pedernera-Astegiano E. E-cadherina: pieza clave en la transformación neoplásica Rev Eviden Invest Clin [Internet] 2011. [Citado 26 Oct 2015]; 4 (1): 15-20. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/evidencia/eo-2011/eo111f.pdf>
- ²³ Vachtenheim J, Ondrušová L. MITF: A Critical Transcription Factor in Melanoma Transcriptional Regulatory Network. INTECH . [Internet]. 2013 [citado 27 Oct 2015]; 4:71-77. Disponible en: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/41851.pdf>
- ²⁴ Priario J. Historia del melanoma maligno en Uruguay. Rev Med Uruguay [Internet]. 2005 [citado 27 Agost 2015]; 21: 255-268. . Disponible en: <http://www.rmu.org.uy/revista/2005v4/art2.pdf>
- ²⁵ Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. Eur J Cancer. [Internet]. 2013 [citado 7 Oct 2015]; 49(6):1374-403
- ²⁶ Cancer Council Australi. Skin Cancer Statistics and Issues. Sydney: Cancer Council Australia. [Internet] 2015. [Citado 18 Oct 2015]. Disponible en: http://wiki.cancer.org.au/skincancerstats_mw/index.php?title=Skin_cancer_incidence_and_mortality&oldid=554

²⁷ Sortino-Rachou A, Curado M, Cancela M. Cutaneous melanoma in Latin America: a population-based descriptive study. *Cuadernos de Salud Pública*. 2011; 27(3):565-572.

²⁸ World Health Organization. *Cancer Incidence in Five Continents*. France : s.n., 2014, International Agency for Research on Cancer, Vol. X.

²⁹ Torres M. Características Clínicas, Epidemiológicas E Histopatológicas Del Melanoma Maligno Cutáneo En Los Hospitales: Oncológico Gral. Solón Espinoza Ayala-SOLCA Y Dermatológico Gonzalo González De La Ciudad De Quito Durante El Período Comprendido Entre Enero Del 2000 a Diciembre Del 2007. Quito/ PUCE 2008, 2008

³⁰ Organización Mundial de la Salud. Índice UV Solar Mundial Guía Práctica [Internet] 2003. [Citado 20 Sept 2015]; 1-28. Disponible en: <http://www.who.int/uv/publications/en/uvispa.pdf>

³¹ Carlson A, Slominski A, Linette G, Hill J, et al. Malignant Melanoma 2003: Predisposition, Diagnosis, Prognosis and Staging. *Am J Clin Pathol* [Internet] 2003 [citado 21 Sept 2015]; 120 (Suppl 1):101-127. . Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15298147>

³² Miller A, Mihm M. Mechanisms of Disease: Melanoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 [citado 27 Agost 2015];355:51-65. Disponible en:<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra052166>

³³ Martorell-Calatayud A, Requena C, Botella-Estrada R, Sangüeza O. Novedades en biología molecular y su aplicación en el diagnóstico y el tratamiento del melanoma. *Actas Dermosifiliogr* [Internet] 2009. [Citado 30 Agost 2015]; 100:52-65. Disponible en: <http://www.actasdermo.org/es/novedades-biologia-molecular-su-aplicacion/articulo-resumen/S0001731009731680/>

³⁴ Rodríguez-Cabral R, Montoya-Sosa G, Roldán-Marín R, Carlos-Ortega B. Principios básicos de dermatoscopia. *Dermatología Rev Mex* 2014 [Citado 30 Sept 2015]; 58:300-304. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2014/rmd143n.pdf>

-
- ³⁵ Dummer R, Huaschild A, Lindenblatt N, et. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* [Internet]. 2015 [citado 7 Oct 2015]; 26:126-132. Disponible en: http://annonc.oxfordjournals.org/content/23/suppl_7/vii86.full.pdf+html
- ³⁶ Ortiz S, Vidal I, Lopez Ma. J, Martinez E. Anatomía Patológica del Melanoma Cutáneo. Consejería de Sanidad y Política Social Servicio Murciano de Salud [Internet]. 2011 [citado 12 Oct 2015]; 52-116. Disponible en: https://www.murciasalud.es/recursos/ficheros/231551-MELANOMA_WEB.pdf1.3.5.3
- ³⁷ Balch Ch, Gershenwald J, Soong S, Thompson J, Atkins M, Byrd D. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2009 [citado 30 Oct 2015]; 27(36):6199-6206. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917835>
- ³⁸ Habif T. Nevi and Malignant Melanoma. *Clinical dermatology: a color guide to diagnosis and therapy*. 6th Edition. Elsevier; 2016. p. 855-880.
- ³⁹ Maize J. Malignant Melanocytic Neoplasms. En: Jane M. Grant-Kels. *DERMATOLOGY CLINICAL & BASIC SCIENCE SERIES*. USA; 2007. p. 279-299.
- ⁴⁰ Buys DL, Lara CO, Hidalgo C. Interpretación básica de inmunohistoquímica. Características generales de diversos anticuerpos y su localización celular y subcelular. *Pat Rev Latinoamericana* [internet]. 2007 [citado 11 octubre 2015]; 45 (3):22-36. Disponible en: <http://www.siapec.it/content/file/1771/PA%20jul-sep-07.pdf#page=22>
- ⁴¹ Vaquero Manuel. Manual de calidad de inmunohistoquímica en anatomía patológica [Internet]. Osakidetza Euskadi; 2007. [citado 12 oct 2015]. Disponible en: http://www.osakidetza.euskadi.eus/r85-sida01/es/contenidos/informacion/hd_publicaciones/es_hdon/adjuntos/ManualInmunohist oquimica.pdf

⁴² A.Menari Diagnostics [Internet]. WT1 Mouse Monoclonal Antibody. ImPath. [citado 13 oct 2015]. Disponible en: [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:jkHIEDeBGbQJ:www.menarinidiagnostics.com/var/diagnostic_division/storage/import/force-download.php%3Ffn%3DWT1%2520\(6F-H2\)_MEN_ES_IVD_0.0.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=es](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:jkHIEDeBGbQJ:www.menarinidiagnostics.com/var/diagnostic_division/storage/import/force-download.php%3Ffn%3DWT1%2520(6F-H2)_MEN_ES_IVD_0.0.pdf+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=es)

⁴³ Dako, An Agilent Technologies Company [Internet]. CSA II, Biotin-Free Catalyzed Amplification System. [citado 13 oct 2015]. Disponible en: <http://www.dako.com/es/download.pdf?objectid=111739002>

⁴⁴ Sedaghat F, Notopoulos A. S-100 protein family and its application in clinical practice. Hippokratia [Internet]. 2008 [citado 18 Oct 2015]; 12 (4): 198-204. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2580040/>

⁴⁵ Sheffield M, Yee H, Dorvault C, Weilbaecher K, Eltoum I, Siegal J, et al. Comparison of Five Antibodies as Markers in the Diagnosis of Melanoma in Cytologic Preparations. Am J Clin Pathol. [Internet]. 2002 [citado 19 Oct 2015]; 118: 930-936. Disponible en: <http://ajcp.ascpjournals.org/content/118/6/930.full.pdf>

⁴⁶ Mackie R, Hauschild A, Eggermont A. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. Annals of Oncology [Internet]. 2009 [citado 31 Oct 2015]; 20(6): 1-7. Disponible en: http://annonc.oxfordjournals.org/content/20/suppl_6/vi1.full

⁴⁷ Nikolaou V. and Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. BJD [internet]. 2013 [31 de octubre del 2015]; 170, pp 11-19. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23815297>

⁴⁸ Bulliard J, Weck D, Fisch T, Bordoni A, Levi F. Detailed site distribution of melanoma an sunlight exposure: aetiological patterns from a Swiss series. Annals of Oncology [Internet]. 2007 [citado 01 Nov 2015]; 18 (4): 789-794. Disponible en: <http://annonc.oxfordjournals.org/content/18/4/789.long>

⁴⁹ Boniol M, Autier P, Boyle P et al. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ* [Internet]. 2012 [citado 01 Nov 2015]; 345 (4): 789-794. Disponible en: <http://www.bmj.com/content/345/bmj.e4757>

⁵⁰ Drabeni M, Lopez L, Barranco C, Trevisan Gallardo F, Pujol R. Differences in Tumor Thickness Between Hematoxylin and Eosin and Melan-A Immunohistochemically Stained Primary Cutaneous Melanomas. *Am J Dermatopathol.* [Internet] 2013 [citado 01 Nov 2015]; 35(1): 56-63. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22688397>

⁵¹ Wilson M, Hossler E, Ferringer T, Elston D. S-100 Negative Junctional Melanocytic Proliferations. . *Am J Dermatopathol.* [Internet] 2011 [citado 03 Nov 2015]; 33(3): 327-329. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20940618>

⁵² Shabrawi-Caelen L, Kerl H, Cerroni L. Melan-A: Not a Helpful Marker in Distinction between Melanoma In Situ on Sun-Damaged Skin and Pigmented Actinic Keratosis. . *Am J Dermatopathol.* [Internet] 2014 [citado 03 Nov 2015]; 26(5): 364-366. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15365366>

⁵³ Nonaka D, Laser J, Tucker R, Melamed J. Immunohistochemical Evaluation of Necrotic Malignant Melanomas. *Am J Clin Pathol* [Internet] 2007 [citado 03 Nov 2015];127:787-791. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17439838>

⁵⁴ Gambichler T, Scholl L, Stücker M, Bechara F, Hoffmann K, Altmeyer P. Clinical Characteristics and Survival Data of Melanoma Patients With Nevus Cell Aggregates Within Sentinel Lymph Nodes. *Am J Clin Pathol* [Internet] 2013 [citado el 2 de noviembre del 2015]. 139: 566-673. Disponible en: <http://ajcp.ascpjournals.org/content/139/5/566.short>

⁵⁵ Registro en línea del Índice de Radiación Ultravioleta. Red Metropolitana de Monitoreo Atmosférico de Quito, Secretaría de ambiente [Internet] 2007 [citado 03 Nov 2015]. Disponible en: <http://modelos.quitoambiente.gob.ec/ultravioletas/>

⁵⁶ Avilés J, Lázaro P. Predisposición genética en el melanoma cutáneo. *Actas Dermosifiliogr.*[Internet] 2006 [citado el 2 de noviembre del 2015]; 97 (4):229-40 Disponible en: <http://www.actasdermo.org/es/predisposicion-genetica-el-melanoma-cutaneo/articulo/13089327/>

FIGURAS

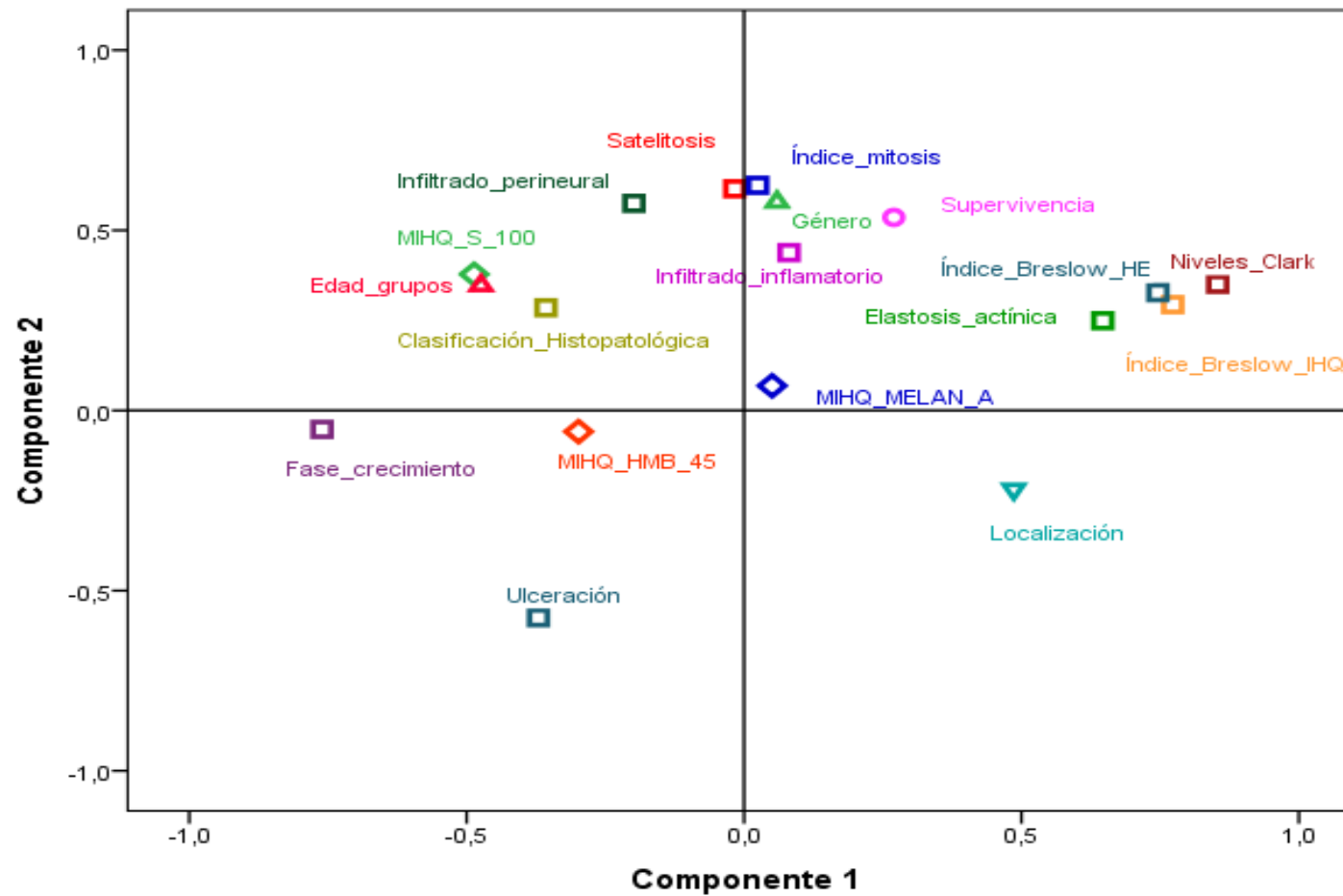


Figura 16. Análisis de Componentes Principales (PCA) realizado con la matriz de correspondencias entre todas las variables analizadas en este estudio.

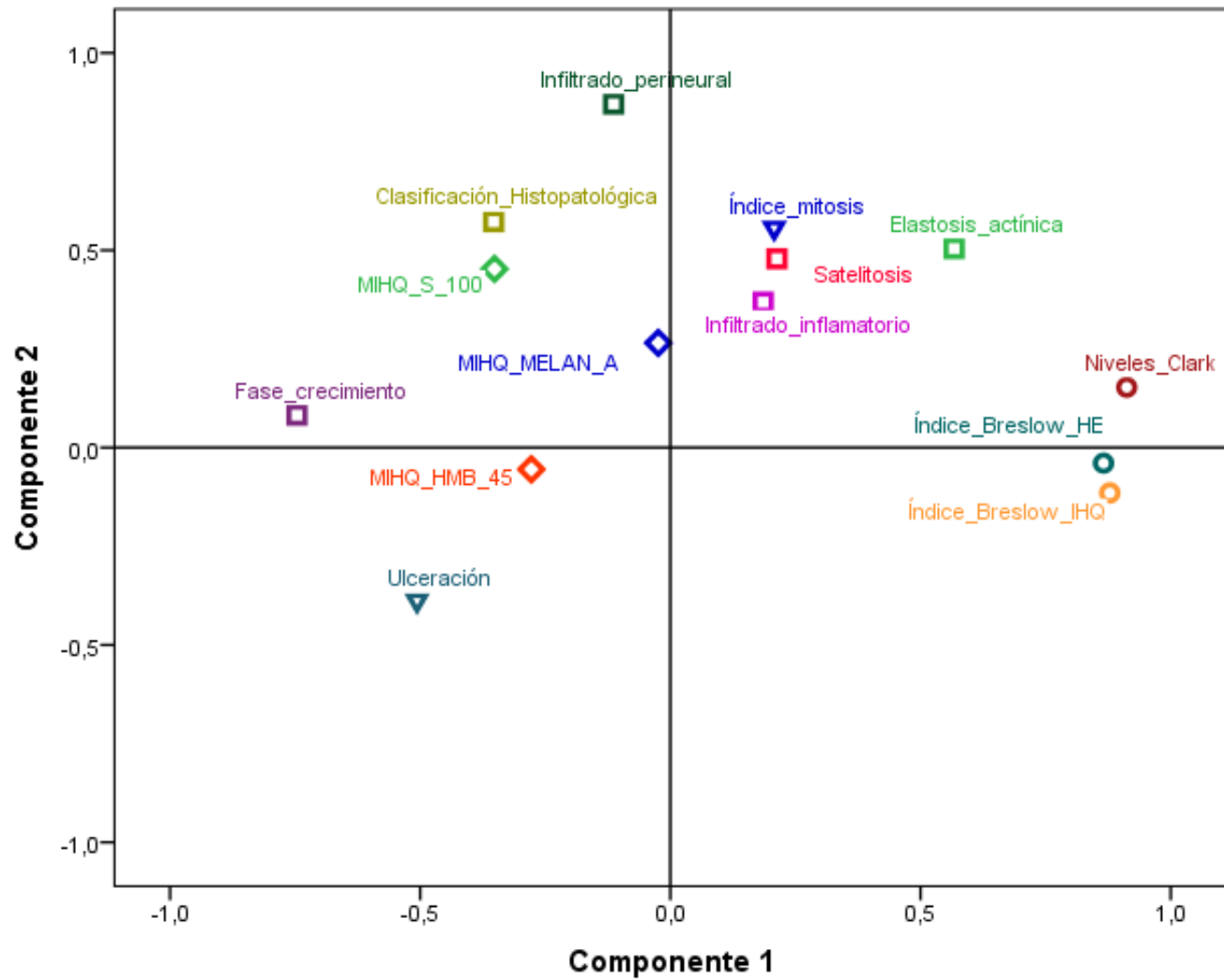


Figura 17. Análisis de Componentes Principales (PCA) realizado con la matriz de correspondencias entre las variables Histopatológicas y Marcadores Inmunohistoquímicos.

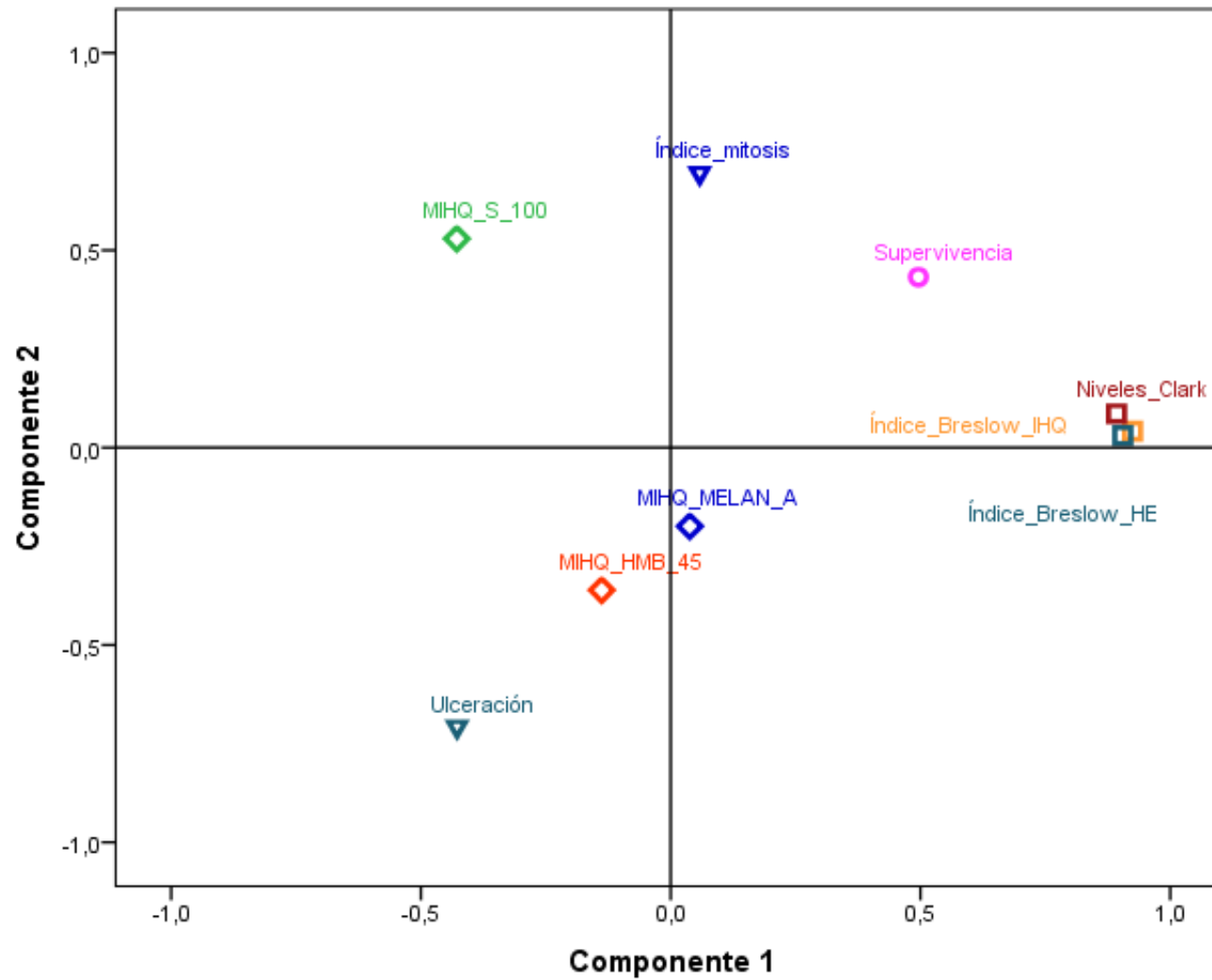


Figura 18. Análisis de Componentes Principales (PCA) realizado con la matriz de correspondencias entre las variables Histopatológicas-Pronósticas, Supervivencia y Marcadores Inmunohistoquímicos.

TABLAS

Tabla 6. Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para las variables demográficas (género y grupos etarios).

Variables demográficas		Frecuencia (#)	Porcentaje (%)
Género	Masculino	11	44,0
	Femenino	14	56,0
	Total	25	100
Grupos etarios	Grupo-I	1	4,0
	Grupo-II	4	16,0
	Grupo-III	6	24,0
	Grupo-IV	6	24,0
	Grupo-V	8	32,0
	Total	25	100

Grupo-I: 15-29 años, **Grupo-II:** 30-44 años, **Grupo-III:** 45-59 años, **Grupo-IV:** 60-74 años, y **Grupo-V:** mayor a 75 años.

Tabla 7. Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para la variable Localización de la lesión.

Localización de la lesión	Frecuencia (#)	Porcentaje (%)
Cabeza y cuello	16	64,0
Tronco	2	8,0
Extremidades superiores	2	8,0
Extremidades inferiores	2	8,0
Palmas y plantas	3	12,0
Total	25	100

Tabla 8. Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para las variables histopatológicas diagnósticas (Clasificación Histopatológica, Fase de Crecimiento, Elastosis Actínica, Infiltrado Inflamatorio, Satelitosis e Infiltrado Perineural).

Histopatológicas Diagnósticas	Frecuencia (#)	Porcentaje (%)	
Clasificación Histopatológica*	Extensión superficial	2	8,0
	Nodular	9	36,0
	Lentigo maligno	10	40,0
	Acro-lentiginoso	2	8,0
	Otros	2	8,0
	Total	25	100
Fase de Crecimiento**	Vertical	19	76,0
	Radial	6	24,0
	Total	25	100
Elastosis Actínica	Presente	14	56,0
	Ausente	9	36,0
	No valorable	2	8,0
	Total	25	100
Infiltrado Inflamatorio	Intenso	4	16,0
	No intenso	18	72,0
	Ausente	3	12,0
	Total	25	100
Satelitosis	Presente	2	8,0
	Ausente	21	84,0
	No valorable	2	8,0
	Total	25	100
Infiltrado Perineural	Presente	7	28,0
	Ausente	15	60,0
	No valorable	3	12,0
	Total	25	100

*Clasificación Histopatológica de Clark 1967. **Fases de crecimiento de Clark 1969.

Tabla 9. Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para las variables de grosor tumoral (Niveles de Clark e Índice de Breslow con tinciones Hematoxilina-Eosina e Inmunohistoquímica).

Grosor Tumoral	Frecuencia (#)	Porcentaje (%)	
Niveles de Clark	No valorable	1	4,0
	Nivel I	7	28,0
	Nivel II	2	8,0
	Nivel III	7	28,0
	Nivel IV	4	16,0
	Nivel V	4	16,0
	Total	25	100
Índice de Breslow - HE*	No valorable	1	4,0
	<1 mm	14	56,0
	1-2 mm	3	12,0
	2-4 mm	3	12,0
	>4 mm	4	16,0
	Total	25	100
Índice de Breslow - IHQ**	No valorable	1	4,0
	<1 mm	12	48,0
	1-2 mm	4	16,0
	2-4 mm	5	20,0
	>4 mm	3	12,0
	Total	25	100

*Tinción Hematoxilina-Eosina. ** Tinción Inmunohistoquímica.

Tabla 10. Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para las variables histopatológicas pronósticas (Ulceración e Índice de Mitosis).

Histopatológicas Pronósticas		Frecuencia (#)	Porcentaje (%)
Ulceración	Presente	8	32,0
	Ausente	16	64,0
	No valorable	1	4,0
	Total	25	100
Índice de Mitosis	Presente	22	88,0
	Ausente	3	12,0
	Total	25	100

Tabla 11. Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para la variable Marcadores Inmunohistoquímicos (S 100, HMB 45 y MELAN A).

Marcadores Inmunohistoquímicos		Frecuencia (#)	Porcentaje (%)
MIHQ - S 100*	Intenso positivo	16	64,0
	Débil positivo	7	28,0
	Negativo	2	8,0
	Total	25	100
MIHQ - HMB 45**	Intenso positivo	21	84,0
	Débil positivo	4	16,0
	Total	25	100
MIHQ - MELAN A***	Intenso positivo	18	72,0
	Débil positivo	6	24,0
	Negativo	1	4,0
	Total	25	100

*Marcador Inmunohistoquímico S 100. **Marcador Inmunohistoquímico HMB 45. ***Marcador Inmunohistoquímico MELAN A.

Tabla 12. Frecuencias y porcentajes observados en el estudio para la variable Supervivencia.

Supervivencia	Frecuencia (#)	Porcentaje (%)
Vivo	17	68,0
Muerto	7	28,0
No determinado	1	4,0
Total	25	100

Tabla 13. Resumen de la tabulación cruzada entre variables demográficas (género/edad) y Localización de la lesión.

Género	Grupos Etarios	Localización de la lesión*					Total		
		CC	T	ES	EI	PP			
MASCULINO	Grupo I	Casos	0	0	0	1	0	1	
		%	0,0	0,0	0,0	9,1	0,0	9,1	
	Grupo II	Casos	1	0	0	1	0	2	
		%	9,1	0,0	0,0	9,1	0,0	18,2	
	Grupo III	Casos	2	0	0	0	1	3	
		%	18,2	0,0	0,0	0,0	9,1	27,3	
	Grupo IV	Casos	2	1	0	0	0	3	
		%	18,2	9,1	0,0	0,0	0,0	27,3	
	Grupo V	Casos	1	0	0	0	1	2	
		%	9,1	0,0	0,0	0,0	9,1	18,2	
	Total	Casos	6	1	0	2	2	11	
		%	54,5	9,1	0,0	18,2	18,2	100	
FEMENINO	Grupo II	Casos	0	1	0	0	1	2	
		%	0,0	7,1	0,0	0,0	7,1	14,3	
	Grupo III	Casos	3	0	0	0	0	3	
		%	21,4	0,0	0,0	0,0	0,0	21,4	
	Grupo IV	Casos	1	0	2	0	0	3	
		%	7,1	0,0	14,3	0,0	0,0	21,4	
	Grupo V	Casos	6	0	0	0	0	6	
		%	42,9	0,0	0,0	0,0	0,0	42,9	
	Total	Casos	10	1	2	0	1	14	
		%	71,4	7,1	14,3	0,0	7,1	100	
	TOTAL	Grupo I	Casos	0	0	0	1	0	1
			%	0,0	0,0	0,0	4,0	0,0	4,0
Grupo II		Casos	1	1	0	1	1	4	
		%	4,0	4,0	0,0	4,0	4,0	16,0	
Grupo III		Casos	5	0	0	0	1	6	
		%	20,0	0,0	0,0	0,0	4,0	24,0	
Grupo IV		Casos	3	1	2	0	0	6	
		%	12,0	4,0	8,0	0,0	0,0	24,0	
Grupo V		Casos	7	0	0	0	1	8	
		%	28,0	0,0	0,0	0,0	4,0	32,0	
Total		Casos	16	2	2	2	3	25	
		%	64,0	8,0	8,0	8,0	12,0	100	

*Localización de la lesión, CC: Cuello y Cabeza, T: Tronco, ES: Extremidades Superiores, EI: Extremidades Inferiores, PP: Palmas y Plantas.

Tabla 14. Resumen de la tabulación cruzada entre variables demográficas (género/edad) y Clasificación Histopatológica.

Género	Grupos Etarios	Clasificación Histopatológica*					Total	
		ES	N	LM	AL	O		
MASCULINO	Grupo I	Casos	1	0	0	0	0	1
		%	9,1	0,0	0,0	0,0	0,0	9,1
	Grupo II	Casos	0	1	0	0	1	2
		%	0,0	9,1	0,0	0,0	9,1	18,2
	Grupo III	Casos	0	1	1	1	0	3
		%	0,0	9,1	9,1	9,1	0,0	27,3
	Grupo IV	Casos	0	0	3	0	0	3
		%	0,0	0,0	27,3	0,0	0,0	27,3
	Grupo V	Casos	0	1	1	0	0	2
		%	0,0	9,1	9,1	0,0	0,0	18,2
Total	Casos	1	3	5	1	1	11	
	%	9,1	27,3	45,5	9,1	9,1	100	
FEMENINO	Grupo II	Casos	0	2	0	0	0	2
		%	0,0	14,3	0,0	0,0	0	14,3
	Grupo III	Casos	1	0	2	0	0	3
		%	7,1	0,0	14,3	0,0	0	21,4
	Grupo IV	Casos	0	1	0	1	1	3
		%	0,0	7,1	0,0	7,1	7,1	21,4
	Grupo V	Casos	0	3	3	0	0	6
		%	0,0	21,4	21,4	0,0	0	42,9
	Total	Casos	1	6	5	2	0	14
		%	7,1	42,9	35,7	14,3	0	100
TOTAL	Grupo I	Casos	1	0	0	0	0	1
		%	4,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0
	Grupo II	Casos	0	3	0	0	1	4
		%	0,0	12,0	0,0	0,0	4,0	16,0
	Grupo III	Casos	1	1	3	1	0	6
		%	4,0	4,0	12,0	4,0	0,0	24,0
	Grupo IV	Casos	0	1	3	2	0	6
		%	0,0	4,0	12,0	8,0	0,0	24,0
	Grupo V	Casos	0	4	4	0	0	8
		%	0,0	16,0	16,0	0,0	0,0	32,0
Total	Casos	2	9	10	2	2	25	
	%	8,0	36,0	40,0	8,0	8,0	100	

*Clasificación Histopatológica, ES: Extensión Superficial, N: Nodular, LM: Lentigo Maligno, AL: Acro-Lentiginoso, O: Otros.

Tabla 15. Resumen de la tabulación cruzada entre variables demográficas (género/edad) y Elastosis Actínica.

Género	Grupos Etarios	Elastosis Actínica			Total	
		Presente	Ausente	No valorable		
MASCULINO	Grupo I	Caso	0	1	0	1
		%	0,0	9,1	0,0	9,1
	Grupo II	Caso	0	1	1	2
		%	0,0	9,1	9,1	18,2
	Grupo III	Caso	2	1	0	3
		%	18,2	9,1	0,0	27,3
	Grupo IV	Caso	2	1	0	3
		%	18,2	9,1	0,0	27,3
	Grupo V	Caso	1	1	0	2
		%	9,1	9,1	0,0	18,2
Total	Caso	5	5	1	11	
	%	45,5	45,5	9,1	100	
FEMENINO	Grupo II	Caso	0	2	0	2
		%	0,0	14,3	0,0	14,3
	Grupo III	Caso	2	0	1	3
		%	14,3	0,0	7,1	21,4
	Grupo IV	Caso	1	2	0	3
		%	7,1	14,3	0,0	21,4
	Grupo V	Caso	6	0	0	6
		%	42,9	0,0	0,0	42,9
	Total	Caso	9	4	1	14
		%	64,3	28,6	7,1	100
TOTAL	Grupo I	Caso	0	1	0	1
		%	0,0	4,0	0,0	4,0
	Grupo II	Caso	0	3	1	4
		%	0,0	12,0	4,0	16,0
	Grupo III	Caso	4	1	1	6
		%	16,0	4,0	4,0	24,0
	Grupo IV	Caso	3	3	0	6
		%	12,0	12,0	0,0	24,0
	Grupo V	Caso	7	1	0	8
		%	28,0	4,0	0,0	32,0
Total	Caso	14	9	2	25	
	%	56,0	36,0	8,0	100	

Tabla 16. Resumen de la tabulación cruzada entre variables demográficas (género/edad) y Supervivencia.

Género	Grupo Etario	Supervivencia			Total		
		Vivo	Muerto	No determinado			
MASCULINO	Grupo I	Caso	1	0	0	1	
		%	9,1	0,0	0,0	9,1	
	Grupo II	Caso	1	1	0	2	
		%	9,1	9,1	0,0	18,2	
	Grupo III	Caso	2	1	0	3	
		%	18,2	9,1	0,0	27,3	
	Grupo IV	Caso	3	0	0	3	
		%	27,3	0,0	0,0	27,3	
	Grupo V	Caso	1	1	0	2	
		%	9,1	9,1	0,0	18,2	
	Total	Caso	8	3	0	11	
		%	72,7	27,3	0,0	100	
FEMENINO	Grupo II	Caso	2	0	0	2	
		%	14,3	0,0	0,0	14,3	
	Grupo III	Caso	2	0	1	3	
		%	14,3	0,0	7,1	21,4	
	Grupo IV	Caso	3	0	0	3	
		%	21,4	0,0	0,0	21,4	
	Grupo V	Caso	2	4	0	6	
		%	14,3	28,6	0,0	42,9	
	Total	Caso	9	4	1	14	
		%	64,3	28,6	7,1	100	
	TOTAL	Grupo I	Caso	1	0	0	1
			%	4,0	0,0	0,0	4,0
Grupo II		Caso	3	1	0	4	
		%	12,0	4,0	0,0	16,0	
Grupo III		Caso	4	1	1	6	
		%	16,0	4,0	4,0	24,0	
Grupo IV		Caso	6	0	0	6	
		%	24,0	0,0	0,0	24,0	
Grupo V		Caso	3	5	0	8	
		%	12,0	20,0	0,0	32,0	
Total		Caso	17	7	1	25	
		%	68,0	28,0	4,0	100	

Tabla 17. Resumen de la tabulación cruzada entre variables demográficas (género/edad) y Marcadores Inmunohistoquímicos.

Género	Grupo Etario	Marcadores Inmunohistoquímicos						
		S 100		HMB 45		MELAN A		
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	
MASCULINO	Grupo I	Casos	1	0	1	0	1	0
		%	9,1	0,0	9,1	0,0	9,1	0,0
	Grupo II	Casos	2	0	2	0	2	0
		%	18,2	0,0	18,2	0,0	18,2	0,0
	Grupo III	Casos	3	0	3	0	3	0
		%	27,3	0,0	27,3	0,0	27,3	0,0
	Grupo IV	Casos	3	0	3	0	3	0
		%	27,3	0,0	27,3	0,0	27,3	0,0
	Grupo V	Casos	2	0	2	0	2	0
		%	18,2	0,0	18,2	0,0	18,2	0,0
Total	Casos	11	0	11	0	11	0	
	%	100	0,0	100	0,0	100	0,0	
FEMENINO	Grupo II	Casos	2	0	2	0	2	0
		%	14,3	0,0	14,3	0,0	14,3	0,0
	Grupo III	Casos	3	0	3	0	2	1
		%	21,4	0,0	21,4	0,0	14,3	7,1
	Grupo IV	Casos	1	2	3	0	3	0
		%	7,1	14,3	21,4	0,0	21,4	0,0
	Grupo V	Casos	6	0	6	0	6	0
		%	42,9	0,0	42,9	0,0	42,9	0,0
	Total	Casos	12	2	14	0	13	1
		%	85,7	14,3	100	0,0	92,9	7,1
TOTAL	Grupo I	Casos	1	0	1	0	1	0
		%	4,0	0,0	4,0	0,0	4,0	0,0
	Grupo II	Casos	4	0	4	0	4	0
		%	16,0	0,0	16,0	0,0	16,0	0,0
	Grupo III	Casos	6	0	6	0	5	1
		%	24,0	0,0	24,0	0,0	20,0	4,0
	Grupo IV	Casos	4	2	6	0	6	0
		%	16,0	8,0	24,0	0,0	24,0	0,0
	Grupo V	Casos	8	0	8	0	8	0
		%	32,0	0,0	32,0	0,0	32,0	0,0
Total	Casos	23	2	25	0	24	1	
	%	92,0	8,0	100	0,0	96,0	4,0	

Tabla 18. Resumen de la tabulación cruzada entre variables Localización de la lesión y Clasificación Histopatológica.

Localización de la lesión		Clasificación Histopatológica					Total
		ES	N	LM	AL	O	
Cabeza y Cuello	Casos	1	5	9	0	1	16
	%	4,0	20,0	36,0	0,0	4,0	64,0
Tronco	Casos	0	1	1	0	0	2
	%	0,0	4,0	4,0	0,0	0,0	8,0
Extremidades Superiores	Casos	0	1	0	1	0	2
	%	0,0	4,0	0,0	4,0	0,0	8,0
Extremidades Inferiores	Casos	1	0	0	0	1	2
	%	4,0	0,0	0,0	0,0	4,0	8,0
Palmas y Plantas	Casos	0	2	0	1	0	3
	%	0,0	8,0	0,0	4,0	0,0	12,0
Total	Casos	2	9	10	2	2	25
	%	8,0	36,0	40,0	8,0	8,0	100

*Clasificación Histopatológica, ES: Extensión Superficial, N: Nodular, LM: Lentigo Maligno, AL: Acro-Lentiginoso, O: Otros.

Tabla 19. Resumen de la tabulación cruzada entre variables Localización de la lesión y Elastosis Actínica.

Localización de la lesión		Elastosis Actínica			Total
		Presente	Ausente	No valorable	
Cabeza y cuello	Caso	14	1	1	16
	%	56,0	4,0	4,0	64,0
Tronco	Caso	0	2	0	2
	%	0,0	8,0	0,0	8,0
Extremidades Superiores	Caso	0	2	0	2
	%	0,0	8,0	0,0	8,0
Extremidades Inferiores	Caso	0	1	1	2
	%	0,0	4,0	4,0	8,0
Palmas y plantas	Caso	0	3	0	3
	%	0,0	12,0	0,0	12,0
Total	Caso	14	9	2	25
	%	56,0	36,0	8,0	100

Tabla 20. Resumen de la tabulación cruzada entre variables Localización de la lesión y Ulceración.

Localización de la lesión		Ulceración			Total
		Presente	Ausente	No valorable	
Cabeza y Cuello	Caso	4	11	1	16
	%	16,0	44,0	4,0	64,0
Tronco	Caso	0	2	0	2
	%	0,0	8,0	0,0	8,0
Extremidades Superiores	Caso	2	0	0	2
	%	8,0	0,0	0,0	8,0
Extremidades Inferiores	Caso	2	0	0	2
	%	8,0	0,0	0,0	8,0
Palmas y Plantas	Caso	0	3	0	3
	%	0,0	12,0	0,0	12,0
Total	Caso	8	16	1	25
	%	32,0	64,0	4,0	100

Tabla 21. Resumen de la tabulación cruzada entre variables Clasificación Histopatológica y Fase de Crecimiento.

Clasificación Histopatológica		Fase de crecimiento		Total
		Vertical	Radial	
Extensión Superficial	Casos	2	0	2
	%	8,0	0,0	8,0
Nodular	Casos	9	0	9
	%	36,0	0,0	36,0
Lentigo Maligno	Casos	4	6	10
	%	16,0	24,0	40,0
Acro-lentiginoso	Casos	2	0	2
	%	8,0	0,0	8,0
Otros	Casos	2	0	2
	%	8,0	0,0	8,0
Total	Casos	19	6	25
	%	76,0	24,0	100

Tabla 22. Resumen de la tabulación cruzada entre variables Fase de Crecimiento-Clasificación Histopatológica y Supervivencia.

Fase de crecimiento	Clasificación Histopatológica		Supervivencia			Total
			Vivo	Muerto	No determinado	
VERTICAL	Extensión	Casos	2	0	0	2
	Superficial	%	10,5	0,0	0,0	10,5
	Nodular	Casos	6	3	0	9
		%	31,6	15,8	0,0	47,4
	Lentigo Maligno	Casos	2	1	1	4
		%	10,5	5,3	5,3	21,1
	Acro-lentiginoso	Casos	1	1	0	2
		%	5,3	5,3	0,0	10,5
	Otros	Casos	1	1	0	2
		%	5,3	5,3	0,0	10,5
Total		Casos	12	6	1	19
		%	63,2	31,6	5,3	100
RADIAL	Lentigo Maligno	Casos	5	1	0	6
		%	83,3	16,7	0,0	100,0
	Total	Casos	5	1	0	6
		%	83,3	16,7	0,0	100
TOTAL	Extensión	Casos	2	0	0	2
	Superficial	%	8,0	0,0	0,0	8,0
	Nodular	Casos	6	3	0	9
		%	24,0	12,0	0,0	36,0
	Lentigo Maligno	Casos	7	2	1	10
		%	28,0	8,0	4,0	40,0
	Acro-lentiginoso	Casos	1	1	0	2
		%	4,0	4,0	0,0	8,0
	Otros	Casos	1	1	0	2
		%	4,0	4,0	0,0	8,0
Total		Casos	17	7	1	25
		%	68,0	28,0	4,0	100

Tabla 23. Resumen de la tabulación cruzada entre variables Fase de Crecimiento-Clasificación Histopatológica y Niveles de Clark.

Fase de crecimiento	Clasificación Histopatológica		Niveles de Clark					No valorable	Total
			Nivel I	Nivel II	Nivel III	Nivel IV	Nivel V		
VERTICAL	Extensión Superficial	Casos	0	0	2	0	0	0	2
		%	0,0	0,0	10,5	0,0	0,0	0,0	10,5
	Nodular	Casos	0	0	3	3	3	0	9
		%	0,0	0,0	15,8	15,8	15,8	0,0	47,4
	Lentigo Maligno	Casos	1	1	1	0	0	1	4
		%	5,3	5,3	5,3	0,0	0,0	5,3	21,1
	Acro-lentiginoso	Casos	0	1	1	0	0	0	2
		%	0,0	5,3	5,3	0,0	0,0	0,0	10,5
	Otros	Casos	0	0	0	1	1	0	2
		%	0,0	0,0	0,0	5,3	5,3	0,0	10,5
Total		Casos	1	2	7	4	4	1	19
		%	5,3	10,5	36,8	21,1	21,1	5,3	100
RADIAL	Lentigo Maligno	Casos	6	0	0	0	0	0	6
		%	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100
	Total	Casos	6	0	0	0	0	0	6
		%	100	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	100
TOTAL	Extensión Superficial	Casos	0	0	2	0	0	0	2
		%	0,0	0,0	8,0	0,0	0,0	0,0	8,0
	Nodular	Casos	0	0	3	3	3	0	9
		%	0,0	0,0	12,0	12,0	12,0	0,0	36,0
	Lentigo Maligno	Casos	7	1	1	0	0	1	10
		%	28,0	4,0	4,0	0,0	0,0	4,0	40,0
	Acro-lentiginoso	Casos	0	1	1	0	0	0	2
		%	0,0	4,0	4,0	0,0	0,0	0,0	8,0
	Otros	Casos	0	0	0	1	1	0	2
		%	0,0	0,0	0,0	4,0	4,0	0,0	2,0
Total		Casos	7	2	7	4	4	1	25
		%	28,0	8,0	28,0	16,0	16,0	4,0	100

Tabla 24. Resumen de la tabulación cruzada entre variables Fase de Crecimiento-Clasificación Histopatológica e Índice de Breslow con tinción Hematoxilina-Eosina.

Fase de crecimiento	Clasificación Histopatológica	Índice de Breslow - HE*					Total	
		<1 mm	1-2 mm	2-4 mm	>4 mm	No valorable		
VERTICAL	Extensión Superficial	Casos	1	1	0	0	0	2
		%	5,3	5,3	0,0	0,0	0,0	10,5
	Nodular	Casos	1	1	3	4	0	9
		%	5,3	5,3	15,8	21,1	0,0	47,4
	Lentigo Maligno	Casos	3	0	0	0	1	4
		%	15,8	0,0	0,0	0,0	5,3	21,1
	Acro-Lentiginoso	Casos	2	0	0	0	0	2
		%	10,5	0,0	0,0	0,0	0,0	10,5
	Otros	Casos	1	1	0	0	0	2
		%	5,3	5,3	0,0	0,0	0,0	10,5
	Total	Casos	8	3	3	4	1	19
		%	42,1	15,8	15,8	21,1	5,3	100
RADIAL	Lentigo Maligno	Casos	6	0	0	0	0	6
		%	100,0	0	0,0	0,0	0,0	100
	Total	Casos	6	0,0	0,0	0,0	0,0	6
		%	100,0	0	0	0	0	100
TOTAL	Extensión Superficial	Casos	1	1	0	0	0	2
		%	4,0	4,0	0,0	0,0	0,0	8,0
	Nodular	Casos	1	1	3	4	0	9
		%	4,0	4,0	12,0	16,0	0,0	36,0
	Lentigo Maligno	Casos	9	0	0	0	1	10
		%	36,0	0,0	0,0	0,0	4,0	40,0
	Acro-Lentiginoso	Casos	2	0	0	0	0	2
		%	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,0
	Otros	Casos	1	1	0	0	0	2
		%	4,0	4,0	0,0	0,0	0,0	8,0
	Total	Casos	14	3	3	4	1	25
		%	56,0	12,0	12,0	16,0	4,0	100

* Índice de Breslow con tinción Hematoxilina-Eosina.

Tabla 25. Resumen de la tabulación cruzada entre variables Fase de Crecimiento-Clasificación Histopatológica e Índice de Breslow con tinción Inmunohistoquímica.

Fase de crecimiento	Clasificación Histopatológica		Índice de Breslow-IHQ*					Total	
			<1 mm	1-2 mm	2-4 mm	>4 mm	NV		
VERTICAL	Extensión Superficial	Casos	1	1	0	0	0	2	
		%	5,3	5,3	0,0	0,0	0,0	10,5	
	Nodular	Casos	0	1	5	3	0	9	
		%	0,0	5,3	26,3	15,8	0,0	47,4	
	Lentigo Maligno	Casos	3	0	0	0	1	4	
		%	15,8	0,0	0,0	0,0	5,3	21,1	
	Acro-lentiginoso	Casos	1	1	0	0	0	2	
		%	5,3	5,3	0,0	0,0	0,0	10,5	
	Otros	Casos	1	1	0	0	0	2	
		%	5,3	5,3	0,0	0,0	0,0	10,5	
	Total		Casos	6	4	5	3	1	19
			%	31,6	21,1	26,3	15,8	5,3	100
	RADIAL	Lentigo Maligno	Casos	6	0	0	0	0	6
			%	100	0,0	0,0	0,0	0,0	100
Total		Casos	6	0	0	0	0	6	
		%	100	0,0	0,0	0,0	0,0	100	
TOTAL	Extensión Superficial	Casos	1	1	0	0	0	2	
		%	4,0	4,0	0,0	0,0	0,0	8,0	
	Nodular	Casos	0	1	5	3	0	9	
		%	0,0	4,0	20,0	12,0	0,0	36,0	
	Lentigo Maligno	Casos	9	0	0	0	1	10	
		%	36,0	0,0	0,0	0,0	4,0	40,0	
	Acro-lentiginoso	Casos	1	1	0	0	0	2	
		%	4,0	4,0	0,0	0,0	0,0	8,0	
	Otros	Casos	1	1	0	0	0	2	
		%	4,0	4,0	0,0	0,0	0,0	8,0	
	Total		Casos	12	4	5	3	1	25
			%	48,0	16,0	20,0	12,0	4,0	100

* Índice de Breslow con tinción Inmunohistoquímica.

Tabla 26. Resumen de la tabulación cruzada entre variables Clasificación Histopatológica y Marcadores Inmunohistoquímicos.

Clasificación Histopatológicas		Marcadores Inmunohistoquímicos					
		S 100		HMB 45		MELAN A	
		Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Extensión Superficial	Casos	2	0	2	0	2	0
	%	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
Nodular	Casos	8	1	9	0	9	0
	%	88,89	11,11	100,00	0,00	100,00	0,00
Lentigo Maligno	Casos	10	0	10	0	9	1
	%	100,00	0,00	100,00	0,00	90,00	10,00
Acro-Lentiginoso	Casos	1	1	2	0	2	0
	%	50,00	50,00	100,00	0,00	100,00	0,00
Otros	Casos	2	0	2	0	2	0
	%	100,00	0,00	100,00	0,00	100,00	0,00
Total	Casos	23	2	25	0	24	1
	%	92,00	8,00	100	0,00	96,00	4,00

Tabla 27. Resumen de la tabulación cruzada entre variables Niveles de Clark e Índice de Breslow con tinción Hematoxilina-Eosina.

Niveles de Clark		Índice de Breslow-HE*					Total
		<1 mm	1-2 mm	2-4 mm	>4 mm	No valorable	
Nivel I	Casos	7	0	0	0	0	7
	%	28,0	0,0	0,0	0,0	0,0	28,0
Nivel II	Casos	2	0	0	0	0	2
	%	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,0
Nivel III	Casos	4	2	1	0	0	7
	%	16,0	8,0	4,0	0,0	0,0	28,0
Nivel IV	Casos	0	1	1	2	0	4
	%	0,0	4,0	4,0	8,0	0,0	16,0
Nivel V	Casos	1	0	1	2	0	4
	%	4,0	0,0	4,0	8,0	0,0	16,0
No valorable	Casos	0	0	0	0	1	1
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	4,0
Total	Casos	14	3	3	4	1	25
	%	56,0	12,0	12,0	16,0	4,0	100

* Índice de Breslow con tinción Hematoxilina-Eosina.

Tabla 28. Resumen de la tabulación cruzada entre variables Niveles de Clark e Índice de Breslow con tinción Inmunohistoquímica.

Niveles de Clark		Índice de Breslow-IHQ*					Total
		<1 mm	1-2 mm	2-4 mm	>4 mm	No valorable	
Nivel I	Casos	7	0	0	0	0	7
	%	28,0	0,0	0,0	0,0	0,0	28,0
Nivel II	Casos	2	0	0	0	0	2
	%	8,0	0,0	0,0	0,0	0,0	8,0
Nivel III	Casos	2	2	3	0	0	7
	%	8,0	8,0	12,0	0,0	0,0	28,0
Nivel IV	Casos	0	2	1	1	0	4
	%	0,0	8,0	4,0	4,0	0,0	16,0
Nivel V	Casos	1	0	1	2	0	4
	%	4,0	0,0	4,0	8,0	0,0	16,0
No valorable	Casos	0	0	0	0	1	1
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	4,0
Total	Casos	12	4	5	3	1	25
	%	48,0	16,0	20,0	12,0	4,0	100

* Índice de Breslow con tinción Inmunohistoquímica.

Tabla 29. Resumen de la tabulación cruzada entre variables Índice de Breslow con tinción Hematoxilina-Eosina e Índice de Breslow con tinción Inmunohistoquímica.

Índice de Breslow-HE [▶]		Índice de Breslow-IHQ [▲]					Total
		<1 mm	1-2 mm	2-4 mm	>4 mm	No valorable	
<1 mm	Casos	12	1	1	0	0	14
	%	48,0	4,0	4,0	0,0	0,0	56,0
1-2 mm	Casos	0	2	1	0	0	3
	%	0,0	8,0	4,0	0,0	0,0	12,0
2-4 mm	Casos	0	0	3	0	0	3
	%	0,0	0,0	12,0	0,0	0,0	12,0
>4 mm	Casos	0	1	0	3	0	4
	%	0,0	4,0	0,0	12,0	0,0	16,0
No valorable	Casos	0	0	0	0	1	1
	%	0,0	0,0	0,0	0,0	4,0	4,0
Total	Casos	12	4	5	3	1	25
	%	48,0	16,0	20,0	12,0	4,0	100

▶ Índice de Breslow con tinción Hematoxilina-Eosina, ▲ Índice de Breslow con tinción Inmunohistoquímica.

Tabla 30. Matriz de correlaciones y significancia estadística entre todas las variables analizadas en este estudio.

	Grupos Etarios	Género	Localización	Clasificación Histopatológica	Fase de crecimiento	Elastosis Actínica	Satelitosis	Infiltrado Inflamatorio	Infiltrado Perineural	Niveles de Clark	Índice de Breslow-HE	Índice de Breslow-IHQ	Ulceración	Índice de mitosis	Supervivencia	MIHQ -S 100	MIHQ-HMB 45	MIHQ-MELAN A
Grupos Etarios		,094	,032*	,290	,209	,003**	,212	,457	,442	,064	,269	,384	,438	,298	,176	,105	,424	,180
Género	,272		,118	,340	,373	,221	,167	,027*	,440	,079	,065	,060	,062	,055	,254	,307	,401	,140
Localización	-,376	-,246		,411	,034*	,000***	,161	,307	,347	,114	,420	,332	,208	,362	,350	,300	,081	,060
Clasificación Histopatológica	,116	-,087	,047		,226	,215	,317	,267	,004**	,298	,034*	,034*	,494	,138	,194	,267	,133	,467
Fase de crecimiento	,169	-,068	-,371	,157		,011*	,500	,420	,242	,000***	,015*	,006**	,075	,160	,175	,045	,100	,187
Elastosis Actínica	-,539	-,161	,624	,165	-,457		,228	,195	,019*	,001***	,028*	,071	,025*	,090	,104	,210	,189	,156
Satelitosis	,167	,201	-,206	-,100	0,000	,156		,500	,055	,175	,133	,219	,032*	,067	,195	,063	,500	,500
Infiltrado Inflamatorio	-,023	,391	-,106	,130	,043	,180	0,000		,042	,119	,130	,113	,312	,104	,188	,376	,438	,190
Infiltrado Perineural	,031	,032	,083	,515	,147	,417	,327	,352		,355	,235	,174	,255	,074	,210	,085	,380	,093
Niveles de Clark	-,313	,292	,250	-,111	-,717	,591	,195	,245	,078		,000***	,000***	,011*	,208	,046*	,067	,267	,382
Índice de Breslow-HE	-,129	,311	,042	-,370	-,434	,386	,231	,234	-,151	,764		,000***	,022*	,326	,052	,177	,500	,394
Índice de Breslow-IHQ	-,062	,320	,091	-,372	-,493	,303	,163	,251	-,196	,764	,878		,052	,359	,017*	,115	,162	,459
Ulceración	-,033	-,316	-,170	-,003	,297	-,396	-,377	,103	-,138	-,455	-,407	-,333		,097	,009**	,138	,134	,437
Índice de mitosis	,111	,327	-,074	,226	-,208	,277	,308	,261	,298	,170	,095	,076	-,269		,165	,266	,221	,149
Supervivencia	,194	,139	-,081	,181	-,195	,260	,179	,185	,169	,344	,332	,425	-,471	,203		,303	,341	,291
MIHQ -S 100	,260	,106	-,110	,130	,347	-,169	,314	-,067	,283	-,309	-,194	-,249	-,227	,131	-,108		,423	,208
MIHQ-HMB 45	,040	-,053	-,288	,231	,266	-,184	0,000	,033	-,064	-,131	0,000	-,206	,230	-,161	-,086	,041		,395
MIHQ-MELAN A	-,191	,225	,318	,018	,185	,211	0,000	,183	,273	,063	,057	,021	,033	-,217	-,116	,170	-,056	

De la diagonal hacia abajo corresponden a los valores de correlación; hacia arriba a valores de significación estadística.
(Significancia = * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Tabla 31. Resumen de las medidas de adecuación de muestreo para todas las variables analizadas en este estudio.

MEDIDAS DE ADECUACIÓN DE MUESTREO		
Test de Bartlett	Aprox. Chi-cuadrado	218,129
	Gados de libertad	153
	Significancia	0,000***
Índice KMO[▶]		0,512

▶ Índice de Kaiser-Meyer-Olkin. (Significancia = * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Tabla 32. Varianza explicada en el PCA realizado con todas las variables analizadas en este estudio.

VARIANZA EXPLICADA		COMPONENTE	
		1	2
Total		4,455	2,651
Autovalores iniciales	% de varianza	24,748	14,725
	% acumulado	24,748	39,480
Total		4,455	2,651
Sumas de extracción de cargas al cuadrado	% de varianza	24,748	14,725
	% acumulado	24,748	39,480
Total		4,028	2,471
Sumas de rotación de cargas al cuadrado	% de varianza	22,377	13,730
	% acumulado	22,377	36,107

Método de extracción: Análisis de Componentes principales. (Se necesitan 18 componentes para explicar el 100% de la varianza).

Tabla 33. Matriz de correlaciones y significancia estadística de las variables Histopatológicas y Marcadores Inmunoquímicos.

	Clasificación Histopatológica	Fase de crecimiento	Elastosis Actínica	Satelitosis	Infiltrado Inflamatorio	Infiltrado Perineural	Niveles de Clark	Índice de Breslow-HE	Índice de Breslow-IHQ	Ulceración	Índice de mitosis	MIHQ -S 100	MIHQ-HMB 45	MIHQ-MELAN A
Clasificación Histopatológica		,226	,215	,317	,267	,004**	,298	,034*	,034*	,494	,138	,267	,133	,467
Fase de crecimiento	,157		,011*	,500	,420	,242	,000***	,015*	,006**	,075	,160	,045*	,100	,187
Elastosis Actínica	,165	-,457		,228	,195	,019*	,001***	,028*	,071	,025*	,090	,210	,189	,156
Satelitosis	-,100	0,000	,156		,500	,055	,175	,133	,219	,032*	,067	,063	,500	,500
Infiltrado Inflamatorio	,130	,043	,180	0,000		,042*	,119	,130	,113	,312	,104	,376	,438	,190
Infiltrado Perineural	,515	,147	,417	,327	,352		,355	,235	,174	,255	,074	,085	,380	,093
Niveles de Clark	-,111	-,717	,591	,195	,245	,078		,000***	,000***	,011*	,208	,067	,267	,382
Índice de Breslow-HE	-,370	-,434	,386	,231	,234	-,151	,764		,000***	,022*	,326	,177	,500	,394
Índice de Breslow-IHQ	-,372	-,493	,303	,163	,251	-,196	,764	,878		,052	,359	,115	,162	,459
Ulceración	-,003	,297	-,396	-,377	,103	-,138	-,455	-,407	-,333		,097	,138	,134	,437
Índice de mitosis	,226	-,208	,277	,308	,261	,298	,170	,095	,076	-,269		,266	,221	,149
MIHQ -S 100	,130	,347	-,169	,314	-,067	,283	-,309	-,194	-,249	-,227	,131		,423	,208
MIHQ-HMB 45	,131	,266	-,184	0,000	,033	-,064	-,131	0,000	-,206	,230	-,161	,041		,395
MIHQ-MELAN A	,018	,185	,211	0,000	,183	,273	,063	,057	,021	,033	-,217	,170	-,056	

De la diagonal hacia abajo corresponden a los valores de correlación; hacia arriba a valores de significación estadística.
(Significancia = * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Tabla 34. Resumen de las medidas de adecuación de muestreo para las variables Histopatológicas y Marcadores Inmunohistoquímicos.

MEDIDAS DE ADECUACIÓN DE MUESTREO		
Test de Bartlett	Aprox. Chi-cuadrado	149,005
	Gados de libertad	91
	Significancia	0,000***
Índice KMO[▶]		0,608

▶ Índice de Kaiser-Meyer-Olkin. (Significancia = * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Tabla 35. Varianza explicada en el PCA con las variables características Histopatológicas y Marcadores Inmunohistoquímicos.

VARIANZA EXPLICADA		COMPONENTE	
		1	2
	Total	3,994	2,444
Autovalores iniciales	% de varianza	28,528	17,458
	% acumulado	28,528	45,985
	Total	3,994	2,444
Sumas de extracción de cargas al cuadrado	% de varianza	28,528	17,458
	% acumulado	28,528	45,985
	Total	3,745	2,180
Sumas de rotación de cargas al cuadrado	% de varianza	26,752	15,570
	% acumulado	26,752	42,322

Método de extracción: Análisis de Componentes principales. (Se necesitan 14 componentes para explicar el 100% de la varianza).

Tabla 36. Matriz de correlaciones y significancia estadística entre las variables Histopatológicas-Pronósticas, Supervivencia y Marcadores Inmunohistoquímicos.

	Niveles de Clark	Índice de Breslow-HE	Índice de Breslow-IHQ	Ulceración	Índice de mitosis	Supervivencia	MIHQ -S 100	MIHQ-HMB 45	MIHQ-MELAN A
Niveles de Clark		,000***	,000***	,011*	,208	,046*	,067	,267	,382
Índice de Breslow-HE	,764		,000***	,022*	,326	,052	,177	,500	,394
Índice de Breslow-IHQ	,764	,878		,052	,359	,017*	,115	,162	,459
Ulceración	-,455	-,407	-,333		,097	,009**	,138	,134	,437
Índice de mitosis	,170	,095	,076	-,269		,165	,266	,221	,149
Supervivencia	,344	,332	,425	-,471	,203		,303	,341	,291
MIHQ -S 100	-,309	-,194	-,249	-,227	,131	-,108		,423	,208
MIHQ-HMB 45	-,131	0,000	-,206	,230	-,161	-,086	,041		,395
MIHQ-MELAN A	,063	,057	,021	,033	-,217	-,116	,170	-,056	

De la diagonal hacia abajo corresponden a los valores de correlación; hacia arriba a valores de significación estadística. (Significancia = * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Tabla 37. Resumen de las medidas de adecuación de muestreo para las variables Histopatológicas - Pronósticas, Supervivencia y Marcadores Inmunohistoquímicos.

MEDIDAS DE ADECUACIÓN DE MUESTREO		
Test de Bartlett	Aprox. Chi-cuadrado	150,580
	Gados de libertad	91
	Significancia	0,000***
Índice KMO[▶]		0,611

▶ Índice de Kaiser-Meyer-Olkin. (Significancia = * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$)

Tabla 38. Varianza explicada en el PCA entre las variables Histopatológicas-Pronósticas, Supervivencia y Marcadores Inmunohistoquímicos.

VARIANZA EXPLICADA		Componente	
		1	2
	Total	3,270	1,469
Autovalores iniciales	% de varianza	36,328	16,321
	% acumulado	36,328	52,649
	Total	3,270	1,469
Sumas de extracción de cargas al cuadrado	% de varianza	36,328	16,321
	% acumulado	36,328	52,649
	Total	3,107	1,631
Sumas de rotación de cargas al cuadrado	% de varianza	34,524	18,125
	% acumulado	34,524	52,649

Método de extracción: Análisis de Componentes principales. (Se necesitan 9 componentes para explicar el 100% de la varianza).

FOTOGRAFÍAS

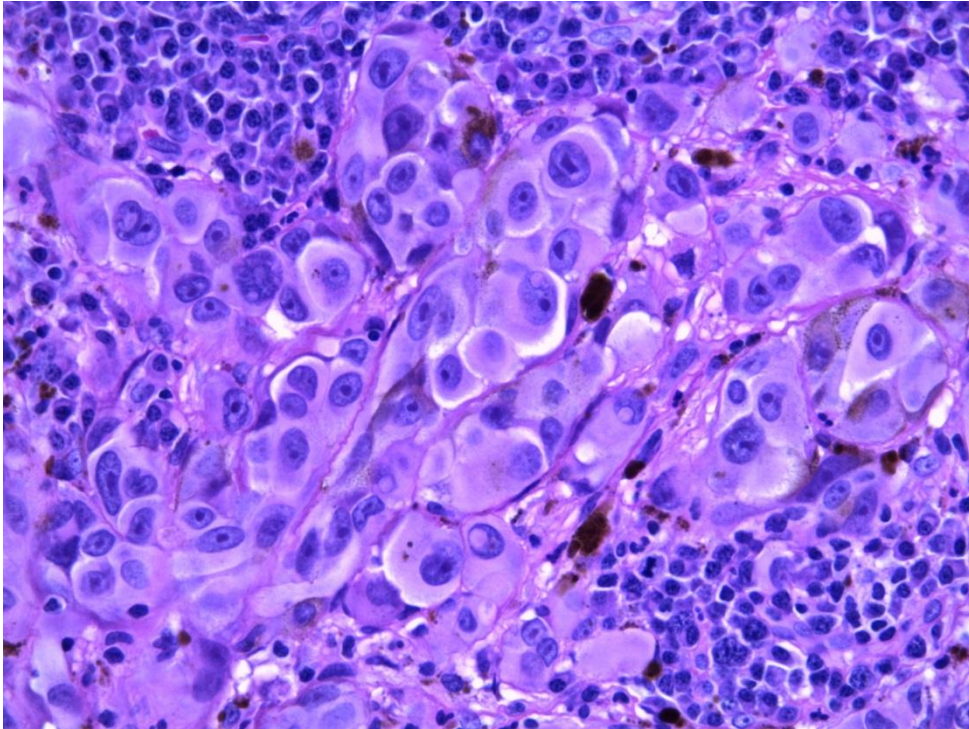


Foto 1. Histología del melanoma: células gigantes, vacuolas intranucleares, nucléolos marcados y amplio citoplasma.

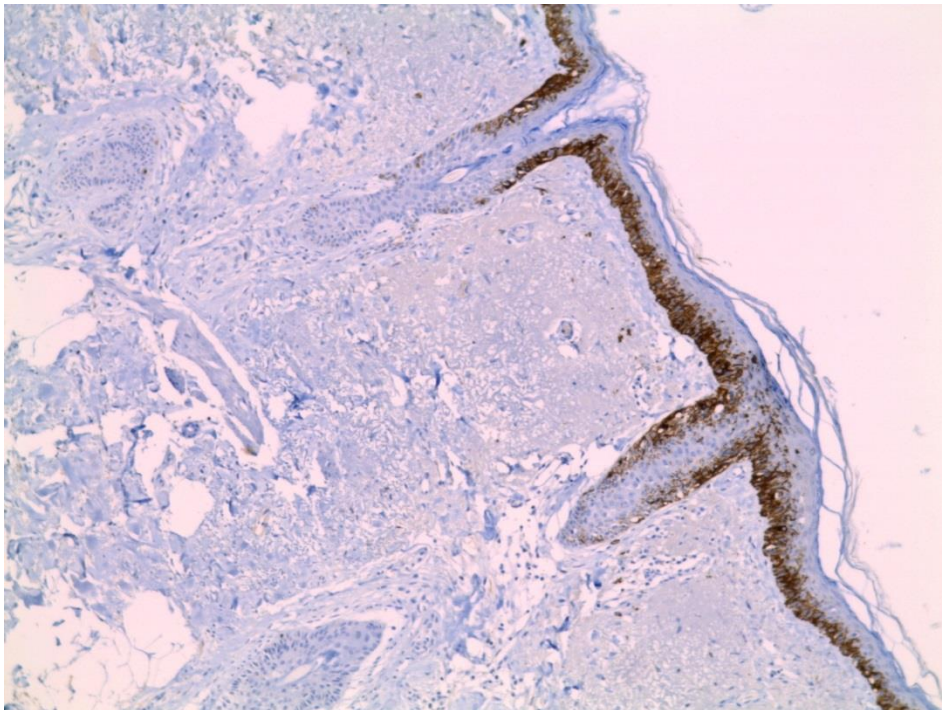


Foto 2. Marcador HMB-45 positivo en melanoma tipo lentigo maligno con fase de crecimiento radial.

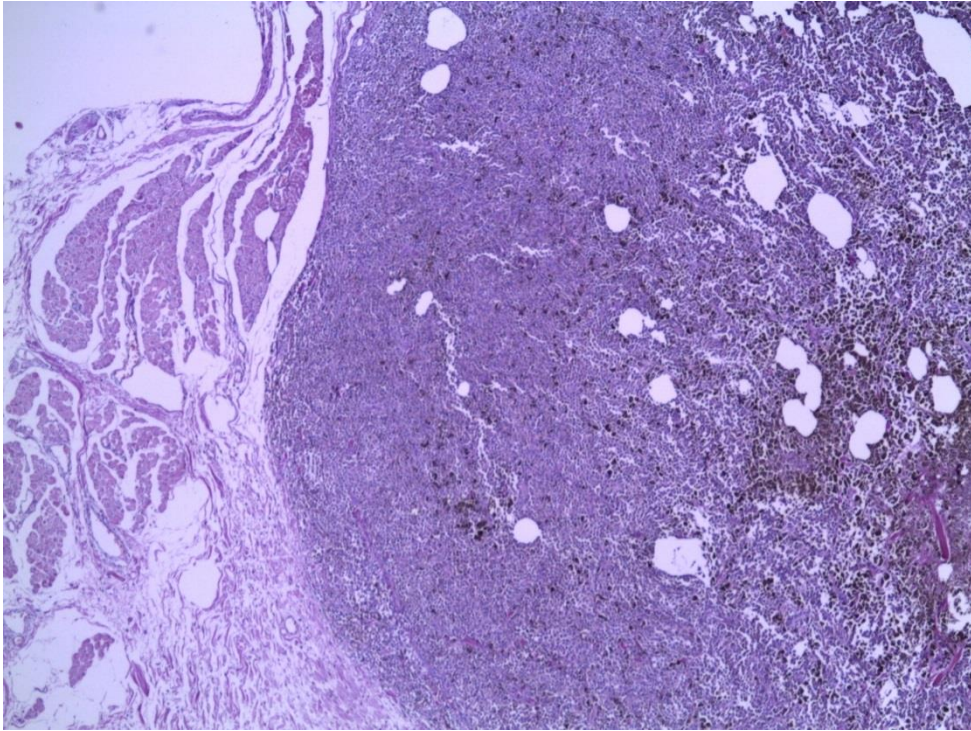


Foto 3. Variante nodular de melanoma

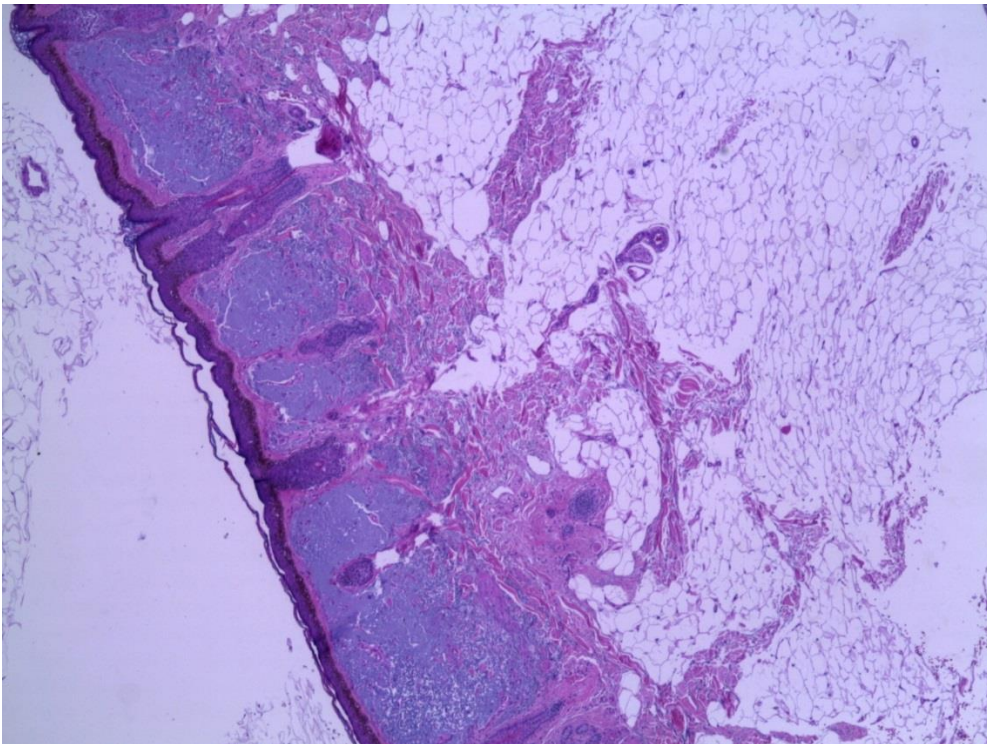


Foto 4. Elastosis actínica severa.

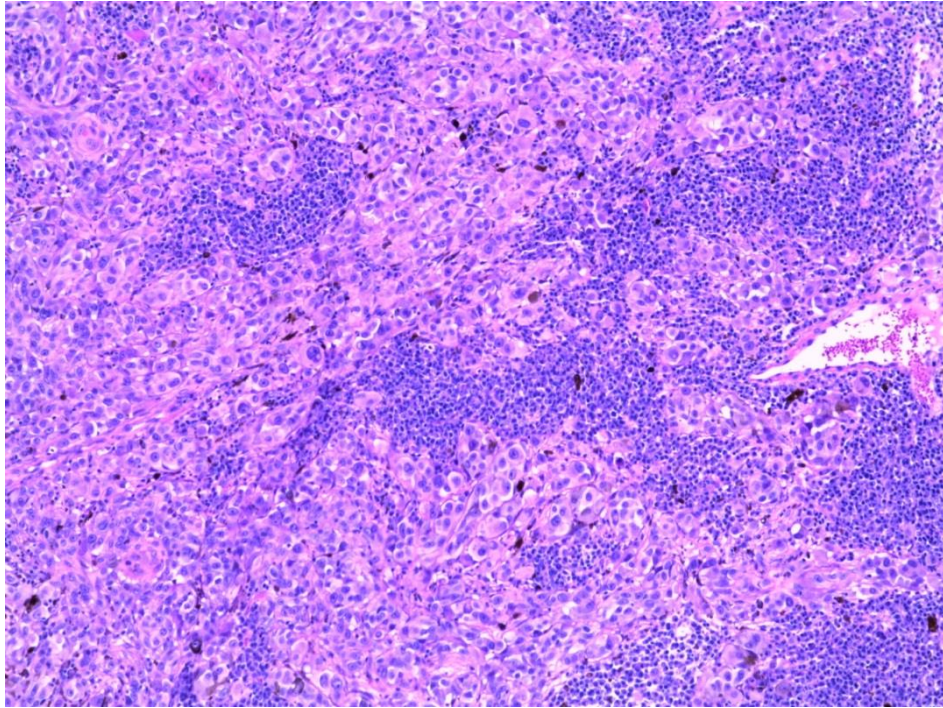


Foto 5. Reacción inflamatoria intensa rodeando células tumorales

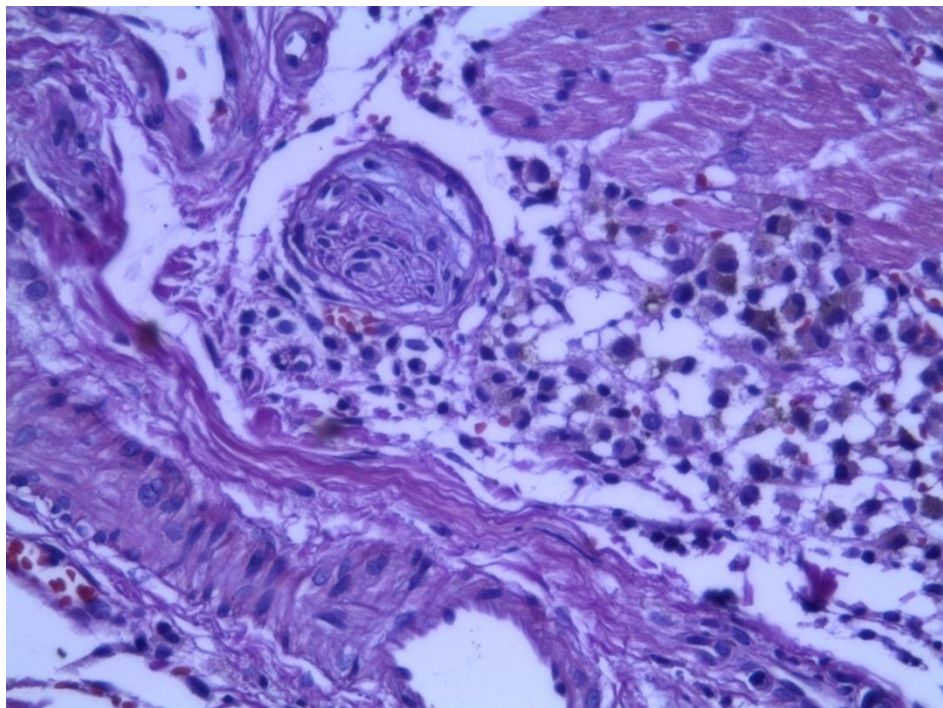


Foto 6. Invasión perineural de melanocitos malignos.

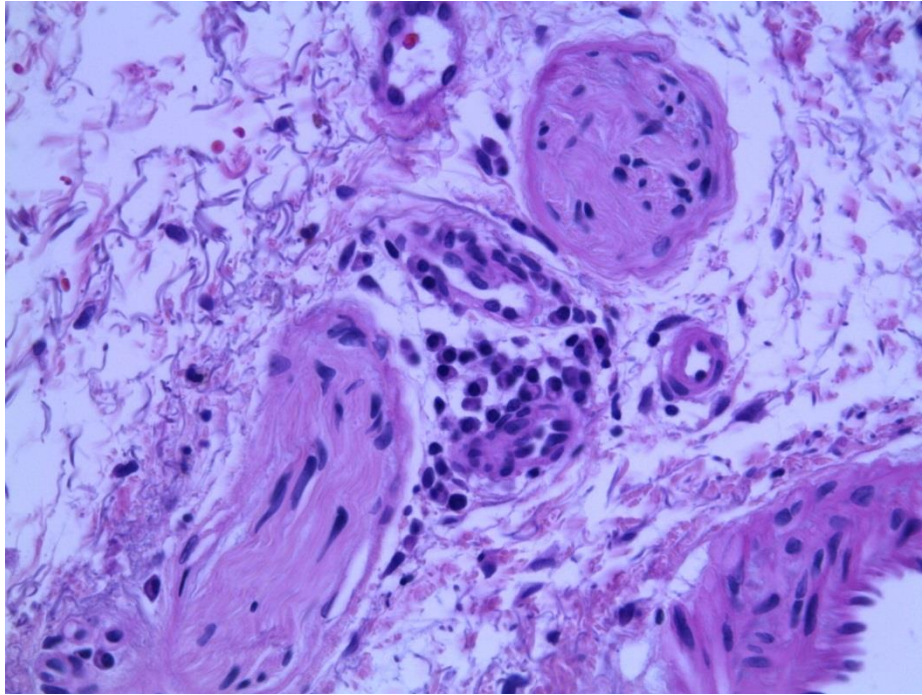


Foto 7. Compromiso del paquete vasculo-nervioso dérmico por células tumorales

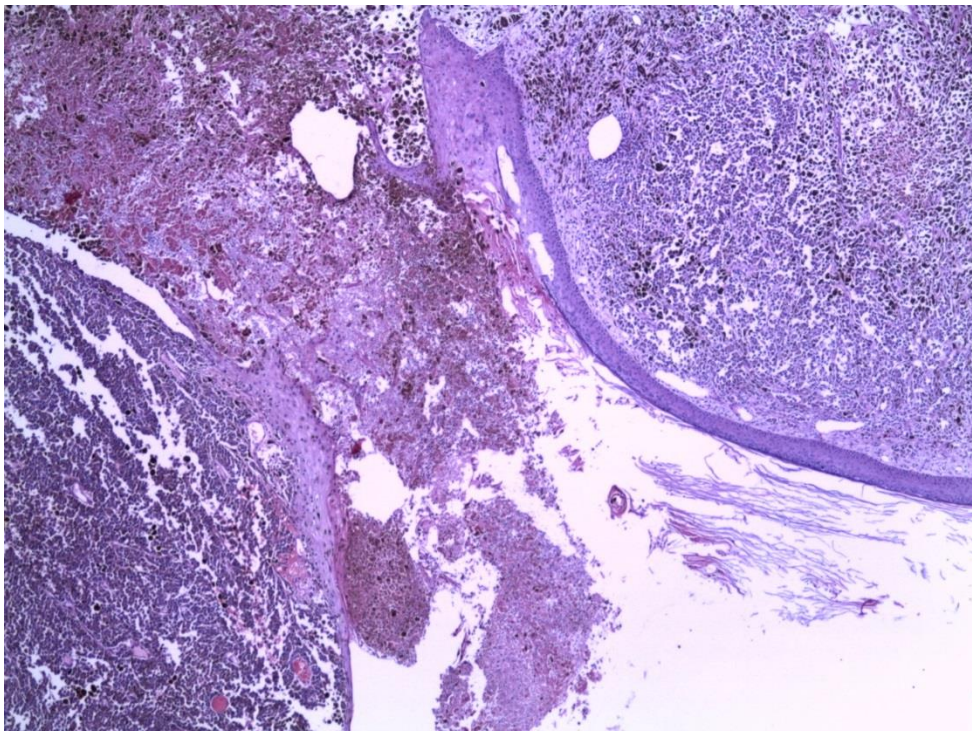


Foto 8. Invasión tumoral en todo el espesor de la piel y ulceración.

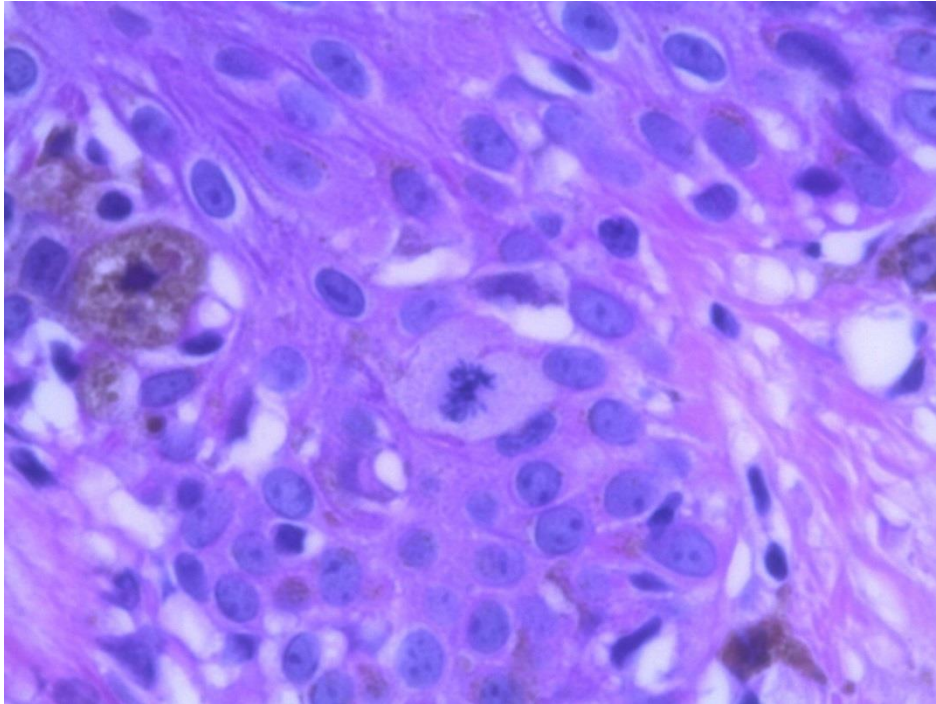


Foto 9. Mitosis entre células tumorales con tinción hematoxilina-eosina. Patrón de fruta estrellada.

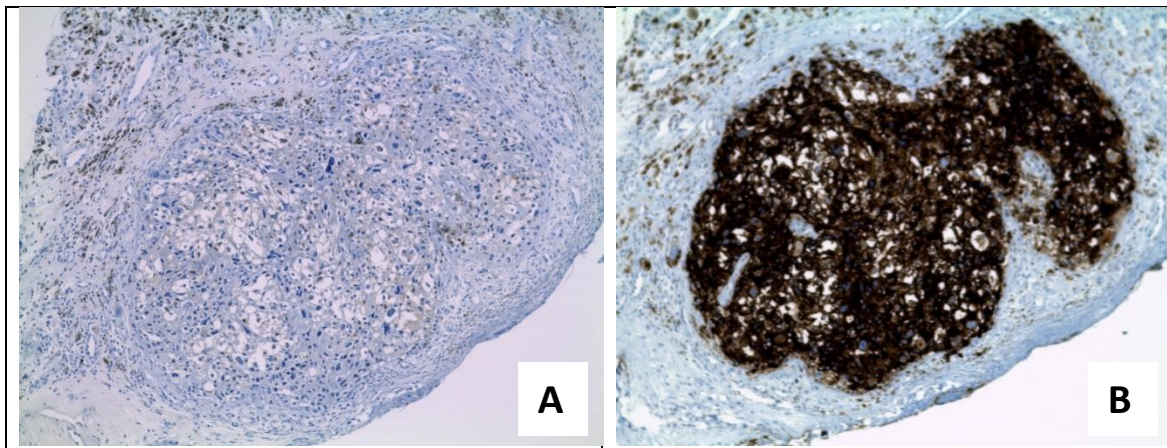


Foto 10. A. Marcador S-100 negativo y B. Marcador HMB-45 positivo

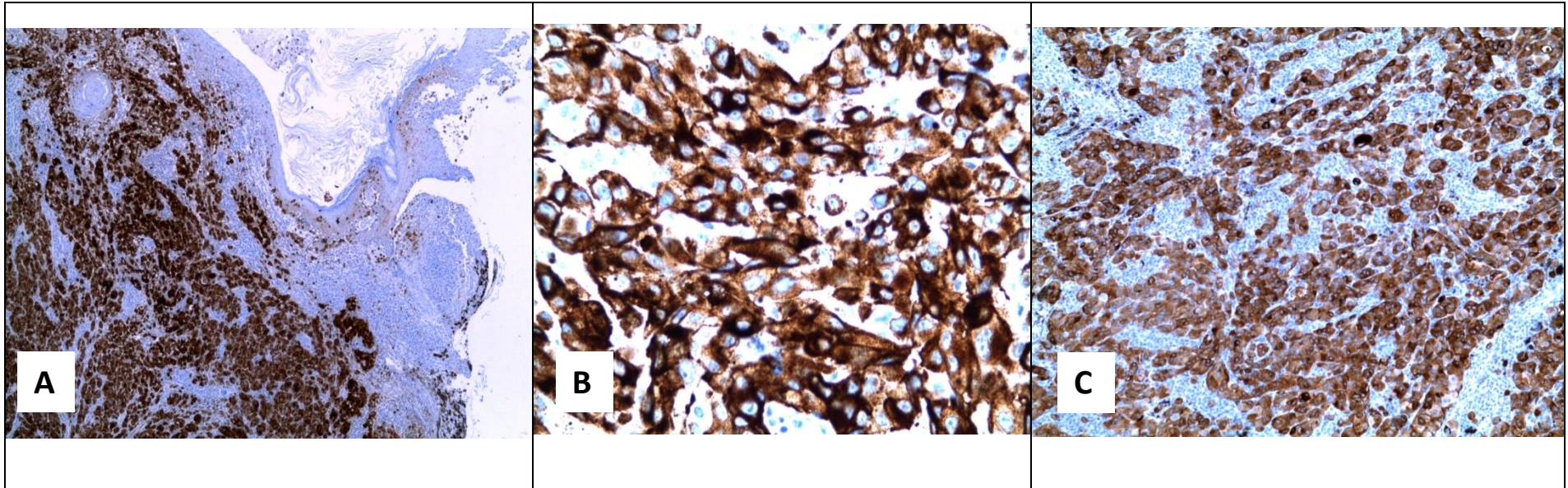


Foto 11. Positividad de los tres marcadores inmunohistoquímicos en la misma muestra histológica. A: marcador S-100 (nuclear y citoplasmático), B y C: marcadores HMB-45 y MELAN-A (citoplasmáticos) respectivamente.

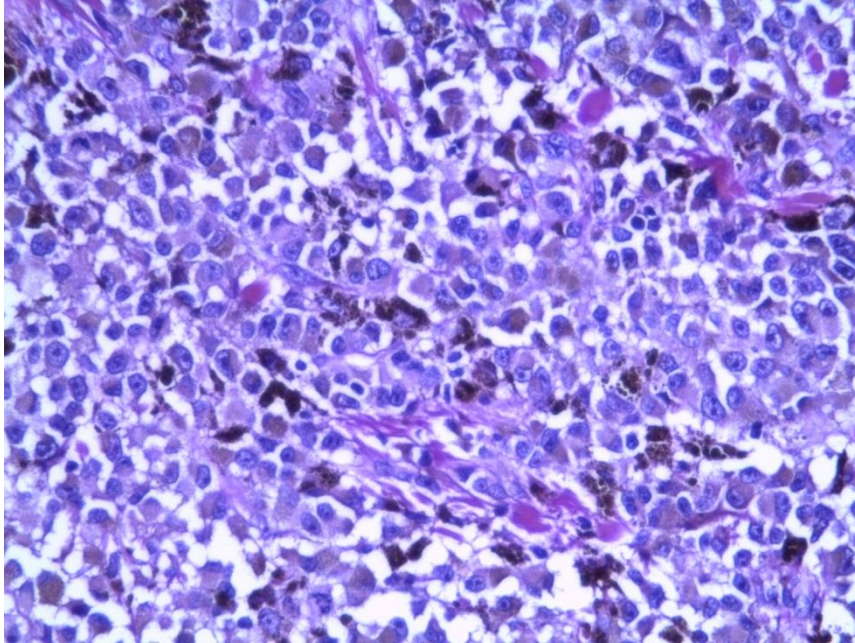


Foto 12. Histología difusa y distribución homogénea de pigmento melánico

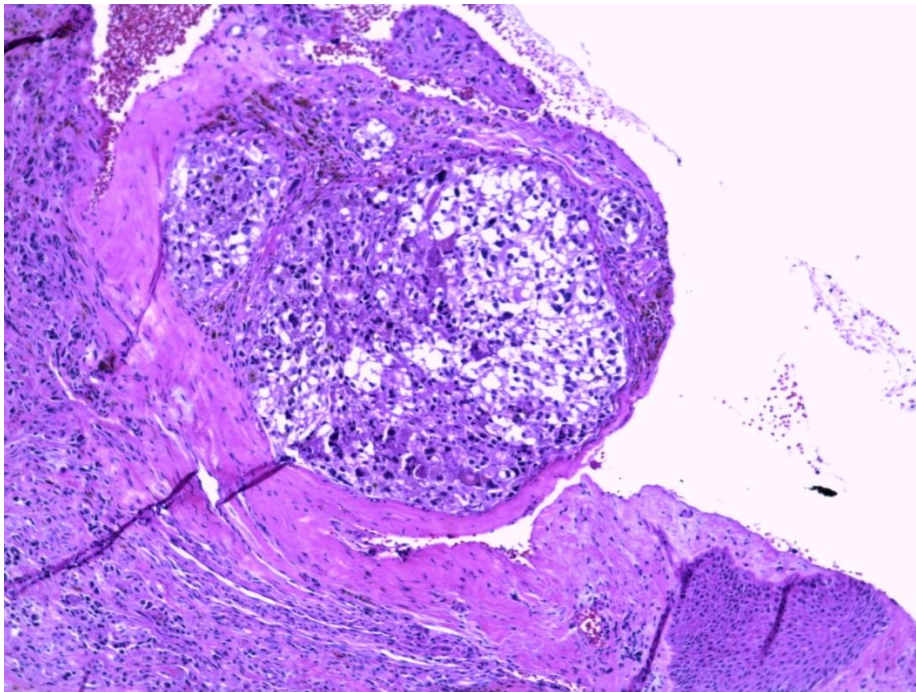


Foto 13. Melanoma nodular de células claras, tinción hematoxilina-eosina

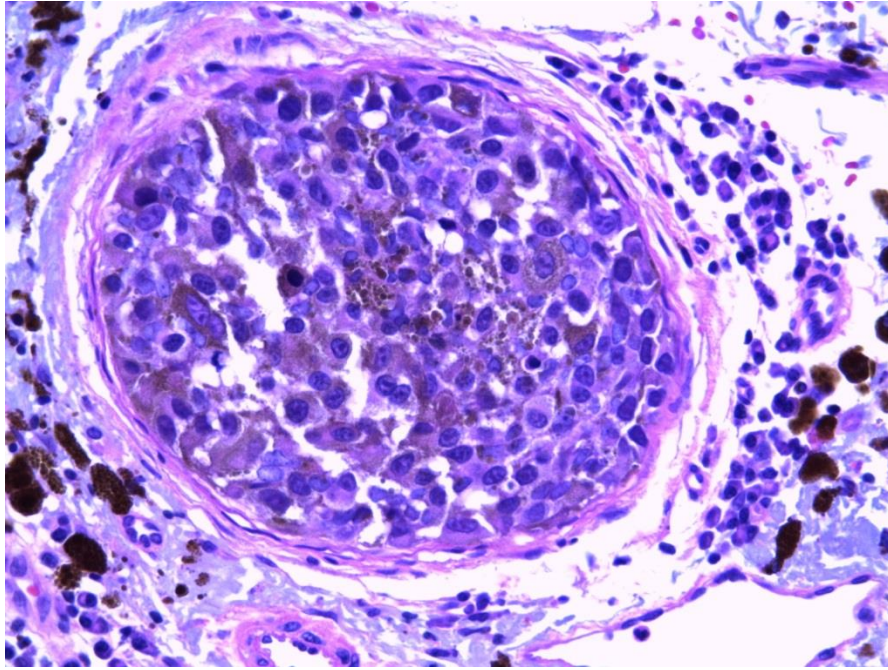


Foto 14. Invasión vascular y trombo tumoral de melanocitos malignos.

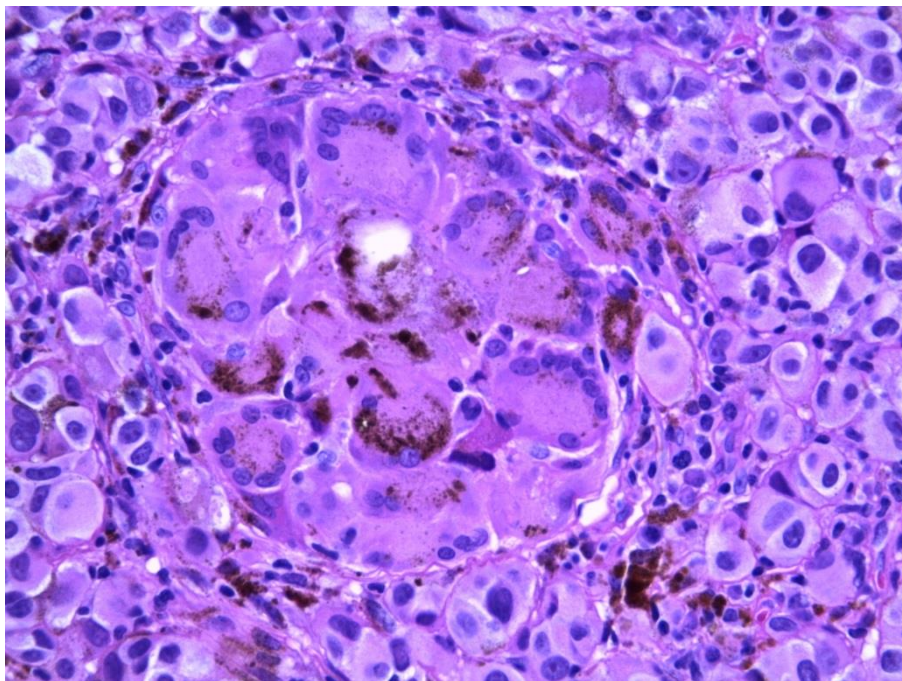


Foto 15. Granuloma con células melanocíticas malignas gigantes multinucleadas

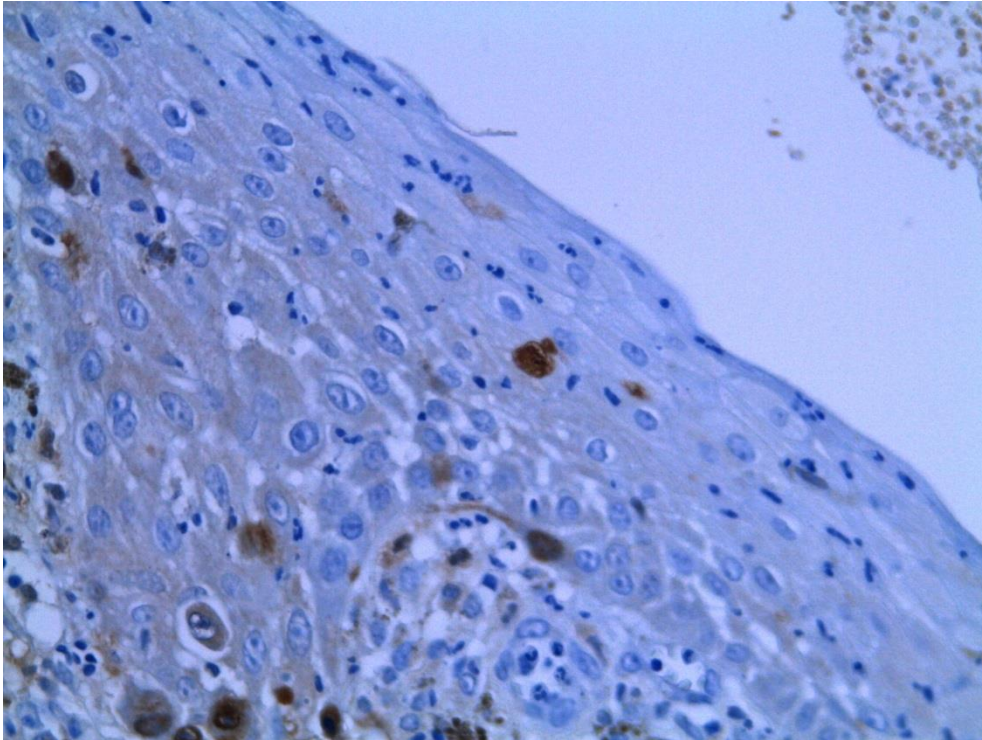


Foto 16. Epidermotropismo en melanoma maligno con el marcador S-100

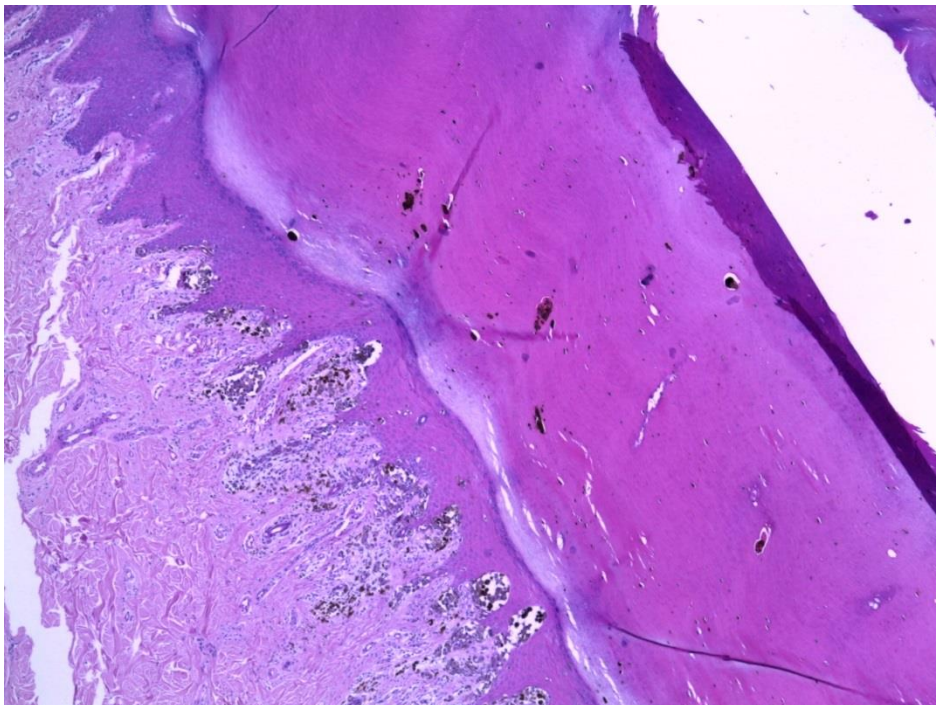


Foto 17. Islotes de pigmento melánico en queratina de piel acral

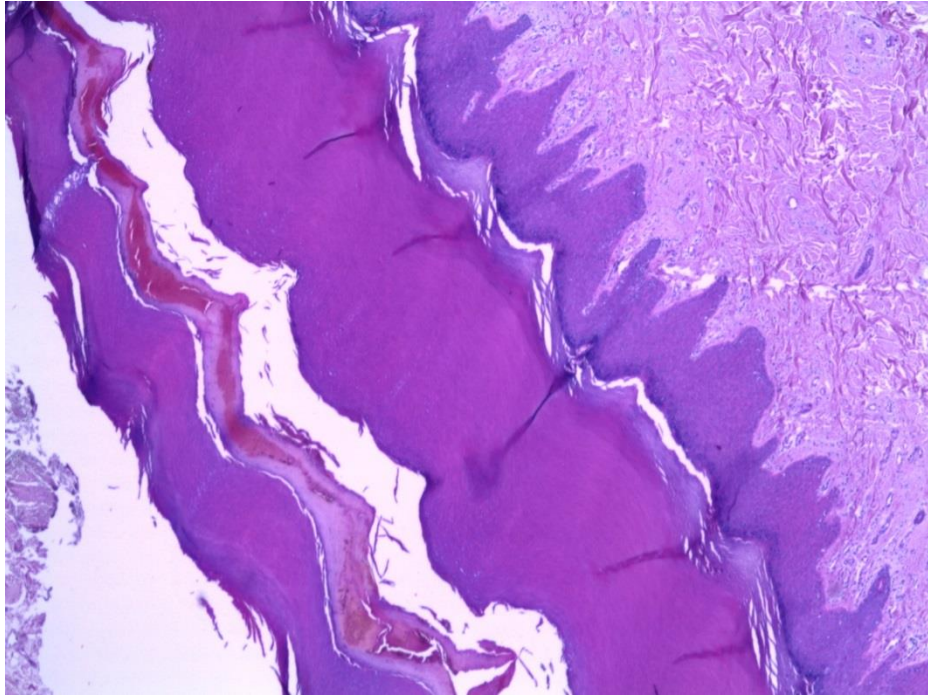


Foto 18. Acumulación hemática entre la capa córnea, diagnóstico diferencial de lesiones pigmentadas acrales

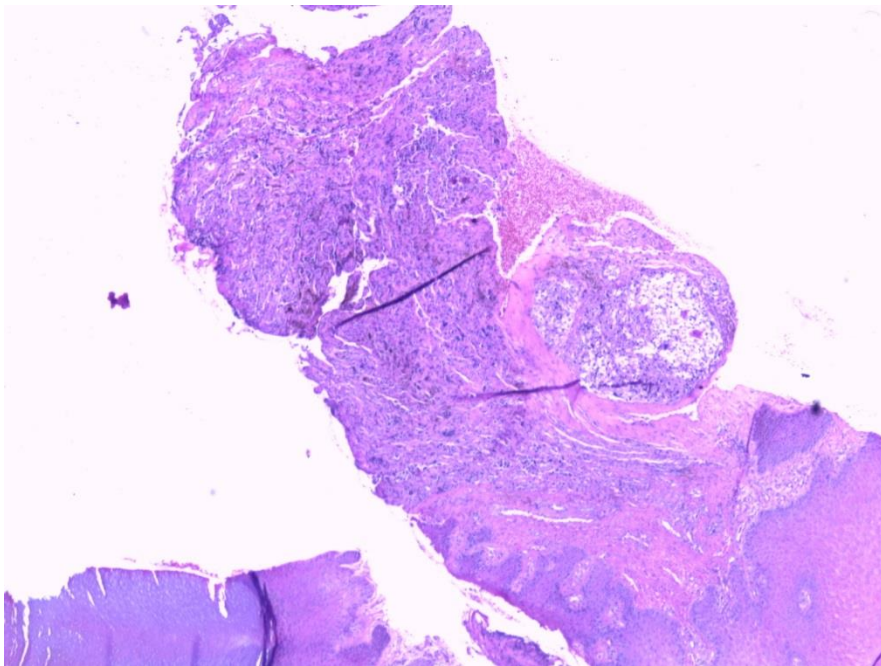


Foto 19. Muestra no valorable, no se evidencia diferenciación de las capas de la piel

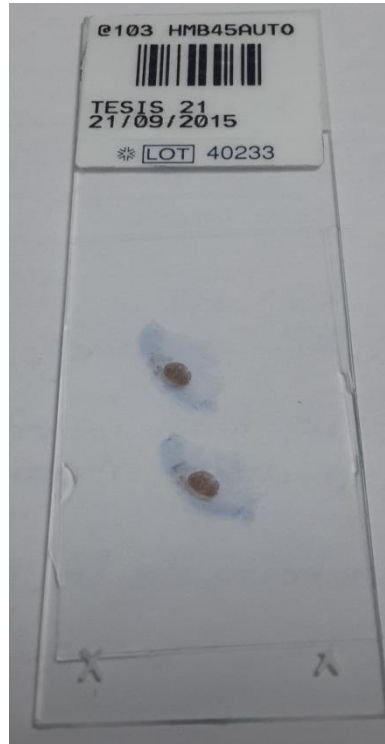


Foto 20. Delimitación macroscópica tumoral con el marcador inmunohistoquímico HMB-45

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para tinción inmunohistoquímica manual y automatizado de Roche®



ultraView™ Universal DAB Detection Kit

Referencia 760-500

INDICACIONES Y USO

Uso previsto

Este kit de detección es para uso de diagnóstico *in vitro*.

El ultraView Universal DAB Detection Kit de Ventana Medical Systems (Ventana) es un sistema indirecto y desprovisto de biotina, para detectar IgG de ratón, IgM de ratón y anticuerpos primarios de conejo. El kit está pensado para identificar, mediante métodos inmunohistoquímicos (IHQ), dianas en cortes de tejido fijados con formol y embebidos en parafina y congelados, que se han teñido en los módulos de tinción automatizados NexES® y BenchMark® Series de Ventana. La interpretación clínica de cualquier tinción o la ausencia de tinción deben complementarse con estudios morfológicos y con la evaluación de los controles apropiados. La evaluación la debe realizar un anatomopatólogo cualificado, en el contexto de la historia clínica del paciente y de otras pruebas diagnósticas.

Resumen y explicación

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica utilizada en laboratorios con fines de diagnóstico. El concepto fundamental de la IHQ es la localización de antígenos en cortes de tejido utilizando anticuerpos primarios específicos. Una vez que se ha producido la unión del antígeno y el anticuerpo, ésta debe visualizarse con una reacción coloreada visible con un microscopio óptico o con el uso de un microscopio de fluorescencia. El anticuerpo primario específico puede llevar la molécula que genera la señal, proporcionando la visualización directa de la unión. Como alternativa, los métodos indirectos de visualización necesitan pasos adicionales para localizar el anticuerpo específico y generar una señal. Las técnicas más comunes de los métodos indirectos utilizan un anticuerpo secundario dirigido contra la especie del anticuerpo primario y una enzima con un sistema de sustrato cromógeno correspondiente. Esta combinación produce un precipitado coloreado en el lugar de la unión específica del anticuerpo. El ultraView Universal DAB Detection kit utiliza un método indirecto para visualizar los anticuerpos específicos unidos a los antígenos, mediante el depósito de un precipitado con color marrón.

Principios y procedimientos

El ultraView Universal DAB Detection Kit detecta anticuerpos primarios específicos de ratón y de conejo, unidos a un antígeno en cortes de tejido embebidos en parafina o congelados. El anticuerpo específico se localiza mediante un anticuerpo secundario marcado con una enzima. A continuación, se visualiza el complejo utilizando un producto enzimático que precipita.

El ultraView Universal DAB Detection Kit utiliza un cóctel de anticuerpos secundarios marcados con enzima que localizan el anticuerpo primario unido. A continuación, el complejo se visualiza con sustrato de peróxido de hidrógeno y cromógeno de tetrahidrocloruro de 3, 3'-diaminobencidina (DAB), que produce un precipitado de color marrón oscuro, fácilmente detectable mediante microscopía óptica. Cada paso se incuba durante un tiempo y a una temperatura precisas. Al final de cada paso de incubación, el módulo de tinción automatizado de Ventana lava los cortes para retirar el material no ligado y aplica un cubreobjetos líquido que minimiza la evaporación de los reactivos acuosos del portaobjetos.¹ Los resultados se interpretan utilizando un microscopio óptico y contribuyen al diagnóstico diferencial de los procesos fisiopatológicos, que pueden estar asociados o no a un antígeno concreto.

Consulte en el Manual del usuario del módulo de tinción automatizado de Ventana los detalles específicos del funcionamiento del instrumento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos suministrados

El ultraView Universal DAB Detection Kit incluye suficiente reactivo para 250 pruebas y contiene:

- 1 dispensador de 25 mL de Inhibitor; contiene solución de peróxido de hidrógeno al 3%
- 1 dispensador de 25 mL de Universal HRP Multimer; contiene cóctel de anticuerpos marcados con HRP (anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón, de cabra anti-IgM de ratón y de cabra anti-conejo) (<50 µg/mL) en una solución tampón que contiene proteínas con conservante ProClin® 300*

- 1 dispensador de 25 mL de DAB Chromogen; contiene tetrahidrocloruro de 0,2% 3, 3'-diaminobencidina en una solución estabilizadora patentada, con conservante patentado
- 1 dispensador de 25 mL de DAB H₂O₂; contiene peróxido de hidrógeno al 0,04%, en una solución tampón de fosfato

- 1 dispensador de 25 mL de Copper; contiene sulfato de cobre (5 g/l) en un tampón de acetato con conservante patentado

*Para obtener más información sobre conservantes, consultar la sección "Avisos y precauciones".

Reconstitución, mezcla, dilución y titulación

El kit de detección se ha optimizado para su uso en un módulo de tinción automatizado de Ventana. No se requiere la reconstitución, mezcla, dilución ni titulación de los reactivos del kit.

Una dilución posterior puede dar lugar a una pérdida de tinción del antígeno. El usuario debe verificar cualquier cambio que se produzca. Las diferencias de procesamiento del tejido y del procedimiento técnico del laboratorio del usuario pueden producir una variabilidad significativa de los resultados, necesiándose el uso periódico de controles (consultar la sección Procedimientos de control de calidad).

Materiales y reactivos necesarios y no suministrados

Los siguientes reactivos y materiales pueden ser necesarios para la tinción pero no se proporcionan:

1. Control de reactivo negativo (Negative Control Mouse Ig de Ventana (Ref. 760-2014), CONFIRMTM Negative Control Rabbit Ig (Ref. 760-1029))
2. Portaobjetos para microscopio Superfrost™ Plus (Ref. 48311-703 de VWR o equivalente)
3. Controles de tejido positivos y negativos (consultar el prospecto del anticuerpo para conocer los tipos recomendados)
4. Hornos de secado capaz de mantener una temperatura de 60 °C ± 5 °C
5. Etiquetas con código de barras (apropiadas para el control de reactivo negativo y para el anticuerpo primario a prueba)
6. Cubetas o baños de tinción
7. Cronómetro (capaz de medir intervalos de 2-10 minutos)
8. Xileno (grado histológico)
9. Alcohol reactivo o etanol (grado histológico)
 - Solución al 100%: alcohol reactivo o etanol sin diluir
 - Solución al 95%: mezclar 95 partes de etanol o alcohol reactivo con 5 partes de agua desionizada
 - Solución al 80%: mezclar 80 partes de etanol o alcohol reactivo con 20 partes de agua desionizada
10. Agua desionizada o destilada
11. Decloaking Chamber de Biocare Medical (Ref. DC2002) (módulos de tinción automatizados NexES IHC)*
12. Placas de tinción Tissue-Tek®*
13. Módulos de tinción automatizados NexES IHC y BenchMark Series
14. Anticuerpos primarios
15. Antibody Diluent de Ventana* (Ref. 251-018)
16. APK Wash (10X) de Ventana (Ref. 250-042) (módulos de tinción automatizados NexES IHC)
17. Liquid Coverslip™ (Low Temperature) de Ventana (Ref. 250-009) (módulos de tinción automatizados NexES IHC)
18. EZ Prep™ (10X) de Ventana (Ref. 950-102) (módulos de tinción automatizados BenchMark Series)
19. Reaction Buffer (10X) de Ventana (Ref. 950-300) (módulos de tinción automatizados BenchMark Series)
20. Liquid Coverslip (High Temperature) de Ventana (Ref. 650-010) (módulos de tinción automatizados BenchMark Series)
21. Cell Conditioning 1 (Pre-dilute) (Ref. 950-124) o Cell Conditioning 2 (Pre-dilute) (Ref. 950-123) de Ventana (módulos de tinción automatizados BenchMark Series)*
22. Protease 1 (Ref. 760-2018), Protease 2 (Ref. 760-2019), o Protease 3 (Ref. 760-2020) de Ventana*
23. Contratinción Hematoxylin de Ventana* (Ref. 760-2021)
24. Contratinción Hematoxylin II de Ventana* (Ref. 790-2208)
25. Bluing Reagent de Ventana* (Ref. 760-2037)
26. Medio de montaje permanente (PermMount®, Ref. SP15-500 de Fisher o equivalente)
27. Cubreobjetos (suficiente para cubrir tejidos como la ref. 48393-60 de VWR o equivalente)



- 28. Microscopio óptico (20-80X)
- 29. Toallitas absorbentes*
- 30. Cubreobjetos automatizado (como el cubreobjetos automatizado Tissue-Tek® SCA)

* Según sea necesario para las aplicaciones específicas.

Conservación y manipulación

Conservar entre 2 y 8 °C. No congelar. El usuario debe validar cualquier condición de almacenamiento que no sea una de las especificadas en el prospecto. Este kit de detección se puede utilizar inmediatamente después de retirarlo de la nevera.

Para garantizar una dispensación adecuada y la estabilidad de cada reactivo, tras cada proceso debe volverse a poner el tapón y almacenar el dispensador en el frigorífico, en posición vertical.

Todos los kit de detección tienen una fecha de caducidad. Los reactivos son estables hasta la fecha indicada en la etiqueta cuando se almacenan correctamente. No usar el kit de detección después de la fecha de caducidad.

No hay signos definitivos que indiquen la inestabilidad de este producto, por lo que los controles positivos y negativos deben analizarse simultáneamente con muestras desconocidas. Deberá contactar inmediatamente con el distribuidor local de Ventana si observa signos de inestabilidad del reactivo.

Extracción y preparación de la muestra para su análisis

Los tejidos fijados con formol y embebidos en parafina y los tejidos congelados son adecuados para su uso con el *uView* Universal DAB Detection Kit y con un módulo de tinción automatizado de Ventana (véase la sección Materiales y reactivos necesarios y no suministrados). El fijador de tejido recomendado es formol tamponado neutro al 10%.² Pueden obtenerse resultados variables como consecuencia de una fijación prolongada o de procesos especiales, como la descalcificación de las muestras de médula ósea.

Cada sección debe cortarse con el grosor apropiado (2-5 µ) para el anticuerpo primario utilizado y se pondrá en un portaobjetos de vidrio. Los portaobjetos que contienen el corte de tejido pueden homearse/calentarse durante al menos 2 horas (pero no más de 24 horas) en un horno a 60 °C ± 5 °C. El calentamiento del portaobjetos se emplea para secar el tejido después del montaje del portaobjetos y mejorar la adhesión del tejido al vidrio. El calentamiento prolongado del tejido podría disminuir la disponibilidad del antígeno. Consultar el prospecto del anticuerpo primario para identificar las limitaciones de calentamiento.

Los tejidos fijados y embebidos correctamente que expresan el antígeno se mantendrán estables al menos durante dos años si se conservan en un lugar fresco (de 15 °C a 25 °C). La Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) de 1988, 42CFR493.1259 (b) exige que "El laboratorio debe conservar los portaobjetos durante un plazo mínimo de diez años desde la fecha de examen y debe conservar los bloques de muestras durante un plazo mínimo de dos años desde la fecha de examen".

Los cortes congelados se deben cortar al grosor apropiado (4-5 µ) para el anticuerpo primario utilizado, recogerse en un portaobjetos de vidrio y colocarse inmediatamente en acetona fría (entre 4 °C y 8 °C) durante diez minutos. A continuación, los cortes se secan al aire durante un mínimo de 30 minutos, y preferiblemente toda la noche. Colocar la etiqueta de código de barras adecuada en portaobjetos secos.

Procedimiento manual para desparafinar

Este procedimiento es necesario si se utiliza el módulo de tinción automatizado NexES IHC o si no se selecciona la desparafinación en el módulo de tinción automatizado BenchMark Series:

1. Consultar en la sección Instrucciones de uso del Manual del usuario del módulo de tinción automatizado apropiado las instrucciones sobre cuándo etiquetar los portaobjetos con etiquetas con códigos de barras.
2. Sumergir los portaobjetos secuencialmente en 3 baños de xileno durante 5 ± 1 minutos cada vez.
3. Transferir los portaobjetos a etanol al 100% y sumergirlos secuencialmente en 2 baños de esta solución durante 3 ± 1 minutos cada vez.
4. Transferir los portaobjetos a etanol al 95% y sumergirlos en un baño de esta solución durante 3 ± 1 minutos.
5. Transferir los portaobjetos a etanol al 80% y sumergirlos en esta solución durante 3 ± 1 minutos.
6. Transferir los portaobjetos a un baño de agua desionizada o destilada y sumergirlos como mínimo 10 veces.
7. Transferir los portaobjetos a la solución APK Wash (1X) o a una solución tampón, según proceda. Para la solución APK Wash, los portaobjetos deben permanecer en esta solución hasta que se pueda realizar el proceso de tinción. En el caso de la solución tampón, los portaobjetos deben permanecer en esta solución hasta que se

pueda realizar el proceso de desenmascaramiento del antígeno. No dejar que los portaobjetos se sequen.

Los portaobjetos teñidos en los módulos de tinción automatizados BenchMark Series se pueden desparafinar en el instrumento. Si se selecciona esta opción, deben pegarse etiquetas de códigos de barras en los portaobjetos y colocarlos en el instrumento. Si no se selecciona esta opción, consultar la sección anterior de Procedimiento manual para desparafinar.

AVISOS Y PRECAUCIONES

Para diagnóstico *in vitro*:

1. Adoptar las precauciones adecuadas cuando se manipulen los reactivos. Usar guantes desechables cuando se manipulen materiales potencialmente carcinógenos o tóxicos (como, por ejemplo, xileno o formaldehído). No los utilice cerca de una llama abierta.
2. Evitar el contacto de los reactivos con los ojos y las mucosas. Si se produce el contacto con áreas sensibles, lavar con agua abundante.
3. Las muestras del paciente y todos los materiales en contacto con ellas deben tratarse como si fuesen materiales potencialmente infecciosos y desecharse con las precauciones adecuadas. Nunca pipetear con la boca.
4. Evitar la contaminación microbiana de los reactivos, ya que podrían producirse resultados incorrectos.
5. Los tiempos y las temperaturas de incubación que no sean los que se especifican pueden dar resultados erróneos. El usuario debe validar cualquier cambio que se produzca.
6. La dilución de los reactivos es la óptima y una dilución posterior puede dar lugar a la pérdida de tinción. El usuario debe validar cualquier cambio que se produzca. No mezcle dispensadores de reactivos de varios lotes del producto.
7. Los síntomas de sobreexposición a ProClin® 300 incluyen irritación de la piel y los ojos e irritación de las mucosas y las vías respiratorias altas. La concentración de ProClin® 300 en este producto es igual o inferior al 0,05% y no cumple los criterios OSHA (Occupational Safety & Health Administration, Oficina de seguridad y salud en el Trabajo, EE.UU.) de sustancia peligrosa. En personas sensibles, es posible la aparición de reacciones alérgicas sistémicas. Los conservantes y los estabilizadores patentados no cumplen los criterios OSHA de sustancia peligrosa.
8. Posible carcinógeno: El National Toxicology Program (EE.UU.) ha incluido la bendidina, un compuesto estrechamente relacionado con el tetrahidrocloruro de 3, 3'-diaminobendidina (DAB), como un carcinógeno humano conocido.
9. Las formas concentradas de propilenglicol se han asociado con efectos teratogénos en animales de laboratorio. Utilizar guantes desechables y tomar precauciones razonables al manipularlo.
10. Consultar a las autoridades locales o nacionales sobre el método recomendado de eliminación.

INSTRUCCIONES DE USO

Procedimiento detallado

El *uView* Universal DAB Detection Kit de Ventana se ha desarrollado para su uso con un módulo de tinción automatizado de Ventana, junto con los anticuerpos primarios de Ventana y sus accesorios. Los parámetros de los procedimientos automatizados se pueden mostrar, imprimir y corregir de acuerdo con el procedimiento del Manual del usuario del módulo de tinción automatizado individual. Otros parámetros operativos de los módulos de tinción automatizados vienen configurados de fábrica.

Los procedimientos de tinción en los módulos de tinción automatizados de Ventana son los siguientes. Pueden consultarse instrucciones más detalladas y opciones de protocolo adicionales en el Manual del usuario.

El que una muestra necesite desenmascaramiento del antígeno o no, depende del anticuerpo. Para más información, compruebe el prospecto del anticuerpo.

Módulos de tinción automatizados NexES IHC

Si se requiere desenmascaramiento manual del antígeno:

1. Desparafinar los portaobjetos con xilenos y etanoles hasta agua destilada y un tampón apropiado (según se indica en el prospecto del anticuerpo). Realizar el procedimiento de desenmascaramiento antigénico (según se indica en el prospecto del anticuerpo) y transferir los portaobjetos a la solución APK Wash (1X).
2. Poner el anticuerpo primario, los dispensadores del kit de detección adecuado y los reactivos accesorios necesarios en la bandeja de reactivos y colocarla en el módulo de tinción automatizado. Comprobar los líquidos a granel y los residuos.
3. Dejar secar el extremo pintado del portaobjetos y pegar una etiqueta de código de barras adecuada al protocolo de anticuerpo a realizar.



4. Poner los portaobjetos desparafinados, con antígeno desmascarado y etiquetados procedentes de la solución APK Wash (1X) en el módulo de tinción automatizado NexES IHC. Los portaobjetos deben permanecer en esta solución hasta que se pueda realizar el proceso de tinción.

Módulos de tinción automatizados NexES IHC y procedimiento manual

Si no se requiere el desmascaramiento del antígeno:

1. Colocar las etiquetas de códigos de barras en el portaobjetos. Desparafinar los portaobjetos con xilenos y etanoles hasta agua y, a continuación, a solución APK Wash (1X).
2. Poner el anticuerpo primario, los dispensadores del kit de detección adecuado y los reactivos accesorios necesarios en la bandeja de reactivos y colocarla en el módulo de tinción automatizado. Comprobar los líquidos a granel y los residuos.
3. Poner los portaobjetos desparafinados y etiquetados procedentes de la solución APK Wash (1X) en el módulo de tinción automatizado NexES IHC. Los portaobjetos deben permanecer en esta solución hasta que se pueda realizar el proceso de tinción.

Módulos de tinción automatizados BenchMark Series

1. Pegar una etiqueta con el código de barras adecuado al protocolo de anticuerpo primario a realizar.
2. Poner el anticuerpo primario, los dispensadores del kit de detección adecuados y los reactivos accesorios necesarios en la bandeja de reactivos y colocarla en el módulo de tinción automatizado. Comprobar los líquidos a granel y los residuos.
3. Poner los portaobjetos en el módulo de tinción automatizado.

Para todos los instrumentos

1. Comenzar el proceso de tinción.
2. Cuando finalice el proceso, sacar los portaobjetos del módulo de tinción automatizado.
3. Lavar con un detergente suave para vajillas para eliminar la solución cubreobjetos; deshidratar, limpiar y cubrir con un medio de montaje permanente, siguiendo el proceso habitual.
4. Los portaobjetos teñidos deben leerse de dos a tres días después de la tinción y son estables al menos durante dos años, si se conservan adecuadamente a temperatura ambiente (de 15 a 25 °C).

Procedimientos de control de calidad

Control de tejido positivo

Debe procesarse un control de tejido positivo cada vez que se realice el procedimiento de tinción. Para confirmar que el anticuerpo se ha aplicado y que el instrumento funciona correctamente se utilizan los componentes tisulares que muestran una tinción positiva. Este tejido puede contener células o componentes de tejido que se tiñan tanto positiva como negativamente y sirven como tejidos de control positivo y negativo a la vez. Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. Estos tejidos pueden controlar todos los pasos del procedimiento, desde la preparación del tejido a su tinción. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio permitirá el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido.

La práctica óptima de laboratorio se distingue por incluir una sección histológica de control positivo junto al tejido del paciente. Esto permite detectar fácilmente errores de aplicación del anticuerpo primario o de otros reactivos de importancia crítica a la muestra de paciente en análisis. Se recomienda además escoger los controles positivos basándose en su expresión de antígeno. Se sugiere el uso de controles con bajos niveles de expresión de antígeno para evitar la obtención de resultados falsos negativos debido a una sensibilidad insuficiente.

Un tejido que tiene una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar los niveles menores de degradación del reactivo.

Los controles de tejido positivos conocidos sólo deben usarse para controlar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y de los reactivos de la prueba, no como ayuda para establecer un diagnóstico específico en las muestras del paciente. Si los controles de tejido positivos no muestran una tinción positiva, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de tejido negativo

El mismo tejido que se usa como control de tejido positivo puede usarse como control de tejido negativo. La variedad de tipos celulares presente en la mayoría de los cortes de tejido ofrece zonas para un control negativo interno, pero el usuario debe confirmarlo. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionan una indicación de tinción de fondo. Si se produce una tinción específica en

las áreas de control de tejido negativo, los resultados de las muestras del paciente deben considerarse no válidos.

Discrepancias no explicadas

Las discrepancias no explicadas de los controles se deben comunicar inmediatamente al distribuidor local de Ventana. Si los resultados del control de calidad no cumplen las especificaciones, los resultados del paciente no son válidos. Si aparecen discrepancias, consultar la sección Resolución de problemas de este prospecto. Identificar y corregir el problema y, a continuación, repetir las muestras del paciente.

Control de reactivo negativo

Para facilitar la interpretación de los resultados, debe procesarse un control de reactivo negativo con cada muestra. El control de reactivo negativo se usa en lugar del anticuerpo primario para evaluar la tinción inespecífica. El portaobjetos debe teñirse con Negative Control Mouse Ig, CONFIRM Negative Control Rabbit Ig o Rabbit Negative Control, según proceda. Si se usa un control de reactivo negativo distinto, diluir hasta la misma concentración que el anticuerpo/antisuero primario con Antibody Diluent de Ventana. El diluyente solo se puede usar como una alternativa a los controles de reactivo negativo descritos previamente. El periodo de incubación del control de reactivo negativo debe ser igual al del anticuerpo primario.

Cuando se usan paneles de varios anticuerpos en cortes seriados, un control de reactivo negativo en uno de los portaobjetos puede servir como control negativo o de la tinción de fondo inespecífica para los otros anticuerpos.

Verificación del ensayo

Antes del uso inicial de un anticuerpo primario o sistema de tinción en un procedimiento diagnóstico, se debe verificar la especificidad del anticuerpo primario estudiándolo en una serie de tejidos con características de comportamiento conocidas ante la inmunohistoquímica representando a tejidos positivos y negativos conocidos (consultar los Procedimientos de control de calidad expuestos en el prospecto del anticuerpo primario y las recomendaciones de Control de Calidad del College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist³ o la CLSI Approved Guideline⁴, o ambos documentos). Estos procedimientos de control de calidad deben repetirse con cada nuevo lote de anticuerpo o siempre que se modifiquen los parámetros del procedimiento.

Interpretación de los resultados

El *ultraView* Universal DAB Detection Kit de Ventana provoca un producto de reacción de color marrón oscuro que precipita en las zonas donde se encuentra el antígeno, localizadas por el anticuerpo primario. Un anatomopatólogo con experiencia en procedimientos inmunohistoquímicos debe evaluar los controles y calificar el producto teñido antes de interpretar los resultados. En primer lugar, se debe observar la tinción de los controles negativos y comparar estos resultados con el material teñido para verificar que la señal generada no es la causa de interacciones inespecíficas.

Control de tejido positivo

El control de tejido positivo teñido debe examinarse antes de afirmar que todos los reactivos funcionan correctamente. La presencia de un producto de reacción con el color apropiado dentro de las células diana indica una reactividad positiva. Dependiendo de la duración de la incubación y de la concentración de hematoxilina utilizada, la contratinción provocará una coloración entre azul pálido y azul oscuro de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.

Si el control de tejido positivo no muestra una tinción positiva, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control de tejido negativo

El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar que el anticuerpo primario marca específicamente el antígeno diana. La ausencia de una tinción específica del control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con células o componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados de las muestras del paciente se deben considerar no válidos.

La tinción inespecífica, cuando aparece, tiene un aspecto difuso. Esporádicamente, también se puede observar una ligera tinción del tejido conjuntivo en los cortes de tejidos fijados excesivamente con formol. Para interpretar los resultados de la tinción deben usarse células intactas. A menudo, las células necróticas o degeneradas se tiñen inespecíficamente.



Tejido del paciente

Las muestras del paciente deben examinarse en último lugar. La intensidad de la tinción positiva debe evaluarse en el contexto de la tinción de fondo inespecífica del control de reactivo negativo. Como sucede con todas las pruebas inmunohistoquímicas, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se detectó y no que el antígeno esté ausente de las células o los tejidos estudiados. Si es necesario, utilizar un panel de anticuerpos para facilitar la identificación de falsos negativos. También debe examinarse la morfología de cada muestra de tejido utilizando un corte teñido con hematoxilina y eosina cuando se interpreta el resultado de una prueba de inmunohistoquímica. Un anatomopatólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

LIMITACIONES

Limitaciones generales

1. La inmunohistoquímica es un proceso diagnóstico de varios pasos que requiere una formación especializada en la selección de los reactivos y tejidos apropiados, la fijación, el procesamiento, la preparación del portaobjetos para inmunohistoquímica y la interpretación de los resultados de tinción.
2. La tinción de los tejidos depende de la manipulación y el procesamiento de los mismos antes de la tinción. La fijación, la congelación, la descongelación, el lavado, el secado, el calentado o el corte inadecuados o la contaminación con otros tejidos o líquidos puede producir artefactos, bloqueo del anticuerpo o falsos negativos. Pueden obtenerse resultados incoherentes como consecuencia de las variaciones en los métodos de fijación e inclusión o por las irregularidades inherentes del propio tejido.
3. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados.
4. La interpretación clínica de una tinción positiva, o de su ausencia, debe evaluarse en el contexto de la historia clínica, la morfología y otros criterios histopatológicos. La interpretación clínica de cualquier tinción, o la ausencia de tinción, debe completarse con los estudios morfológicos y controles adecuados, además de otras pruebas diagnósticas. Es responsabilidad de un anatomopatólogo cualificado familiarizarse con los anticuerpos, reactivos y métodos usados para interpretar una preparación teñida. La tinción debe realizarse en un laboratorio certificado, con la supervisión de un anatomopatólogo responsable de la revisión de los portaobjetos teñidos y de la verificación de la idoneidad de los controles negativos y positivos.
5. Ventana suministra reactivos a una dilución óptima para su uso, siempre que se sigan las instrucciones proporcionadas. Cualquier desviación de los procedimientos recomendados del método puede invalidar los resultados esperados. Se deben utilizar y documentar los controles apropiados. Los usuarios que se desvían de los procedimientos recomendados del método deben aceptar su responsabilidad en la interpretación de los resultados del paciente en esas circunstancias.
6. Los reactivos pueden mostrar reacciones inesperadas en tejidos no estudiados previamente. No es posible excluir totalmente la posibilidad de reacciones inesperadas incluso en grupos de tejido estudiados debido a la variabilidad biológica de la expresión del antígeno en neoplasias u otros tejidos patológicos.⁵ Contacte con el distribuidor local de Ventana en caso de reacciones inesperadas.
7. Los tejidos de personas infectadas por el virus de la hepatitis B y que contienen el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) pueden mostrar una tinción inespecífica con peroxidasa de rábano.⁶
8. Cuando se usa en pasos de bloqueo, el suero normal de la misma fuente animal usada como antisuero secundario puede provocar falsos negativos o falsos positivos debido a autoanticuerpos o anticuerpos naturales.
9. Pueden verse resultados falsos positivos debido a la unión de proteínas o productos de reacción del sustrato por mecanismos no inmunitarios. También pueden deberse a la actividad de la pseudoperoxidasa (hematíes) o a la actividad de la peroxidasa endógena (citocromo C).⁷
10. Como sucede con todas las pruebas de la inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno no se detectó y no que el antígeno estuviese ausente de las células o el tejido estudiados.

Limitaciones específicas

1. Cada paso del procedimiento del kit de detección se ha optimizado en los módulos de tinción automatizados de Ventana y está configurado de fábrica. Debido a variaciones en la fijación y el procesamiento del tejido, puede ser necesario aumentar o disminuir el tiempo de incubación del anticuerpo primario en muestras individuales. Para más información sobre las variables de fijación, consultar "Immunohistochemistry Principles and Advances"⁸ o "Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist".⁹

2. El kit de detección, cuando se usa con los anticuerpos primarios de Ventana y sus accesorios, detecta los antígenos que sobreviven al proceso habitual de fijación con formol, procesado y corte del tejido. Los usuarios que se desvían de los procedimientos recomendados del método son responsables de la interpretación y validación de los resultados del paciente.

RESUMEN DE LOS RESULTADOS ESPERADOS

Estudios de reproducibilidad

La prueba de reproducibilidad del *ultraView* Universal DAB Detection Kit se realizó mediante la tinción de cortes seriados de 3 tejidos fijados con formol tamponado neutro, embebidos en parafina, usando 3 anticuerpos primarios: un IgG de ratón (anti-Ki67) teñido en un carcinoma mamario, un IGM de ratón (anti-CD15) teñido en un xenoinjerto de un linfoma de Hodgkin y un IgG de conejo (anti-S100) teñido en un melanoma, utilizando los módulos de tinción automatizados BenchMark, BenchMark XT y NexES IHC. Todos los anticuerpos primarios se incubaron durante 16 minutos y se hizo una contratinción de los portaobjetos con Hematoxylin II y, a continuación, con Bluing Reagent. Un lector de portaobjetos cualificado comparó entre sí y puntuó todos los portaobjetos teñidos con un anticuerpo primario para determinar la idoneidad y la intensidad de la tinción.

1. Se realizaron procesos de tinción para la reproducibilidad intraanálisis (el mismo anticuerpo primario teñido en una plataforma comparada) 1 al día, en 3 días distintos utilizando 3 módulos de tinción distintos: BenchMark, BenchMark XT y NexES IHC para un total de 9 procesos de tinción. La reproducibilidad intraanálisis para el BenchMark XT fue de un 100% (30 de 30 portaobjetos por anticuerpo primario por análisis; un total de 90 portaobjetos teñidos por anticuerpo en los 3 análisis) y de un 100% (20 de 20 portaobjetos por anticuerpo primario por análisis; un total de 60 portaobjetos por anticuerpo en los 3 procesos para cada plataforma: BenchMark y NexES IHC).
2. La reproducibilidad interanálisis se calculó a partir del número de portaobjetos teñidos en 3 procesos por tipo de módulo de tinción. Se realizaron procesos de tinción, 1 al día, en 3 días distintos, con 3 módulos de tinción distintos: BenchMark, BenchMark XT y NexES IHC. La reproducibilidad interanálisis para el BenchMark XT fue de un 100% (90 de 90 portaobjetos, 30 portaobjetos por anticuerpo primario en 3 análisis diferentes) y de un 100% (60 de 60 portaobjetos, 20 portaobjetos de cada anticuerpo primario en 3 análisis diferentes para cada plataforma) para el BenchMark y el NexES IHC.
3. La reproducibilidad interinstrumental se calculó a partir del número de portaobjetos teñidos en 9 procesos en todos los tipos de módulos de tinción. Se realizaron procesos de tinción, 1 al día, en 3 días distintos, con 3 módulos de tinción distintos: BenchMark, BenchMark XT y NexES IHC. La reproducibilidad interinstrumental del *ultraView* Universal DAB Detection Kit es del 100% (210 de los 210 portaobjetos teñidos; los portaobjetos evaluados incluían los 3 anticuerpos primarios).

También se determinó el rendimiento del *ultraView* Universal DAB Detection Kit mediante la tinción de 53 tejidos normales y patológicos, fijados con formol tamponado neutro, usando 20 anticuerpos primarios. Los anticuerpos seleccionados representaron especies e isotipos de uso frecuente para la realización de análisis inmunohistoquímicos (IHC). En el 100% de los casos analizados (53 de 53 casos teñidos), el *ultraView* Universal DAB Detection Kit reconoció el anticuerpo primario y proporcionó la utilidad clínica adecuada, determinada por el lector de portaobjetos cualificado.

RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS

1. Si el control positivo tiene una tinción más débil de lo esperado, se deben comprobar los demás controles positivos procesados simultáneamente para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios habituales.
2. Si el control positivo es negativo, deberá comprobarse que el portaobjetos tiene la etiqueta de código de barras adecuada. Si el portaobjetos se ha etiquetado correctamente, deben comprobarse los demás controles positivos procesados simultáneamente para determinar si se debe al anticuerpo primario o a uno de los reactivos secundarios habituales. Los tejidos pueden haberse obtenido, fijado o desparafinado incorrectamente. Debe seguirse un procedimiento adecuado para la obtención, conservación y fijación.
3. Si no se ha eliminado toda la parafina, puede que no se produzca la tinción. Se debe repetir el procedimiento de desparafinación.
4. Si la tinción específica del anticuerpo es demasiado intensa, el proceso debe repetirse acortando el tiempo de incubación del anticuerpo primario en intervalos de cuatro minutos hasta que se alcance la intensidad deseada de la tinción.
5. Si los cortes de tejido se desprenden del portaobjetos durante el lavado, comprobar que los portaobjetos están cargados positivamente.



6. Consultar las medidas correctoras en la sección Procedimiento detallado, el Manual del usuario del módulo de tinción automatizado o póngase en contacto con el distribuidor local de Ventana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Elias JM, Gown AM, Nakamura RM, Wilbur DC, Herman GE, Jaffe ES, Battifora H, Brigati DJ. Quality control in immunohistochemistry. Report of a workshop sponsored by the Biological Stain Commission. *Am J Clin Pathol* 92(6): 836-843, 1989.
2. Sheehan DC, Hrapchak BB. Theory and practice of histotechnology, 2nd Edition. The C.V. Mosby Company, St. Louis, 1980.
3. College of American Pathologists Laboratory Accreditation Program, Anatomic Pathology Checklist, 2001.
4. CLSI. Quality Assurance for Immunocytochemistry: Approved Guideline. CLSI document MM4-A. (ISBN 1-56238-396-5). CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, PA 19087-1898 USA, 1999.
5. Herman GE, Elfont EA. The taming of immunohistochemistry: the new era of quality control. *Biotech Histochem* 66(4): 194-199, 1991.
6. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen. A possible source of error in immunohistochemistry. *Am J Clin Pathol* 73(5): 626-32, 1980.
7. Nadjj M, Morales AR. Immunoperoxidase: part 1. The technique and its pitfalls. *Lab Med* 14: 767, 1983.
8. Roche PC, Hsi ED. Immunohistochemistry-Principles and Advances. Manual of Clinical Laboratory Immunology, 6th edition. (NR Rose Ed.) ASM Press, 2002.
9. Taylor C, Cote RJ. Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist, 2nd Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1986.

PROPIEDAD INTELECTUAL

CONFIRM™, EZ Prep™, *ultraView*™ y Liquid Coverslip™ son marcas comerciales de Ventana Medical Systems, Inc.; BenchMark®, NexES® y Ventana® son marcas comerciales registradas de Ventana Medical Systems, Inc.

ProClin® es una marca comercial registrada de Rohm & Haas Company.

Permount® es una marca comercial registrada de Fisher Scientific Company.


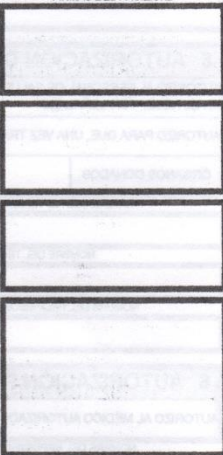
Tissue Tek® es una marca comercial registrada de Sakura Finetek.

Superfrost™ Plus es una marca comercial de Erie Scientific Company.

Ventana concede al comprador una licencia de un solo uso al amparo de las siguientes patentes: Patentes de los EE.UU. N° 6,045,759; 6,192,945; 6,416,713; 6,945,128 y las correspondientes en el extranjero.

El *ultraView* Universal DAB Detection Kit está cubierto por patentes en trámite.


Anexo 2. Consentimiento Informado del CEPI

INSTITUCIÓN DEL SISTEMA		UNIDAD OPERATIVA		COD. UO	COD. LOCALIZACIÓN			NUMERO DE HISTORIA CLÍNICA	
					PARROQUIA	CANTÓN	PROVINCIA		
APELLIDO PATERNO	APELLIDO MATERNO	NOMBRES		SERVICIO	SALA	CAMA	FECHA	HORA	
				DERMATOLOGIA					
TODA LA INFORMACIÓN ENTREGADA POR LOS PROFESIONALES AL PACIENTE SE HARÁ EN EL ÁMBITO DE LA CONFIDENCIALIDAD									
1 INFORMACIÓN ENTREGADA POR EL PROFESIONAL TRATANTE SOBRE EL TRATAMIENTO									
PROPÓSITOS					TERAPIA Y PROCEDIMIENTOS PROPUESTOS				
RESULTADOS ESPERADOS					RIESGOS DE COMPLICACIONES CLÍNICAS				
NOMBRE DEL PROFESIONAL TRATANTE		ESPECIALIDAD		TELÉFONO	CÓDIGO		FIRMA		
2 INFORMACIÓN ENTREGADA POR EL CIRUJANO SOBRE LA INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA									
PROPÓSITOS					INTERVENCIONES QUIRÚRGICAS PROPUESTAS				
RESULTADOS ESPERADOS					RIESGO DE COMPLICACIONES QUIRÚRGICAS				
NOMBRE DEL CIRUJANO		ESPECIALIDAD		TELÉFONO	CÓDIGO		FIRMA		
3 INFORMACIÓN ENTREGADA POR EL ANESTESIOLOGO SOBRE LA ANESTESIA									
PROPÓSITOS					ANESTESIA PROPUESTA				
RESULTADOS ESPERADOS					RIESGOS DE COMPLICACIONES ANESTÉSICAS				
NOMBRE DEL ANESTESIOLOGO		ESPECIALIDAD		TELÉFONO	CÓDIGO		FIRMA		
4 CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL PACIENTE									
							FIRMAS DEL PACIENTE		
A EL PROFESIONAL TRATANTE ME HA INFORMADO SATISFACTORIAMENTE ACERCA DE LOS MOTIVOS Y PROPOSITOS DEL TRATAMIENTO PLANIFICADO PARA MI ENFERMEDAD									
B EL PROFESIONAL TRATANTE ME HA EXPLICADO ADECUADAMENTE LAS ACTIVIDADES ESENCIALES QUE SE REALIZARÁN DURANTE EL TRATAMIENTO DE MI ENFERMEDAD									
C CONSENTIO A QUE SE REALICEN LAS INTERVENCIONES QUIRÚRGICAS, PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS Y TRATAMIENTOS NECESARIOS PARA MI ENFERMEDAD									
D CONSENTIO A QUE ME ADMINISTREN LA ANESTESIA PROPUESTA									
E HE ENTENDIDO BIEN QUE EXISTE GARANTÍA DE LA CALIDAD DE LOS MEDIOS UTILIZADOS PARA EL TRATAMIENTO, PERO NO ACERCA DE LOS RESULTADOS									
F HE COMPRENDIDO PLENAMENTE LOS BENEFICIOS Y LOS RIESGOS DE COMPLICACIONES DERIVADAS DEL TRATAMIENTO									
G EL PROFESIONAL TRATANTE ME HA INFORMADO QUE EXISTE GARANTÍA DE RESPETO A MI INTIMIDAD, A MIS CREENCIAS RELIGIOSAS Y A LA CONFIDENCIALIDAD DE LA INFORMACIÓN (INCLUSIVE EN EL CASO DE VIH/SIDA)									
H HE COMPRENDIDO QUE TENGO EL DERECHO DE ANULAR ESTE CONSENTIMIENTO INFORMADO EN EL MOMENTO QUE YO LO CONSIDERE NECESARIO.									
I DECLARO QUE HE ENTREGADO AL PROFESIONAL TRATANTE INFORMACIÓN COMPLETA Y FIDELIDAD SOBRE LOS ANTECEDENTES PERSONALES Y FAMILIARES DE MI ESTADO DE SALUD. ESTOY CONCIENTE DE QUE MIS OMISIONES O DISTORSIONES DELIBERADAS DE LOS HECHOS PUEDEN AFECTAR LOS RESULTADOS DEL TRATAMIENTO									
5 CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL REPRESENTANTE LEGAL									
COMO RESPONSABLE LEGAL DEL PACIENTE, QUE HA SIDO CONSIDERADO POR AHORA IMPOSIBILITADO PARA DECIDIR EN FORMA AUTÓNOMA SU CONSENTIMIENTO, AUTORIZO LA REALIZACIÓN DEL TRATAMIENTO SEGÚN LA INFORMACIÓN ENTREGADA POR LOS PROFESIONALES DE LA SALUD EN ESTE DOCUMENTO.									
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL		PARENTESCO		TELÉFONO	CÉDULA DE CIUDADANÍA		FIRMA		

SNS-MSP / HCU-form.024 / 2008

CONSENTIMIENTO INFORMADO

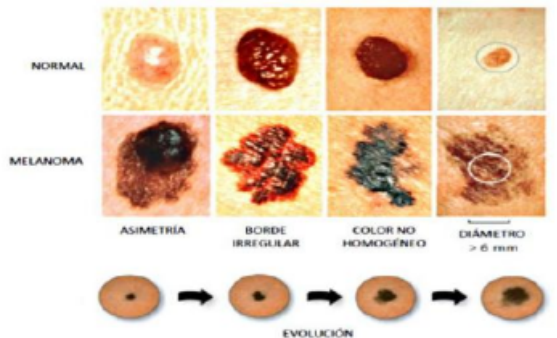
Continuación anexo 2

INSTITUCIÓN DEL SISTEMA		UNIDAD OPERATIVA	COD. UO	COD. LOCALIZACIÓN			NUMERO DE HISTORIA CLÍNICA	
				PARROQUIA	CANTÓN	PROVINCIA		
APELLIDO PATERNO		APELLIDO MATERNO	NOMBRES	SERVICIO	SALA	CAMA	FECHA	HORA
				DERMATOLOGIA				
MARCAR "X" EN LA CELDA QUE CORRESPONDA								
1 AUTORIZACIÓN PARA CIRUGÍA, TRATAMIENTO CLÍNICO O PROCEDIMIENTO DIAGNÓSTICO								
AUTORIZO AL PROFESIONAL TRATANTE DE ESTE ESTABLECIMIENTO DE SALUD PARA REALIZAR LAS OPERACIONES QUIRÚRGICAS, PROCEDIMIENTOS DIAGNÓSTICOS Y TRATAMIENTOS CLÍNICOS PROPUESTOS Y NECESARIOS PARA EL TRATAMIENTO DE MI ENFERMEDAD								
NOMBRE DEL PACIENTE		TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA				
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL O TESTIGO		PARENTESCO	TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA			
MARCAR "X" EN LA CELDA QUE CORRESPONDA								
2 EXONERACIÓN DE RESPONSABILIDAD POR ABORTO								
DECLARO QUE NINGÚN PROFESIONAL O FUNCIONARIO DE ESTE ESTABLECIMIENTO DE SALUD HA REALIZADO PROCEDIMIENTOS PARA PROVOCAR ESTE ABORTO Y QUE INGRESO LIBRE Y VOLUNTARIAMENTE PARA RECIBIR EL TRATAMIENTO NECESARIO PARA MI ENFERMEDAD								
NOMBRE DEL PACIENTE		TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA				
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL O TESTIGO		PARENTESCO	TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA			
MARCAR "X" EN LA CELDA QUE CORRESPONDA								
3 EXONERACIÓN DE RESPONSABILIDAD POR ABANDONO DE HOSPITAL SIN AUTORIZACIÓN MÉDICA								
DECLARO QUE ME RETIRO VOLUNTARIAMENTE DE ESTE ESTABLECIMIENTO DE SALUD Y EXONERO AL PROFESIONAL TRATANTE Y AL PERSONAL ADMINISTRATIVO POR LOS RIESGOS A LA SALUD, QUE ME HAN ADVERTIDO CLARAMENTE								
NOMBRE DEL PACIENTE		TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA				
NOMBRE DEL TESTIGO		PARENTESCO	TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA			
NOMBRE DEL PROFESIONAL DE LA SALUD		TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA				
MARCAR "X" EN LA CELDA QUE CORRESPONDA								
4 RETIRO DE MENOR DE EDAD O PERSONA INCAPACITADA								
DECLARO QUE RETIRO AL PACIENTE DE ESTE ESTABLECIMIENTO DE SALUD, BAJO MI RESPONSABILIDAD DEBIDAMENTE CERTIFICADA, CON LA AUTORIZACIÓN MÉDICA CORRESPONDIENTE								
DECLARO QUE RETIRO AL PACIENTE DE ESTE ESTABLECIMIENTO, BAJO MI RESPONSABILIDAD Y SIN LA AUTORIZACIÓN DEL PROFESIONAL TRATANTE HE SIDO ADVERTIDO DE LAS CONSECUENCIAS DE ESTE ACTO NO AUTORIZADO Y ASUMO TODA LA RESPONSABILIDAD POR LAS CONSECUENCIAS NEGATIVAS								
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL		PARENTESCO	TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA			
NOMBRE DEL TESTIGO		PARENTESCO	TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA			
NOMBRE DEL MEDICO		TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA				
MARCAR "X" EN LA CELDA QUE CORRESPONDA								
5 AUTORIZACIÓN DE EXTRACCIÓN DE ÓRGANOS PARA DONACIÓN Y/O TRASPLANTE								
AUTORIZO AL PERSONAL DE SALUD DE ESTE ESTABLECIMIENTO PARA QUE EN VIDA SE ME EXTRAIGA EL O LOS ÓRGANOS CONVENIDOS, DONADOS PARA EL TRASPLANTE EN EL RECEPTOR SEÑALADO								
AUTORIZO PARA QUE, UNA VEZ TRANSCURRIDAS 48 HORAS DE MI MUERTE CEREBRAL, MIS ÓRGANOS SEAN EXTRAÍDOS PARA TRASPLANTE								
ÓRGANOS DONADOS	NOMBRE DE LOS RECEPTORES		TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA			
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL		PARENTESCO	TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA			
NOMBRE DEL TESTIGO		PARENTESCO	TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA			
NOMBRE DEL PROFESIONAL TRATANTE		TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA				
MARCAR "X" EN LA CELDA QUE CORRESPONDA								
6 AUTORIZACIÓN PARA NECROPSIA								
AUTORIZO AL MÉDICO AUTORIZADO DE ESTE HOSPITAL PARA QUE PRACTIQUE LA NECROPSIA AL CADÁVER DEL FALLECIDO								
NOMBRE DEL REPRESENTANTE LEGAL		PARENTESCO	TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA			
NOMBRE DEL TESTIGO		PARENTESCO	TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA			
NOMBRE DEL MEDICO		TELEFONO	CEDULA DE CIUDADANIA	FIRMA				

SNS-MSP / HCU-form.024 / 2008

AUTORIZACIÓN, EXONERACIÓN Y RETIRO

Anexo 3. Herramienta de Recopilación de datos para Melanoma.

DATOS DEMOGRÁFICOS																	
Nombres y Apellidos:		N° H. Clínica:															
Edad:		N° Biopsia:															
Sexo:		Fecha de Intervención Qx:															
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA LESIÓN																	
Localización:		Fototipo de Piel:															
REGLA A,B,C,D,E (Fitzpatrick)		Piel Ulcerada: Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>															
Asimetría:	Lesión Simétrica	ABCDE 															
	Lesión Asimétrica																
Bordes:	Bordes Regulares																
	Bordes Irregulares																
Color:	Café Claro																
	Café Oscuro																
	Negro																
	Azul																
	Rojo																
	Gris																
Diámetro:	Menor a 6mm																
(Valor en mm)	Mayor a 6mm																
Evolución:	Cambio de Tamaño																
	Cambio de Color																
	Cambio de Forma																
	Síntomas: Picor/Ardor																
	Dolor																
	Inflamación																
	Sangrado																
		<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;">Fototipo de piel</th> <th>Color de piel</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>I</td> <td>Blanca (deficiente en melanina)</td> </tr> <tr> <td>II</td> <td>Blanca (deficiente en melanina)</td> </tr> <tr> <td>III</td> <td>Blanca (con melanina suficiente)</td> </tr> <tr> <td>IV</td> <td>Café Clara (con melanina suficiente)</td> </tr> <tr> <td>V</td> <td>Café (con protección melánica)</td> </tr> <tr> <td>VI</td> <td>Café oscuro o negro (con protección melánica)</td> </tr> </tbody> </table>		Fototipo de piel	Color de piel	I	Blanca (deficiente en melanina)	II	Blanca (deficiente en melanina)	III	Blanca (con melanina suficiente)	IV	Café Clara (con melanina suficiente)	V	Café (con protección melánica)	VI	Café oscuro o negro (con protección melánica)
Fototipo de piel	Color de piel																
I	Blanca (deficiente en melanina)																
II	Blanca (deficiente en melanina)																
III	Blanca (con melanina suficiente)																
IV	Café Clara (con melanina suficiente)																
V	Café (con protección melánica)																
VI	Café oscuro o negro (con protección melánica)																
		Observaciones extras de la lesión:															
TOMA DE LA MUESTRA Y DATOS HISTOPATOLÓGICOS																	
Tipo de Biopsia:	Biopsia Escisional																
	Biopsia Incisional																
	Biopsia Punch																
	Afeitado																
	Re-escisión																
Márgenes de Resección:	Resección completa	Sí <input type="checkbox"/>	No <input type="checkbox"/>														
	Margen lateral más próximo a:																
(medido en mm)	Margen profundo a:	mm.															
Tipo Histológico:	Extensión Superficial																
	Nodular																
	Acro-Lentiginoso																
	Lentigo Maligno																
	Otros																
NIVELES DE CLARK																	
<table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tbody> <tr> <td style="width: 20%;">Nivel I</td> <td>Invasión limitada a la epidermis</td> </tr> <tr> <td>Nivel II</td> <td>Invasión parcial de la dermis papilar</td> </tr> <tr> <td>Nivel III</td> <td>Invasión total de la dermis papilar</td> </tr> <tr> <td>Nivel IV</td> <td>Expansión a la dermis reticular</td> </tr> <tr> <td>Nivel V</td> <td>Penetración a tejido celular subcutáneo</td> </tr> </tbody> </table>				Nivel I	Invasión limitada a la epidermis	Nivel II	Invasión parcial de la dermis papilar	Nivel III	Invasión total de la dermis papilar	Nivel IV	Expansión a la dermis reticular	Nivel V	Penetración a tejido celular subcutáneo				
Nivel I	Invasión limitada a la epidermis																
Nivel II	Invasión parcial de la dermis papilar																
Nivel III	Invasión total de la dermis papilar																
Nivel IV	Expansión a la dermis reticular																
Nivel V	Penetración a tejido celular subcutáneo																

		MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS			
Fase de Crecimiento:	Radial	<input type="checkbox"/>	Marcador S-100	Presente	<input type="checkbox"/>
	Vertical	<input type="checkbox"/>		Ausente	<input type="checkbox"/>
	Mixta	<input type="checkbox"/>		No valorable	<input type="checkbox"/>
Niveles de Clark:	Nivel I	<input type="checkbox"/>	Marcador MELAN-A	Presente	<input type="checkbox"/>
	Nivel II	<input type="checkbox"/>		Ausente	<input type="checkbox"/>
	Nivel III	<input type="checkbox"/>		No valorable	<input type="checkbox"/>
	Nivel IV	<input type="checkbox"/>	Marcador HMB-45	Presente	<input type="checkbox"/>
	Nivel V	<input type="checkbox"/>		Ausente	<input type="checkbox"/>
Índice de Breslow: (escribir aquí el valor en mm)	< 1 mm	<input type="checkbox"/>	No valorable	<input type="checkbox"/>	
	1,01 - 2 mm	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	
	2,01 - 4 mm	<input type="checkbox"/>	Ki67	Presente	<input type="checkbox"/>
	> 4 mm	<input type="checkbox"/>		Ausente	<input type="checkbox"/>
Ulceración:	Presente	<input type="checkbox"/>	No valorable	<input type="checkbox"/>	
	Ausente	<input type="checkbox"/>	Mitf	Presente	<input type="checkbox"/>
	No valorable	<input type="checkbox"/>		Ausente	<input type="checkbox"/>
Índice de Mitosis: (conteo por mm ²)	> 1 mm	<input type="checkbox"/>	No valorable	<input type="checkbox"/>	
	< 1 mm	<input type="checkbox"/>	Otro 1: _____ (Detalle el marcador usado aquí)	Presente	<input type="checkbox"/>
	No determinada	<input type="checkbox"/>		Ausente	<input type="checkbox"/>
Satelitosis: (nido >0.05mm a ≥0.3mm)	Presente	<input type="checkbox"/>	No valorable	<input type="checkbox"/>	
	Ausente	<input type="checkbox"/>	Otro 2: _____ (Detalle el marcador usado aquí)	Presente	<input type="checkbox"/>
	No valorable	<input type="checkbox"/>		Ausente	<input type="checkbox"/>
Infiltrado Inflamatorio:	Intenso	<input type="checkbox"/>	NOTAS: 		
	No intenso	<input type="checkbox"/>			
	Ausente	<input type="checkbox"/>			
Infiltrado Perineural:	Presente	<input type="checkbox"/>			
	Ausente	<input type="checkbox"/>			
	No valorable	<input type="checkbox"/>			
Invasión Vascular:	Presente	<input type="checkbox"/>			
	Ausente	<input type="checkbox"/>			
	No valorable	<input type="checkbox"/>			

Realizado por Dayana Pita y Karina Rosillo