

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**«Estudio genético y anatómico-clínico del
melanoma de extensión superficial»**

Autor: Francisco Juan Estrella Gil
Directores: Dr. D. Juan Cruz Cigudosa García
Dr. D. Antonio Noda Cabrera
Dr. D. Antonio Isaac Martín Llerrera
Dr. D^a. Marta García Dustinduy

**Departamento de Medicina Interna,
Dermatología y Psiquiatría**

Don JUAN CRUZ CIGUDOSA GARCIA, Doctor en Biología y
Facultativo Adjunto de la Sección de Citogenética del Hospital
Universitario de Canarias

Certifica:

Que Don Francisco Juan Estrella Gil, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado "Estudio Genético y Anatomo-Clinico del Melanoma de Extensión Superficial", el cual reúne las condiciones necesarias para ser presentado como tesis doctoral.



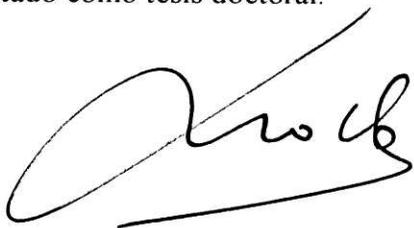
Juan Cruz Cigudosa García

La Laguna, Noviembre de 1999

Don ANTONIO NODA CABRERA, Profesor Titular de Dermatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna y Jefe Clínico del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Canarias

Certifica:

Que Don Francisco Juan Estrella Gil, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado "Estudio Genético y Anatómico-Clínico del Melanoma de Extensión Superficial ", el cual reúne las condiciones necesarias para ser presentado como tesis doctoral.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio Noda Cabrera', with a large, sweeping flourish at the end.

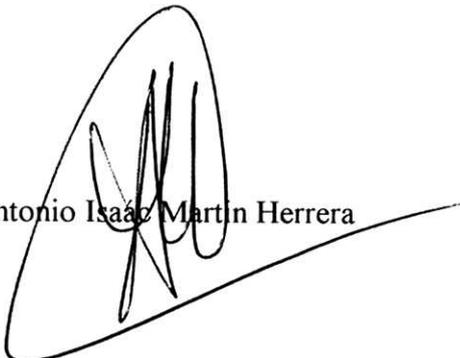
Antonio Noda Cabrera

La Laguna, Noviembre de 1999

Don ANTONIO ISAAC MARTIN HERRERA Catedrático de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna y Jefe del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Canarias

Certifica:

Que Don Francisco Juan Estrella Gil, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado "Estudio Genético y Anatómico-Clinico del Melanoma de Extensión Superficial", el cual reúne las condiciones necesarias para ser presentado como tesis doctoral.


Antonio Isaac Martín Herrera

La Laguna, Noviembre de 1999

Doña MARTA CARMEN GARCÍA BUSTINDUY, Profesora Titular de Dermatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de La Laguna y Facultativo Adjunto del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario de Canarias

Certifica:

Que Don Francisco Juan Estrella Gil, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado "Estudio Genético y Anatomo-Clínico del Melanoma de Extensión Superficial", el cual reúne las condiciones necesarias para ser presentado como tesis doctoral.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Marta Carmen García Bustinduy', with a stylized flourish at the end.

Marta Carmen García Bustinduy

La Laguna, Noviembre de 1999

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A Juan Cruz Cigudosa, porque, sin él, no hubiera sido posible este trabajo, por sus horas de dedicación, apoyo e interés para que todo saliera bien, y, sobre todo, por su amistad

A Antonio Martín Herrera, por su dirección y ejemplo profesional.

A Rafael García Montelongo, por su dedicación y educación en el mundo de la dermatología.

A Antonio Noda Cabrera, quien tiene toda mi gratitud, me formó, guió y ayudó en toda mi carrera profesional.

A Don Ginés Vivancos Gallegos (q.e.p.d.), por ser el ejemplo de maestro.

A José Luis García Miranda y Ana Otero, por su disposición, siempre positiva, ayuda y ejemplo de familia.

A todo el personal del Servicio de Anatomía Patológica y Genética, por sus horas de convivencia, la mayoría felices, así como la ayuda indispensable para la obtención del material necesario en cada momento. A Luisa, a Pilar, Tomás, Angeles, Montse, Fátima, Jenny y al pobre Manuel, para lo que le queda.

A todo el Servicio de Dermatología por su amistad y muestras de apoyo en la realización de este trabajo. A Rosalba, por su ejemplo profesional y humano. A Juan José, por ser el compañero de fatigas. A Marta, los años compartidos. A Luisa, Juani y Rosi por su colaboración. A Esther, Maria José, Raquel y Toni por su compañerismo. A Kiko, Miguel, Sara y Marina por su apoyo.

A mis amigos, en especial a Pili, que, además de su respaldo, dedicó muchas horas para que este trabajo tuviera los gusanitos en su sitio.

A mis padres por su aliento y, sobre todo, por darme el ser. A toda mi familia.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CANCER

La palabra cáncer se utiliza para describir un complejo y heterogéneo grupo de estados patológicos en el que las células proliferan desmesuradamente e invaden los tejidos vecinos (revisiones de Standbridge y Nowell, 1990 y Varmus y Weinberg , 1993).

El cáncer es una enfermedad de carácter genético, que se produce al ser eliminadas las restricciones que limitan la división en las células ya diferenciadas de los tejidos (Niccolini, 1991, Sluysen, 1990, Myclos y Freyer, 1990, Cooper 1990)

Existen unos doscientos tipos de cánceres malignos. En España unas ciento cincuenta mil personas son afectadas cada año por esta enfermedad, de las cuales sobreviven una tercera parte (en Europa lo hacen el 35% y en EEUU el 45%) (Gonzalez Baron y cols, 1998).

Hay numerosos estudios que correlacionan la incidencia de determinados cánceres con el estilo de vida, hábitos, dietas, profesiones, lugar geográfico, sexo, etc. Se ha encontrado, por ejemplo, una frecuencia alta de leucemias mieloides en radiólogos expuestos a dosis elevada de rayos X; de cánceres de piel en sujetos con exposición prolongada a radiaciones ultravioletas; del hábito de fumar y los cánceres de pulmón, etc.

La incidencia de cáncer aumenta con la edad, lo que indica que existe un factor acumulativo de causas responsables, por lo que parece improbable que un único evento sea suficiente para desencadenar, de modo inmediato, un cáncer (Alvarez-Mon Soto y cols, 1997).

Desde un punto de vista biológico y clínico los tumores se clasifican en benignos y malignos, de los cuales, sólo estos últimos son considerados como propiamente cánceres (Izquierdo, 1995). Las diferencias entre unos y otros se pueden resumir en:

1) **Los tumores benignos:**

- a) desarrollo estrictamente local
- b) crecimiento lento
- c) expansivo, no infiltrante
- d) no recidivante ni metastatizante
- e) no necesariamente avanzan hacia la malignidad.
- f) mantienen el parecido con el tejido de origen.
- g) no todos los tipos celulares del tejido han de estar implicados y
- h) muchas veces están separados del tejido normal que los rodea por una especie de cápsula de tejido conjuntivo.

2) **Los tumores malignos:**

- a) crecimiento rápido
- b) no encapsulados e infiltrantes, con destrucción de los tejidos periféricos.
- c) metastatizantes
- d) suelen conducir a la caquexia y muerte
 - m) presentan numerosas anormalidades citológicas, como:
 - n) variaciones en forma y tamaño.
 - o) aumento de la densidad y tamaño del núcleo celular.
 - p) mitosis anormales frecuentes.

Las diferencias a nivel molecular no están claramente definidas. Cada célula posee una serie de genes que controlan las funciones de crecimiento y división celular. Un tumor surge cuando aparece una célula en la que alguno de estos genes ha sido mutado o alterado (Bishop, 1991, Marshall 1991).

En general, esos genes, cuya alteración está directamente implicada en la aparición del cáncer, pueden ser de dos grandes tipos:

En primer lugar genes que, al mutarse, inciden directamente en el comportamiento celular provocando un cambio de normal a tumoral. Estos genes, denominados **oncogenes** (del griego onkos = tumor) tienen un antecesor celular que funciona en condiciones normales, **protooncogen**. El protooncogen mutado se convierte en oncogén activo y tiene un efecto dominante en el cambio del genotipo celular normal al tumoral.

La mutación hace que estos oncogenes actúen de forma descontrolada, escapando a los sistemas que normalmente controlan su función.

Por otro lado existen genes que regulan diversos puntos de la división celular y cuya implicación en el proceso tumoral se produce porque una mutación los hace inactivos.

Este tipo de genes, denominados genes supresores de tumor o, antiguamente, **antioncogenes**, se implican en el proceso tumoral al sufrir mutaciones, que los hacen inactivos, o, simplemente provocan su pérdida o su delección. La pérdida de estos genes supresores hace que la célula pierda sus sistemas de control de la división celular y, por lo tanto, se divida de forma no reglada.

1.2. MECANISMOS GENÉTICOS QUE ORIGINAN EL PROCESO TUMORAL.

La mayoría de los cánceres surgen como consecuencia de un estado de **inestabilidad genética celular**, originado, en muchos casos, por exposiciones prolongadas a agentes físicos y químicos de carácter mutagénico. Las mutaciones en determinados genes, directa o indirectamente relacionados con la división celular, provocan la aparición de un fenotipo celular que conduce finalmente al cáncer.

Las **reordenaciones cromosómicas groseras** también se asocian a algunos tipos de cánceres. Las alteraciones cromosómicas específicas se pueden visualizar al microscopio. La leucemia mieloide crónica, por ejemplo, se asocia con la presencia de un cromosoma 22 truncado, denominado cromosoma Filadelfia y que es, en realidad, el resultado de una traslocación recíproca entre el cromosoma 9 y el 22; una porción grande del brazo largo del cromosoma 22 es sustituido por una pequeña porción terminal del cromosoma 9.

La **pérdida alélica** se correlaciona con el aumento de malignidad en los tumores sólidos. En un estudio exhaustivo en el que se utilizaron 22 marcadores polimórficos, uno para cada brazo autosómico no acrocéntrico humano, se observó que las deleciones de fragmentos de restricción (deleciones alélicas), eran muy comunes en los pacientes de carcinomas de colon (Vogelstein y col. 1989). Los pacientes con pérdida de muchos alelos (más de 10) presentaban peor pronóstico.

La **amplificación génica** es frecuente en algunos cánceres humanos. El receptor del factor de crecimiento epidérmico está amplificado en un elevado número de tumores cerebrales (glioblastomas), el oncogén myc en cánceres de mama, de pulmón y cerebro (neuroblastomas) etc. El número de copias puede variar entre 40 y varios cientos. La

amplificación génica va acompañada de un aumento en los niveles del producto amplificado, y es este exceso de producto unas de las causas de la inducción del tumor.

Algunas **mutaciones hereditarias** predisponen al cáncer. La evidencia procede, por una parte, de familias con una incidencia de cualquier tipo de cáncer bastante superior al normal, y por otra, de la aparición del cáncer en miembros jóvenes de la familia (generalmente menores de 30 años). Estas predisposiciones son debidas a defectos genéticos que incrementan el nivel de mutaciones en todo el genoma, favoreciendo indirectamente las mutaciones en proto-oncogenes o, también, pueden ser mutaciones hereditarias que se mantienen en genes implicados en la división celular, genes supresores de tumor. Un ejemplo paradigmático que presenta mutaciones de ambos tipos es el oncogén p53. La proteína p53 tiene, entre otras funciones, la misión de evitar la replicación del DNA si este está dañado. En el proceso de la división celular actúa como “guardián” del genoma: comprueba su estado y, si hay mutaciones, ralentiza el proceso de división celular para que la propia célula tenga tiempo de autorrepararse. Por tanto, las mutaciones o alteraciones que inactivan este gen permitirán que la división celular progrese en presencia de DNA dañado. El resultado será una nueva estirpe celular en la que sucesivas mutaciones, que pueden afectar a otros oncogenes, han sido perpetuadas por no haber sido previamente reparadas.

El p53 es uno de los genes que con mayor frecuencia se ha visto alterado en cánceres humanos. Se localiza en el cromosoma 17 del cariotipo humano y su producto es una proteína nuclear que se fosforila y que interacciona con otras proteínas activando la transcripción en determinados promotores y parando el ciclo celular en el estadio G1, estadio previo al de la síntesis durante el cual las células duplican su contenido en DNA preparándose, para la mitosis.

1.3. MELANOMA

1.3.1. DEFINICIÓN

Múltiples son las definiciones del Melanoma como tumor maligno. Las hay muy simples como: “ Melanoma es el tumor maligno derivado del melanocito epidérmico” (Rook 5ª edición 1997) y otras, más amplias, que lo definen como: “Melanoma es el resultado de la transformación maligna de melanocitos normalmente localizados en la epidermis, dermis o epitelios mucosos, de melanocitos alterados, llamados células névicas, existentes en ciertas lesiones precancerosas, como por ejemplo, nevus congénitos, atípicos o displásicos, o, más raramente, de melanocitos en localización visceral” (Barnhill y col. 1992).

El melanoma cutáneo (MC) es una neoplasia de la piel potencialmente letal que afecta a los melanocitos epidérmicos. Por tanto es una tumoración superficial, diagnosticable con facilidad. Ya Davis, en 1978, afirmaba que “el melanoma escribe su mensaje en la piel con su propia tinta, a la vista de todos”. La Literatura sajona utiliza habitualmente el término de melanoma maligno. Como quiera que la malignidad es intrínseca al propio nombre del tumor, sobra, por redundante, la palabra maligno, debiéndose, así mismo, excluir términos como melanoma de Spitz o similares por tratarse de tumoraciones benignas.

1.3.2. EPIDEMIOLOGIA

Sin embargo, el melanoma se ha convertido en una forma habitual de cáncer y actualmente se considera que, en ausencia de una intervención efectiva, constituye un problema de salud pública dado el alarmante aumento de su frecuencia. En efecto, desde 1950 el número de melanomas ha aumentado de forma continua con una tendencia a duplicar el número de casos cada 10 a 15 años (Grin-Jorgensen, 1992, Armstrong 1994 y Schreiber 1981). Llegándose actualmente en Queensland, Australia, a la máxima incidencia mundial de 43.5 casos / 100.000 habitantes/ año. En EEUU se calcula que uno de cada 87 caucasianos desarrollará un melanoma a lo largo de su vida. Cifra que aumentará a 1/75 en el año 2000. Por el contrario la incidencia en China, India y Japón permanece baja y no hay evidencias de cambio en estas poblaciones (Parkin y col 1997).

Este evidente aumento de la frecuencia del melanoma en las últimas décadas ha impulsado la investigación sobre los tipos de factores que pudieran influir en este desmesurado incremento. En España el primer estudio lo realizó J. M. Ródenas López en su tesis doctoral leída en 1994 en la Universidad de Granada y titulada “Factores de riesgo en el melanoma maligno cutáneo” y que posteriormente desarrolla en otras publicaciones.

Los factores de riesgo pueden ser agrupados en individuales y ambientales.

Como **factores de riesgo individuales** se describen:

- 1) Edad. Aparece con mayor frecuencia entre 30 y 60 años, siendo el cáncer con mayor incidencia en individuos entre 25 y 29 años y en los varones de 35 a 39 años (Parkin 1997). Las edades más avanzadas tienen un peor pronóstico. ¿diagnóstico más tardío?

- 2) Sexo. Normalmente el melanoma afecta por igual a ambos sexos, aunque ello no se mantiene en todos los países. Así en el norte de Europa hay el doble de casos en mujeres. Se desconoce la razón. Tal vez la mayor exposición al sol de las extremidades en las mujeres. Teniendo que señalar que tienen estos casos mejor pronóstico.
- 3) Clase social y raza. El melanoma parece ser más frecuente en las clases sociales altas tal vez por ser su exposición al sol diferente. (Lee 1980) El tumor aparece más en la raza blanca (3/1) que en negros, japoneses y chinos (Muir 1987). Así mismo varía el tipo de melanoma, por ejemplo, en personas de raza negra se eleva la proporción de los melanomas lentiginosos acrales (zonas de menor pigmentación), mientras que en los caucásicos aparece más frecuentemente el de extensión superficial. En cuanto a la supervivencia se ha encontrado, que es mayor, en personas de raza blanca que en las de color, lo que se atribuye a su diagnóstico más precoz.
- 4) Fenotipo cutáneo: La incidencia de melanoma guarda relación con los fototipos bajos, según la clasificación de Fitzpatrick (1988) concretamente los caucásicos de piel blanca, ojos claros, y pelo rubio. A este respecto en poblaciones estudiadas en el sur de España se constata la tendencia de aumentar el riesgo de melanoma conforme disminuye el fototipo, de manera que los sujetos con tipo III tuvieron una odds ratio de 8.2 y de los fototipos I y II de 42.1 frente a los de tipos más elevados. (Ródenas 1998b)
- 5) Herencia. Es evidente la existencia de casos familiares de melanoma denominados Síndrome FAMMM (familiar atypical multiple mole melanoma syndrome), que parece estar relacionada con alteraciones en el cromosoma 1 (1p36) (Green y col

1983), hablándose de que el riesgo de padecer melanoma de un familiar de pacientes con melanoma, puede llegar a ser hasta 229 veces mayor (Tucker y col 1993).

También se han hallado deleciones en el cromosoma 9, 9p21 (Cannon-Albright y cols.1992) que codifica una proteina de 16kDa (p16), en el 6p (Walker y cols 1994), 3q ((Bale y cols 1986), 11p (Gerhard y cols 1987) , y otros relacionan las alteraciones del cromosoma 21, locus 9p21 (Alvarez-Mon y cols 1997), con la predisposición de padecer este tumor. Por lo demás determinadas enfermedades predisponen al melanoma como el *Xeroderma Pigmentosum* o la Enfermedad de von Recklinghausen.

- 6) Inmunosupresión. Se ha encontrado un aumento de melanomas en enfermos de procesos que cursan con inmunidad alterada tales como síndromes linfoproliferativos, trasplantados renales y de médula, etc., si bien no está clara la razón.
- 7) Tumores benignos pigmentarios. La presencia de melanomas se correlaciona con el número de nevus pigmentarios especialmente de los llamados atípicos (Greene 1985) siendo el máximo exponente el Síndrome FAMMM.

Son también importantes los **factores de riesgo ambientales**:

- 1) Situación geográfica: El riesgo de padecer melanoma disminuye con la lejanía del Ecuador, lo que guarda relación con el apartado siguiente, aunque, últimamente queda matizado por el hecho de que son las poblaciones del norte más ricas y con capacidad de pasar su ocio en las zonas vacacionales soleadas en quienes están aumentando más las lesiones melánicas malignas. Así en EE.UU. y en Australia (Lee y cols 1993) hay una relación inversa entre la incidencia de melanomas y la distancia al Ecuador, pero en la misma zona los sujetos de piel oscura (fenotipos

altos) presentan menos melanomas que los de tez clara y blancos (fenotipos bajos). No obstante en Europa la incidencia es mayor en Noruega que en Italia, sin duda debido a las costumbres vacacionales.

- 2) Radiación solar, radiación ultravioleta y la capa de ozono: Ya hemos señalado que la exposición solar y los fenotipos juegan un importante papel en el desarrollo de los melanomas, pero hoy, además, se matiza en el sentido de que son las exposiciones intermitentes masivas en personas no acostumbradas las peores (24: ROOK y Elwood 25 y 26). Pero también se conoce que son más predisponentes las exposiciones excesivas en los niños y especialmente las quemaduras producidas antes de los 18 años. (Alvarez-Mon pag 22). Se conoce, además, que son las radiaciones UV las causantes del daño, especialmente las UVB aunque con el advenimiento de las camas UVA está haciendo que éstos estén incrementando su papel. Por último, la disminución de la capa de ozono está permitiendo que lleguen cada vez mas radiaciones ultravioletas a la superficie terrestre lo que acrecienta este factor (Alvarez Mon 22)

1.3.3. FORMAS CLINICAS

Se han descrito cuatro tipos morfológicos: melanoma de extensión superficial, melanoma sobre léntigo maligno, melanoma nodular y melanoma lentiginoso acral (Clark y col. 1969).

El **melanoma de extensión superficial** supone entre el 50% y el 70% de todos los casos de melanomas y se localiza sobre todo en la espalda en el varón y en las extremidades en la mujer. Consiste en una mácula, de 1 a 3 centímetros o más de diámetro, marrón o

pardo negruzca, con pequeñas zonas azuladas, que crece en periferia y pronto adquiere elevación en su centro. Es frecuente encontrarse con imágenes anulares, arciformes o del todo irregulares con diminutas elevaciones puntiformes marginales. Al final, al cabo de varios meses o años genera una tumoración globulosa, prominente o erosiva, ulcerada y sangrante, reflejo de la fase invasora, nodular, y capaz de metastatizar.

Histológicamente comienza con una lesión, in situ, donde encontramos acúmulos de melanocitos a lo largo de la basal, con alguno subiendo por la epidermis, los cuales están agrupados en forma de tecas siguiendo el denominado “patrón pagetoide”. Estos melanocitos tendrán un núcleo hipercromático y un abundante citoplasma que contienen gránulos de melanina. Esta lesión se extenderá luego hacia la dermis adquiriendo crecimiento vertical.

El **lentigo maligno- lentigo maligno melanoma** es mucho menos frecuente. Asienta en la cara y zonas expuestas al sol, en edades avanzadas de la vida, supone entre el 10 y 15% de los melanomas. El proceso comienza muchos años antes de la consulta de forma habitual. Se caracteriza por una mácula pardonegruzca, o azulada, con tonalidades muy diversas, opacas y brillantes, de dimensión variable (casi siempre extensa), que crece lentamente modificando de modo progresivo su contorno. Mientras palidece en su interior y parece involucionar por algunas zonas se extiende por otras. La superficie es lisa o delicadamente irregular y escamosa (melanosis precancerosa- lentigo maligno- melanosis de Hutchinson’s). Al cabo de años la mancha se vuelve más queratósica y excrecente, desarrollándose una lesión sobrelevada con frecuencia ulcerada y sangrante, con tendencia a crecer de forma rápida frente a lo que ocurría hasta entonces (lentigo maligno melanoma).

Histológicamente encontramos un aumento de melanocitos a lo largo de la membrana basal con atípías moderadas, lo que se denomina “patrón lentiginoso”, con posterioridad progresará hacia la dermis al adquirir la capacidad invasiva.

El **melanoma nodular**, su frecuencia oscila alrededor del 15%, se localiza en el varón en la cabeza y tronco. Presenta una evolución más rápida que el de extensión superficial, por lo que se diagnostica en fase más avanzada. Se trata de una lesión tumoral excrecente, sésil, cupuliforme y excepcionalmente pediculada, casi siempre rojo parduzca o negra intensa, que se ulcera rápidamente y sangra, de pocos centímetros de diámetro o alcanza mediadas gigantescas. Existe una variante en la que no aparece coloración melánica de la lesión (melanoma amelanótico), no supone mas del 5% de los casos.

El **melanoma lentiginoso acral** es raro en la raza blanca, pero es el más frecuente entre los individuos de raza negra y asiáticos. Se suele localizar en palmas de manos, planta de pies, mucosas y en el lecho ungueal. Comienza en la fase de crecimiento radial como una mácula pigmentada, a menudo muy azulada, cuyo desarrollo vertical al principio es poco evidente dada las características de la zona donde asienta, por lo que puede pasar desapercibido mucho tiempo, haciéndose luego muy llamativo.

Histológicamente nos encontramos aumento de melanocitos en la basal, así como hiperpigmentación, solamente con algunas atípías focales. El crecimiento lo hace radialmente y progresa poco verticalmente, lo que le da un falso aspecto de benignidad. El patrón es muy parecido al lentiginoso, excepto por la presencia de acantosis (Paladugu y col 1983).

El melanoma es una neoplasia poco frecuente en general, pero es la que produce mayor mortalidad entre las neoplasias cutáneas (Osterlind A. 1992). Supone el 3% de todos los

tumores malignos. La incidencia del melanoma está aumentando en los países occidentales al ritmo de 4% por año (Koh 1991), como reflejo de la mayor exposición solar (especialmente la que tiene carácter esporádico), y los cambios en la forma de vestir. El melanoma es más frecuente en las poblaciones de raza blanca cercanas al ecuador, y más prevalente en las áreas de la piel más expuestas al sol, como son la cara y el tronco en el hombre, y las piernas en las mujeres, lo que apoya el papel de la exposición solar en la etiología de este tumor. En Estados Unidos se diagnostican 32.000 casos anuales y se producen 7.800 muertes asociadas. ()

Aunque todavía es una neoplasia relativamente rara en algunas poblaciones, sus tasas de incidencia y mortalidad están aumentando en los individuos de raza blanca con mayor rapidez que las de cualquier otra forma de cáncer, a excepción del cáncer de pulmón en mujeres en algunos países (Devesa 1995). Este incremento se ha observado en todo el mundo y a pesar de la mejoría en la supervivencia, la tasa de mortalidad por melanoma continua elevándose (Parkin y col 1997). Este aumento se relaciona con los factores anteriormente expuestos.

1.3.4. ALTERACIONES GENÉTICAS DE LOS MELANOMAS.

El análisis genético del melanoma presenta dos áreas genéricas diferenciadas y relacionadas entre sí. Por un lado tenemos los estudios de predisposición familiar a desarrollar melanomas y, por otro, los cambios genéticos somáticos (no heredables) que aparecen asociados al tumor. Los dos campos son de gran interés y pueden converger en el mismo gen o grupo de genes que juegan un importante papel en el desarrollo del melanoma.

1. Alteraciones genéticas somáticas

Los melanomas, como prácticamente todos los tumores, acumulan progresivamente alteraciones en su ADN a medida que evolucionan hacia comportamientos más malignos (10,11). Estas alteraciones incluyen pérdidas cromosómicas, duplicaciones, translocaciones y deleciones. Además de las alteraciones citogenéticas, que se detallarán más adelante, los melanomas presentan alteraciones a nivel molecular como variabilidad en microsatélites, mutaciones puntuales y pérdidas de heterozigosidad (LOH, de su traducción inglesa, *loss of heterozygosity*).

Uno de los cambios genéticos somáticos más consistente en los melanomas es la pérdida de material cromosómico del brazo corto del cromosoma 9 (9p) (11,16,17). Esta alteración citogenética se observa en más de la mitad de los melanomas malignos. Esta deleción también ha sido detectada a nivel de LOH y se cree que corresponde a un evento genético temprano en el desarrollo del melanoma, antes de que la lesión se pueda catalogar de madura. Trabajos recientes han demostrado que la gran proporción de alteraciones de 9p pueden caracterizarse más finamente como deleciones homocigóticas (se pierde material en los cromosomas del par 9) de la región 9p21 (18).

Además de 9p21 también se han descrito otras LOH en estadios tempranos del desarrollo del melanoma: regiones en 3p, 6q, 10q, 11q y 17p. (11). Las LOH para 3p y 10q han sido detectadas en melanomas de menos de 1,5 mm de grosor, sugiriendo que dichas regiones pueden albergar genes supresores de tumor importantes en la primera etapa del desarrollo del tumor. Las LOH de 6q, 11q y 17p han sido detectadas en tumores invasivos. No se conoce mucho acerca de los genes situados en estas regiones

aunque se sospecha que la región en 3p corresponde a un gen hipotéticos denominado FHIT (20). En otra región de pérdidas frecuentes, 17p, se encuentran varios genes candidatos a estar implicados en el desarrollo tumoral, cuya implicación en el melanoma está todavía por asegurar. Así, por ejemplo, 17p contiene p53, cuya implicación en melanomas a través de mutaciones es muy baja (21) pero que puede ser responsable por delección en una proporción de los melanomas estudiados (22). Esta región también contiene el gen supresor de metástasis NM23 y el gen supresor de la Neurofibromatosis tipo I, NF1, un gen que ya ha sido encontrado mutado en algunas líneas celulares de melanoma (27,28,29).

2. Análisis de alteraciones genéticas en el melanoma familiar

Además del fototipo de la piel, la predisposición al melanoma está fuertemente influenciada por la herencia. Ya en 1952 se describió la naturaleza hereditaria familiar del melanoma. Actualmente se estima que entre el 5 y el 10% de todos los melanomas pueden tener una base genética hereditaria (30,31), siendo el restante 90% considerado como melanomas esporádicos. Este 10% de melanomas que aparecen asociados a grupos familiares ha hecho posible enormes avances en el descubrimiento de genes supresores de tumor (GST). El estudio genético por ligamiento de la predisposición a desarrollar melanoma llevó a identificar un locus situado en 9p21 (47). Este locus supuestamente contenía un gen responsable de esa predisposición al que se denominó MLM. Este locus se heredaba de forma mendeliana simple y dominante, esto es, bastaba con que una de las dos copias del gen estuviera alterada para que se manifestara la predisposición. La penetrancia de la enfermedad, una vez heredado el gen defectuoso, es variable entre un

50 y un 100% (49,50). El comportamiento del locus es el de un gene supresor de tumor. Aunque el tipo de herencia es dominante, el locus mutado actúa en la célula de forma recesiva: los tumores que se detectan en portadores del locus tienen el gen deletado o inactivado por no-disyunción (51). El comportamiento es similar al descrito por Knudson (52) para el gen del retinoblastoma. En líneas generales, para que un determinado gen supresor de tumor se desactive y, por lo tanto, el tumor se desarrolle, son necesarios dos eventos o mutaciones que inactiven cada uno de las dos copias (materna y paterna) del gen. En los cánceres familiares, una de las mutaciones viene heredada y sólo es necesario una mutación añadida para que el locus se inactive y el tumor pueda desarrollarse.

3. Del locus situado en 9p21 al gen p16

Después de establecerse sin ambigüedades el ligamiento entre melanoma y los marcadores genéticos del locus en 9p21, se realizó un enorme esfuerzo por localizar el gen situado en dicho locus que era responsable de la predisposición familiar al melanoma. Dado que se conocía la relación entre los marcadores, el locus y el mecanismo que inactivaba ese locus, que era en la mayoría de los casos la delección homocigótica (pérdida de las dos copias), se pasó de los estudios estándar de clonación posicional al análisis de localización de los puntos de rotura de las delecciones. El análisis de más de 100 líneas celulares de melanoma permitió elaborar un mapa de delecciones (18) y determinar que el segmento común deletado contenía, al menos, dos genes. Uno que codificaba para la ya conocida proteína inhibidora de la kinasa dependiente de ciclina (cdk), p16, y otro gen relacionado que codificaba para otra inhibidora de

ciclinas, p15 (53-57). Estudios posteriores demostraron que el gen más directamente implicado en la aparición del fenotipo tumoral era p16 (también denominado P16INK4A, MTS1 y cdkN2). La relación de casos familiares que mostraban alterada la secuencia del gen p16 deja pocas dudas acerca del papel que este gen juega en la aparición del tumor. Aunque no todas las familias estudiadas con predisposición para el melanoma presentan ligamiento en 9p21, en aquellas familias que sí lo presentan se ha comprobado que se produce una proteína defectuosa (67-69), estableciendo, fuera de toda duda razonable la relación entre la alteración genética y la enfermedad.

Tras el descubrimiento de p16 se han identificado otros genes relacionados con él en el mecanismo de control del ciclo celular, como el propio gen de la kinasa dependiente de ciclina, cdk4 o el gen del retinoblastoma. Estos genes ejercen su efecto durante el ciclo celular controlando el paso de la fase G1 a la fase de síntesis de ADN. Se conoce también que este mecanismo de control está afectado no sólo en cánceres de tipo familiar sino que las alteraciones de p16 han sido ya descritas e identificadas su implicación en melanomas esporádicos, tumores del tejido nervioso, epiteliales, etc.

4. Otras alteraciones genéticas en melanomas no familiares: amplificación génica

NOTA: A PARTIR DE AQUÍ LAS REFERENCIAS SON DEL CAPITULO 7

Las reordenaciones citogenéticamente visibles en tumores humanos pueden caer en una de las siguientes categorías generales: (1) deleciones, con pérdida neta de material genético; (2) translocaciones, con recolocaciones de material genético pero sin pérdida ni ganancia de material; y (3) amplificaciones génicas, con ganancia neta de regiones cromosómicas inespecíficas. En general se admite que las deleciones representan pérdida de genes supresores de tumor mientras que las translocaciones y las

amplificaciones representan activación de oncogenes. Las amplificaciones también pueden implicar a genes de resistencia al tratamiento u otros genes que confieran ventaja selectiva cuando se sobre expresan en un clon celular. En general se usa el término amplificación génica para referirse a un elevado aumento en el número de copias (más de seis copias por genoma diploide) de un gen o una determinada región genómica. No se emplea el término para referirse a ganancias numéricas (tres o cuatro copias por genoma diploide) de cromosomas completos, brazos cromosómicos o grandes regiones de un cromosoma.

La mayoría de las amplificaciones génicas pueden detectarse citogenéticamente en forma de cromosomas dobles minutos (*dmms*) o regiones homogéneamente teñidas (HSRs). Si el número de copias es pequeño (de cinco a diez copias por célula), o el tamaño de la región amplificada (amplicón) es pequeño, o el cariotipo disponible para el análisis es extremadamente complejo, la amplificación génica puede no ser detectada por el análisis citogenético convencional. Para obviar este problema existen diferentes técnicas de biología molecular y de citogenética molecular que nos permiten analizar una muestra suficientemente pequeña de tumor. En general, estas técnicas trabajan cuando se conoce o sospecha el gen o genes implicados en la amplificación.

Los principales métodos de detectar la amplificación son el análisis citogenético, la técnica de Southern-blotting, la hibridación in situ con fluorescencia (FISH), la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en su variante semicuantitativa y la hibridación genómica comparada (CGH). Como en el presente trabajo es de carácter retrospectivo se han utilizado cortes histológicos en parafina por lo que no se pudieron realizar análisis citogenético convencional. En su lugar se optó por la técnica de FISH. Esta técnica es probablemente la más eficiente y popular en estos días (108,109). Requiere sólo una

pequeña cantidad de muestra tumoral que puede estar incluida en parafina. La hibridación se desarrolla sobre el porta durante 16 horas y los resultados pueden calibrarse en 48 horas. Esta técnica permite también detectar un pequeño porcentaje de células con amplificación dentro de una población mayoritaria de células normales o tumorales sin amplificación. Sin embargo, esta técnica también requiere de un microscopio de fluorescencia y un sofisticado sistema de análisis de imagen. Además, las sondas empleadas tiene un coste elevado por lo que no es la solución más apropiada para cualquier laboratorio.

La amplificación génica casi siempre tiene como consecuencia la sobreexpresión de uno o más genes que se hayan incluidos dentro de los límites del amplicón. Lo más común es que haya un gen que sea el objetivo de la amplificación génica, pero se han descrito unidades compuestas por más de un gen que confieren una ventaja proliferativa de modo selectivo cuando se amplifican como tal unidad. También es posible que en un mismo tumor haya dos o más regiones distintas sometidas a amplificación sin embargo esto es un hecho poco frecuente y se cree que, en general, en cada tumor, la región amplificada suele ser única.

Dejando al margen la amplificación de genes de resistencia a tratamientos, nos vamos a centrar en la amplificación de oncogenes. Aunque se han descrito numerosas amplificaciones en líneas celulares tumorales, la situación en tumores primarios es bastante más restringida. Así por ejemplo se conoce que los oncogenes *c-myc* y *erb1* (receptor del factor de crecimiento epitelial) están amplificados en el 80% de las líneas celulares establecidas a partir de neuroblastomas y carcinomas de células espinosas, respectivamente, mientras que sólo aparecen amplificados en el 25 y el 10% de los respectivos tumores primarios (12-14). Los diferentes tipos de tumores en los que se han

descrito amplificaciones incluyen neuroblastoma, mama, ovario, pulmón y de cabeza y cuello. En estos tipos tumorales la prevalencia del fenómeno genético de la amplificación varía entre el 20 y el 50% (Tabla 1.1) y, a menudo, la amplificación se correlaciona con un comportamiento más agresivo del tumor. En otros tipos tumorales, como los sarcomas, carcinoma hepatocelular, gliomas malignos y cánceres gastrointestinales, los datos que demuestran la presencia de amplificación están apareciendo aunque todavía no se pueda hablar de correlaciones clínicas.

Tipo de tumor	Gen amplificado	Frecuencia (%)
Neuroblastoma	n-MYC	20-25
Pulmón (cél. Pequeñas)	MYC	15-20
Glioblastoma	ERB1	33-50
Cáncer de mama	MYC	20
	ERBB2-(neu)	20
	FGFR1	12
	FGFR2	12
	Cyclin D1	15-20
	ZNF217	
Cáncer de esófago	MYC	38
	Cyclin D1	25
Cáncer gástrico	k-RAS	10
	Cyclin E	15
Cáncer hepatocelular	Cyclin D1	13
Sarcoma	MDM2	10-30
	CDK4	11
Cáncer de cuello uterino	MYC	25-30
Cáncer de ovario	MYC	20-30
	ERBB2(neu)	15-30
	AKT2	12
Cáncer de cabeza y cuello	MYC	7-10
	ERBB1	10
	Cyclin D1	50
Cáncer de colon y recto	MYB	15-20
	h-RAS	29
	k-RAS	22

Tabla 1.1 Amplificaciones recurrentes de oncogenes en tumores humanos

Como se ha mencionado anteriormente, se postula que los genes amplificados en estos tumores confieren cierta ventaja en el crecimiento del clon maligno. Estos genes se agrupan funcionalmente por familias como la familia MYC, que incluye los genes c-MYC, n-MYC, l-MYC, la familia RAS, que incluye h-RAS, k-RAS, n-RAS, el grupo de factores de crecimiento y sus receptores (ERBB1, ERBB2-neu, FGFR1 y FGFR2, y genes que intervienen en la regulación del ciclo celular como Cyclin D1, Cyclin E, MDM2 y CDK4, además de otros genes de difícil clasificación (Tabla 1.2.).

Gen amplificado	Locus cromosómico	Tipos de tumor
AKT2	19q13	Ovario
Cyclin D1	11q13	Cabeza y cuello Esófago Mama Hepatocarcinoma
Cyclin E	19q12	Gástrico
CDK4	12q14	Sarcoma
ERBB1	7p12	Glioblastoma Cabeza y cuello
ERBB2-neu	17q11	Mama Ovario
FGFR1	8p12	Mama
FGFR2	10q25	Mama
h-RAS	11p15	Colon y recto
k-RAS	12p13	Colon y recto Gástrico
MDM2	12q14	Sarcoma
MYB	6q23	Colon y recto
MYC	8q22	Ovario Mama Pulmon Cabeza y cuello Esófago Cuello uterino
n-MYC	2p24	Neuroblastoma
ZNF217	20q13	Mama

Tabla 1.2. Localización de oncogenes amplificados en tumores humanos

En muchos de los tumores estudiados hasta la fecha, las amplificaciones se correlacionan con fases avanzadas de la progresión tumoral y con un mal pronóstico. Por ejemplo, en el neuroblastoma, la amplificación del oncogen MYC se asocia con la progresión clínica de forma independiente de la edad y el estadio del tumor (15,17). También en cáncer de mama, los oncogenes ERBB2-neu y ZNF217 se correlacionan con mal pronóstico asociado a otras variables como implicación de nódulos linfáticos o ausencia de receptores esteroideos (18,19, Collins et al, 1998).

En determinadas circunstancias, el amplicón contiene varios genes candidatos y no se conoce con certeza cuál de ellos es el objetivo de la amplificación génica. Uno de los más conocidos es el amplicón situado en la región 11q13 que contiene el gen de ciclina D1, los factores de crecimiento fibroblástico FGF4 y FGF3 o INT-2, así como varios más genes candidatos (20,21).

No existen muchos datos acerca del fenómeno de la amplificación génica en melanomas. Sekiya et al. (1985) describieron amplificación de H-RAS en un caso de melanoma. Bauer et al. (1990) observaron amplificación de c-MYC en dos melanomas humanos. También se han observado aumentos en la expresión de ERBB2 (Bodey et al., 1997) y de c-MYB (Walker et al., 1998), aunque en estos casos el número de copias del gen no se veía modificado y, por lo tanto, no podríamos hablar estrictamente de amplificación.

Por otro lado, la familia de oncogenes de los factores de crecimiento fibroblástico, resultan de especial interés en tumores con componente epitelial. Así, algunos los genes que codifican para receptores de esos factores aparecen activados por amplificación en

tumores de mama (23,51). De más interés son los oncogenes HST e INT-2, que codifican proteínas homólogas de los factores de crecimiento (Yoshida et al, 1985) y que aparecen amplificados en el 50% de los cánceres de esófago (Yoshida et al., 1993). De hecho, también se ha descrito la co-amplificación de ambos oncogenes en un caso de melanoma.

En el presente trabajo también se ha estudiado la posible amplificación en melanoma de otro oncogén, la proteína quinasa p58, localizada en el brazo corto del cromosoma 1 a nivel de la banda 1p36. Este oncogen forma parte del grupo de genes relacionados con el control del ciclo celular y también se sospechaba su implicación en el desarrollo del melanoma (Eipers et al., 1991).

5. Alteraciones cromosómicas en el melanoma

NOTA: LAS REFERENCIAS A PARTIR DE AQUÍ son CAPITULO 6 DEL LIBRO

Recientemente se han publicados varios estudios cromosómicos en melanoma. En resumen, los cromosomas más frecuentemente implicados tanto en alteraciones numéricas como estructurales son los pares 1, 6, 7, 9, 10 y 11 (1-3,67-72). Se conoce la implicación directa de translocaciones y deleciones del brazo largo del cromosoma 6 (73,74). De hecho, estudios de LOH y otras evidencias biológicas también indican que uno o varios genes en este cromosoma están implicados en el control del carácter tumoral de este desorden (75-77).

Las alteraciones cromosómicas más comunes afectan al cromosoma 1 y, de manera más concreta a la región pericentromérica 1p12-q12 (68). El efecto neto de esas alteraciones suele ser interpretado como pérdidas del brazo corto y ganancias del brazo largo, algo bastante común en numerosos tipos de tumores sólidos. Otras alteraciones frecuentes

son trisomías del cromosoma 7. No se conocen hasta la fecha, la incidencia real de este tipo de alteraciones en el melanoma in situ o de extensión superficial ya que la gran mayoría de los trabajos hacen referencia a melanomas malignos de comportamiento muy agresivos (Heim y Mitelman, 1995).

1.4. OBJETIVOS

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL Y METODOS CLÍNICO PATOLÓGICOS

2.1.1. MATERIAL

Revisamos las biopsias recibidas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Canarias (HUC), entre los años 1971 y 1994. Fueron un total de 110.589 biopsias, que distribuidas por años quedaron así:

49 en 1971, 1826 en 1972, 1978 en 1973, 2230 en 1974, 2023 en 1975, 2065 en 1976, 2192 en 1977, 2709 en 1978, 2887 en 1979, 2996 en 1980, 5555 en 1981, 5917 en 1982, 5204 en 1983, 5191 en 1984, 5271 en 1985, 5226 en 1986, 5500 en 1987, 6255 en 1988, 6132 en 1989, 8169 en 1990, 7222 en 1991, 8303 en 1992, 7945 en 1993 y 7364 en 1994.

De dichas 110589 biopsias encontramos 154 que correspondían a Melanomas Malignos, clasificándolos en los 4 tipos morfológicos que desde el trabajo de Clark y colaboradores en Human Pathol en 1986 quedaron establecidos, como son Melanoma Lentiginoso, Melanoma Extensión Superficial, Melanoma Nodular, Melanoma Lentiginoso Acral. Quedándonos una serie de casos en los que solo constaba una lesión no primaria y que clasificamos como Metástasis.

2.1.2. METODOLOGÍA

1. Características clínicas

Dentro de cada tipo, los distribuimos por edades, localización de la lesión, sexo del paciente, supervivencia y zona residencia del paciente, extraídos estos datos de la Historia Clínica que consta en los archivos del Hospital Universitario de Canarias.

1.1. Edad

Distribuimos los pacientes en grupos de 10 años, de 21 a 30 años, de 31 a 40 años, de 41 a 50 años, de 51 a 60 años de 61 a 70 años, de 71 a 80 años, de mas de 80 años y dejando un apartado para los casos en los que no constaba la edad del paciente.

1.2. Sexo.

Distribuimos todos los casos según su sexo en varones y mujeres.

1.3. Localización

Realizamos una distribución de la localización de las lesiones, englobándolas en: cara, extremidades superiores (EESS), extremidades inferiores (EEII), tronco y pacientes donde no constaba la localización de la lesión

1.4. Localidad de Residencia.

Realizamos una agrupación de los pacientes, según la zona de residencia dentro de la provincia de Santa Cruz de Tenerife, de la cual es uno de los hospitales de referencia el Hospital Universitario de Canarias. Dada la desigualdad de reparto de la población, con un total de 764.070 habitantes, así como la geografía montañosa de las islas que engloban la provincia, con la consiguiente diferencia de incidencia solar, hemos configurado unas zonas, relacionándolo con el número de casos y los diferentes tipos de tumor que aparecen.

Las diferentes zonas fueron, en la isla de Tenerife: Zona Norte-2 que engloba a todos los pacientes entre Teno y San Juan de la Rambla, con una población de 51.242 habitantes. Zona Norte-1 desde Los Realejos hasta El Rosario, con una población de 283.745 habitantes. Zona Centro el municipio de Santa Cruz, con una población de 203.787 habitantes. Zona Sur-1 desde Candelaria hasta Arico, con una población de 38.564 habitantes. Zona Sur-2 desde Granadilla hasta Santiago de Teide, con una población de 88.204 habitantes. Otras islas: La isla de la Gomera, con una población de 16.978 habitantes. La isla de La Palma, con una población de 81.521 habitantes. La isla del Hierro con una población de 14.000 habitantes.

1.5. Supervivencia.

Revisamos la supervivencia de todos los casos, clasificándolas en un año, dos años, tres años, 4- 5 años y entre 5 y 10 años, y referenciando si había fallecido el paciente.

Dejamos un apartado para los casos, en los que no constaba ningún dato posterior al primer acto de biopsia-extirpación.

2. Clasificaciones pronósticas

2.1. Índice de Clark

La profundidad del tumor ha sido considerada como el factor pronóstico más importante, nuestro material se clasificó en cinco estadios siguiendo la clasificación propuesta por Clark (Clark y col. 1969). Estos son:

Grado I, la lesión está en epidermis o in situ (sin rotura de la basal, es decir, tumoración no invasiva).

Grado II, la lesión se extiende fundamentalmente la dermis papilar, pudiendo aparecer algunas células aisladas en la interfase con la dermis reticular.

Grado III, la lesión se extiende por toda la dermis papilar y llega hasta la interfase, sin invadir el dermis reticular

Grado IV, la lesión invade la dermis reticular.

Grado V, invade tejido subcutáneo.

2.2. Índice de Breslow

En 1970 Breslow describió otros estadios, valorando la profundidad del tumor, midiéndolo en el sitio donde alcanzaba mayor tamaño en profundidad, y en las lesiones

ulceradas, se medirá desde la línea imaginaria entre las capas de granulosa de ambos bordes y el fondo de la lesión. Así los clasificó en:

Grado I, profundidad menor de 0'76 mm

Grado II, desde 0'76 hasta 1'5 mm

Grado III, más de 1'5 mm.

2.3. Sistemas de estadios histológicos.

Existen varios trabajos que intentan relacionar los grados de Clark y Breslow.

Uno de ellos es el de UICC (Sherman y col 1990), en el que encontramos los grados:

IA: grado II o III, menor o igual a 1'5 mm de profundidad

IB: grado IV o V, o mayor o igual que 1'5 mm de profundidad.

II: afectación de ganglios regionales.

III: afectación de ganglios en varias regiones.

IV: metástasis a distancia.

Otro es el del American Joint Committee on Cancer staging system (Singlestarg y cols 1991) que los clasifica en:

IA: Melanoma localizado, menor o igual a 0'75 mm, o grado II.

IB: Melanoma localizado, entre 0'76 y 1'5 mm, o grado III.

IIA: Melanoma localizado, entre 1'5 y 4 mm, o grado IV.

IIB: Melanoma localizado, mas de 4 mm, o grado V

III: Metástasis regionales y/o metástasis en tránsito.

IV: Metástasis avanzadas o a distancia.

2.4. Hojas pronósticas

Realizamos una revisión de los casos de Melanoma de Extensión Superficial utilizando las hojas realizadas por Cochran en 1962 () y por Hardmeier () como modificación de la anterior en 1970. Estas hojas intentan valorar el pronóstico de los melanomas según una puntuación dada a factores clínicos e histopatológicos.

Cochran valora: sexo, localización, tamaño de la lesión, duración desde el comienzo, si la lesión aparece en zona expuesta al sol o no, afectación ganglionar, diseminación, profundidad de la lesión en relación con anejos, número de mitosis por campo (40 aumentos), ulceración así como invasión de linfáticos o vasos.

Hardmeier valora: sexo, patología previa, localización, tamaño, duración de la anamnesis, exposición solar de la zona afectada, metástasis regionales, metástasis a distancia, relación con anejos, número de mitosis, pigmentación, así como infiltración.

Esto lo apreciamos en las hojas que mostramos a continuación:

HOJA DE PUNTUACION PRONOSTICA (HARDMEIER 1970)

VALORACION	Puntuación	Caso
Sexo.		
Mujer.	1	
Varón.	2	
Desarrollo sobre:		
Melanosis precancerosa.	1	
Nevus o desconocido.	2	
Localización.		
Cabeza-nuca-extremidades.	2	
Subungueal.	4	
Tronco-anogenital.	6	
Mucosas-desconocido.	8	
Tamaño.		
< 2 cms.	1	
> 2 cms.	4	
Duración por anamnesis.		
< 6 meses.	1	
> 6 meses.	2	
Exposición solar.		
Zona expuesta.	1	
Zona no expuesta.	5	
Metástasis ganglios regionales.		
No	1	
Si	10	
Metástasis a distancia.		
No	1	
Si	15	
Relación con anejos.		
Encima glandulas ecrinas.	1	
Debajo glándulas ecrinas.	5	
Número mitosis.		
< 1/por campo (40x).	1	
> 1/por campo (40x).	6	
Pigmentación.		
Fuerte.	1	
Débil o ausente.	6	
Infiltración vascular.		
No.	1	
Si.	5	
TOTAL	12 a 65	

Pronóstico para 12-19 puntos = Favorable.
Pronóstico para 20-25 puntos = Incierto.
Pronóstico para > 26 puntos = Desfavorable.

Tabla 2.4.2. Hojas de puntuación pronostica según Hardmeier

HOJA DE PUNTUACION PRONOSTICA (COCHRAN 1968)

VALORACION	Puntuación	Caso
Sexo.		
Mujer.	1	
Varón.	6	
Localización.		
Cabeza-cuello.	1	
Miembro superior.	3	
Tronco.	6	
Miembro inferior.	2	
Ano-genital.	6	
Ocular.	8	
Subungueal.	4	
Mucosas.	8	
Tamaño.		
< 2 cms.	1	
> 2 cms.	4	
Duración de sintomatología.		
< 2 años.	1	
> 2 años.	2	
Exposición solar.		
Zona expuesta.	1	
Zona no expuesta.	5	
Afectación ganglionar.		
No	1	
Si	10	
Enfermedad diseminada.	15	
Relación con anejos.		
Encima.	1	
Debajo.	4	
Número mitosis.		
< 1/campo (40x).	1	
> 1/campo (40x).	3	
Ulceración.		
No.	1	
Si.	4	
Invasión linfáticos o vascular.		
No.	1	
Si.	4	
TOTAL:	10 a 67	

Buen pronóstico = 10-19 puntos.
Pronóstico mediano = 20-25 puntos.
Mal pronóstico = > 26 puntos.

Tabla 2.4.1. Hoja de puntuación pronostica según Cochran

2.2. MATERIAL Y METODOS DE LAS TECNICAS DE HIBRIDACIÓN INSITU CON FLUORESCENCIA (FISH)

2.2.1. MATERIAL

Para los estudios de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) se emplearon 20 muestras tumorales seleccionadas dentro de todos los melanomas revisados y sus correspondientes controles no patológicos. Las muestras tumorales correspondían a melanomas de extensión superficial y los controles no patológicos a epidermis normal de los mismos pacientes. La descripción más detallada de los diagnósticos se refiere en resultados (&&&&).

2.2.2. METODOLOGÍA.

1. Preparación de la muestra.

- Se utilizaron biopsias cutáneas fijadas en formol al 10% y embebidas en parafina.
- Las biopsias se cortaron en secciones de 5 micras y se aplicaron en portaobjetos silanizados. Los cortes se adhirieron al cristal mediante calentamiento en microondas.
- Los cortes se desparafinaron mediante inmersión en xylol a temperatura ambiente durante 10 minutos y dos lavados posteriores de 5 minutos en Etanol al 100%.

2. Pretratamiento

El pretatamiento de las muestras consiste en adecuarlas para poder llevar a cabo una buena hibridación. Esta basado en la digestión proteica de las secciones para facilitar tanto la desnaturalización del DNA como el acceso de la sonda al nucleo celular. En general se siguieron las recomendaciones del proveedor de la sonda (ONCOR, Gaithersburg, USA) y se utilizaron sus reactivos. Esta técnica se compone de dos partes:

- Pretratamiento del tejido. Con la solución de pretratamiento de ONCOR precalentada a 45°C, se sumergen los portas durante un período variable entre 10 y 30 minutos, manteniendo la temperatura. los portas se lavan después con 2xSSC durante 10 segundos.
- Digestión. Inmediatamente después del lavado anterior se sumergen las preparaciones en una solución de enzima proteico (ONCOR, Gaithersburg, USA) a una concentración de 0.25 mg/ml, precalentada a 45°C, durante un tiempo variable que se determina según el estado de la muestra y que normalmente fue entre 20 y 40 minutos. Tras la digestión, las preparaciones se lavan en 2xSSC, se deshidratan en 70%, 80% y 95% etanol a temperatura ambiente y se dejan secar al aire.
- Evaluación. Después de un pretratamiento y digestión inicial las preparaciones se evalúan para determinar si éstos han sido los adecuados. Se tiñen las preparaciones con yoduro de propidio a una concentración de 2.5 µg/ml y se observan al microscopio de fluorescencia. Una preparación poco digerida presenta una autofluorescencia verde superficial y una pobre tinción con yoduro. Cuando esto ocurre hay que desteñir la preparación en 2xSSC y volver a digerir la muestra por más tiempo. Una preparación muy digerida presenta bordes celulares borrosos que

dificultan la identificación. Cuando esto ocurre, la muestra se descarta y se inicia otra vez el proceso con un tiempo de digestión menor.

3. Hibridación

3.1. Sondas de secuencia única

Todas las sondas empleadas son comerciales de secuencia única y marcadas con digoxigenina (ONCOR, Gaithersburg, USA). La sonda se precalienta a 37°C durante 5 minutos. Se colocan entre 10 y 30 µl de la sonda en un tubo dependiendo de la superficie a hibridar.

3.2. Sondas centroméricas

Las sondas empleadas son comerciales las del los cromosomas 1 y 10 de ONCOR, Gaithersburg, USA. Las de los cromosomas 6 y 7 de BOEHRINGER MANNHEIM GmbH. La sonda se precalienta a 37°C durante 5 minutos, tras lo cual se suspende en Hybrisol VII. Se colocan entre 10 y 30 microlitros de la sonda en un tubo dependiendo de la zona a hibridar

3.3. Procedimiento

- Se coloca la sonda sobre la muestra del tejido y se cubre con un cubre de cristal. El conjunto se coloca en una placa calefactora a 100°C durante 10 minutos. De ahí se pasa a una cámara húmeda donde se incuban a 37°C toda la noche.
- Se retira el cubre y la hibridación se lava a 72°C en 2xSSC durante 5 minutos. Después se para el lavado sumergiendo las preparaciones en 1xPBD.

4. Detección

- Se sacan las preparaciones del PBD, escurridas sin dejar que se sequen, luego se añade al porta 60 μ l del anticuerpo anti-digoxigenina marcado con fluoresceína y se deja en la cámara húmeda 20' a 37°C durante 10 minutos. A continuación, se lava 3 veces 2 minutos cada una en PBD.
- En este punto puede realizarse Amplificación, que hemos realizado en todos los casos.
- a.- Sacar las preparaciones del PBD, escurridas sin dejar que se sequen y colocamos 60 μ l de Rabbit-Anti-Sheep Antibody en cada porta, cubrimos con plástico e incubamos a 37 °C durante 15 minutos en cámara húmeda precalentada
- b.- Retirar el cubre y lavar en PBD 3 veces durante 2 minutos, colocamos 60 μ l de Flurescein labeled Anti-Rabbit Antibody II, se cubre con plástico e incuba a 37 °C durante 15 minutos en la cámara húmeda precalentada, se retira el cubre y lava 3 veces durante 2 minutos.

5. Tinción Fluorescente

- Sacamos las preparaciones del PBD y se tiñen con 2.5 μ g/ml de yoduro de propidio disuelto en antifade y se procede a su observación al microscopio óptico equipado con luz fluorescente y dotado de los filtros adecuados.

6. Observación al microscopio.

Las preparaciones se analizaron con un microscopio Nikon Microphot-FX con una lámpara de fluorescencia de luz ultravioleta de 100 Watios y los filtros adecuados para

ioduro de propidio (G-2A) y fluoresceína (B-2A). Las imágenes se fotografiaron en film Kodak de 400 ASA para diapositiva con un valor de exposición de -2.

3. RESULTADOS

3.1. RESULTADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

3.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MUESTRA

De las 110589 biopsias evaluadas entre los años 1971 y 1994, encontramos que 154 correspondían a diagnósticos de melanoma, distribuidos de la siguiente forma: 59 Lentigos Malignos (LM) y/o Lentigo Maligno Melanoma (LMM), 37 Melanomas de Extensión Superficial (M E S), 23 Melanomas Nodulares (M N), 12 Melanomas Lentiginosos Acrales (M L A) y 23 Metástasis sin conocimiento del tumor primario, que fueron eliminados en este trabajo.

1. Edad

La distribución por edad fue la siguiente: de 20 a 30 años 3 pacientes (2,2%), entre 31 y 40 años 10 pacientes (7,6%), entre 41 y 50 años 14 pacientes (10,6%), entre 51 y 60 años 29 pacientes (22,1%), entre 61 y 70 años 31 pacientes (23,6%), entre 71 y 80 años 30 pacientes (22,9%), mas de 80 años 9 pacientes (7,5%), no constaba la edad en la historia en 5 pacientes (3,8%) (Figura 3.1.1.).

Las décadas entre 51-60, 61-70 y 71-80 presentaron la mayor incidencia, en todas similar y algo superior al 20% en cada una. En su conjunto reunían casi el 70% de los casos. La media de edad del grupo de pacientes estudiados fue 65,94 años, con un rango entre 24 y 94 años.

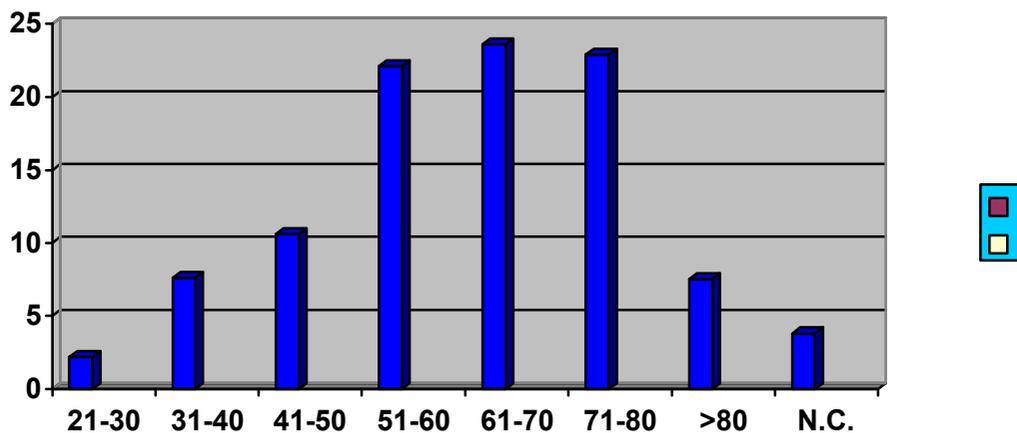


Figura 3.1.1. Distribución de la muestra de melanoma según la edad de los pacientes

2. Sexo

Dentro del grupo 38 pacientes eran varones (28,4%) y 92 eran mujeres (70,6%). No constaba el sexo en un paciente (0,7%). (Figura 3.1.2)

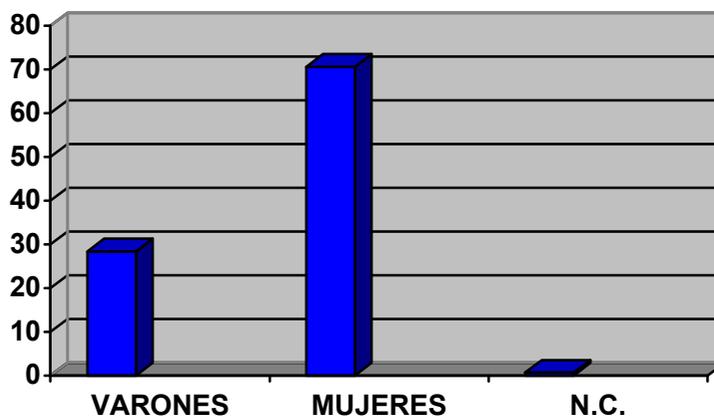


Figura 3.1.2. Distribución de la muestra de melanomas en razón del sexo.

3. Localización

Las lesiones aparecían en la cara en 62 pacientes (47,3%), en el tronco en 14 pacientes (10,6%), en las extremidades superiores (EES) en 13 pacientes (9%), en extremidades inferiores (EEII) en 23 pacientes (17,5%), no constaba la localización en la historia en 19 pacientes (14,5%).(Figura 3.1.3.)

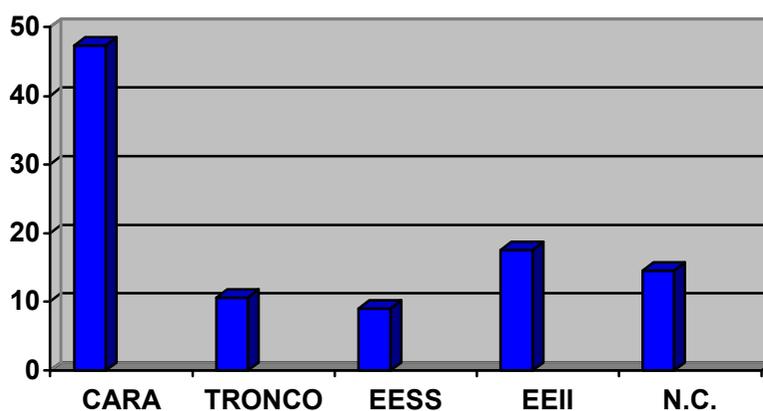


Figura 3.1.3. Distribución de la muestra de melanomas por localización.

4. Localidad de residencia

Teniendo en cuenta la división geográfica propuesta en material y método, nuestro estudio incluyó 5 pacientes (3,8%) que residía en la Zona Norte-2, 28 pacientes (21,3%) en la Zona Norte-1, 25 pacientes (19%) en Zona Centro, 8 pacientes (6,1%) en Zona Sur-1, 6 pacientes (4,4%) en la Zona Sur-2, 3 pacientes (2,2%) procedía de la Gomera y 5 (3,8%) de la Palma. No constaba la residencia en 51 pacientes (38,9%) (Figura 3.1.4.)

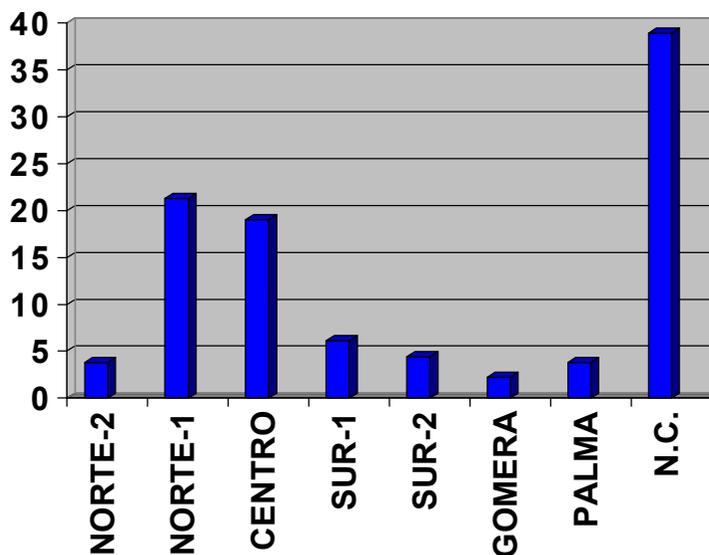


Figura 3.1.4. Distribución de la muestra según la residencia de los pacientes.

3.1.2. DISTRIBUCIÓN DE LA MUESTRA SEGÚN TIPO CLÍNICO

Vamos a analizar a continuación las características de la muestra según los diferentes tipos de tumor.

1. Lentigo maligno o lentigo maligno-melanoma

En la valoración de este tipo de tumor, existe un cierto confusionismo en cuanto a qué se debe incluir dentro del concepto de malignidad, en efecto, aquí se introducen dos hechos uno el Lentigo Maligno propiamente dicho como neoplasia maligna in situ, no invasora, que al menos en lo que a supervivencia se refiere no debería ser incluido ya que muchos autores lo consideran como una lesión premaligna de manera similar a una Queratosis Actínica como lesión premaligna del carcinoma espinocelular y que tampoco se incluye

en las estadísticas de este tumor maligno. Y otros quienes engloban el Lentigo Maligno con el Lentigo Maligno Melanoma como tumor propiamente invasor. Por todo ello el estudio de este apartado se realizara desde los dos puntos de vista, el primero con todos los casos y el segundo segregando los “in situ”.

1.1. Edad

La distribución por edad fue la siguiente: de 30 a 40 años 1 paciente, de 40 a 50 años 4 pacientes, de 50 a 60 años 11 pacientes, de 60 a 70 años 19 pacientes, de 70 a 80 años 17 pacientes y de más de 80 años 6 pacientes. En 1 paciente no constaba la edad.

1.1.bis Edad

La distribución de los Lentigos Malignos Melanomas invasores es la siguiente: de 31 a 40 años 1 paciente, de 41 a 50 años 1 paciente, de 51 a 60 años 2 pacientes, de 61 a 70 años 4 pacientes, de 71 a 80 años 4 pacientes, mas de 81 años 3 pacientes.

1.2. Sexo

Varones 16 y Mujeres 43.

1.2.bis Sexo

Dentro de los casos invasores, se encontró que 6 eran varones y 9 eran mujeres

1.3. Localización

En la cara 51 Melanomas, en EESS encontramos 3, en EEII 1 y no consta en la Historia en 4 casos.

1.3.bis Localización

La distribución de los pacientes con lesiones invasoras, según la localización, fue la siguiente: 11 en la cara, 3 en EESS, 1 en EEII.

1.4. Localidad de Residencia

Los pacientes residían en: Zona Norte-1 16 pacientes, Zona Centro 10 pacientes, Zona Sur-1 4 pacientes, Zona Sur-2 3 pacientes, La Palma 3 pacientes y no tenemos constancia de la residencia en 23 pacientes.

1.4.bis. Localidad de Residencia

Los pacientes que presentaban lesiones de Lentigo Maligno Melanoma invasor residían en: Zona Norte-1 4 pacientes, Zona Centro 2 pacientes, Zona Sur-1 1 paciente, Zona Sur-2 2 pacientes, La Palma 2 pacientes y no consta la localización en la historia de 4 pacientes.

1.5. Supervivencia

Tenemos constancia en la Historia Clínica de una supervivencia de al menos 1 año en 3 pacientes, de al menos 2 años en 4 pacientes, de al menos 3 años en 2 pacientes, de al menos 4 años en 2 pacientes, de al menos 5 años en 2 pacientes, entre 5 y 10 años en 4 pacientes, no encontramos en ninguna historia fallecimiento del paciente y no constan mas datos después de la biopsia en 42 pacientes.

1.5.bis Supervivencia

Solo tenemos constancia de una supervivencia de al menos 1 año en 1 paciente, de al menos 3 años en 1 paciente, de al menos 5 años en 1 paciente, de entre 5 y 10 años en un paciente y no consta mas datos después de la biopsia en 11 pacientes, no teniendo referencia en ningún caso de muerte por este proceso.

2. Melanoma de extensión superficial

2.1. Edad

La distribución por edad fue la siguiente: de 20 a 30 años 1 paciente, de 31 a 40 años 4 pacientes, de 41 a 50 años 7 pacientes, de 51 a 60 años 11 pacientes, de 61 a 70 años 7 pacientes, de 71 a 80 años 6 pacientes y no consta la edad en la Historia en 1 paciente.

2.2. Sexo

De los pacientes con Melanoma de Extensión Superficial 11 eran varones y 26 eran mujeres

2.3. Localización

Las lesiones aparecían en: la cara en 4 pacientes, en el tronco en 8 pacientes, en EESS en 6 pacientes, en EEII en 11 pacientes y no consta la zona afectada en 8 pacientes.

2.4. Localidad de Residencia

Los pacientes residían en: Zona Norte-2, 4 pacientes, Zona Norte-1, 3 pacientes, Zona Centro, 8 pacientes, Zona Sur-1, 3 pacientes, Zona Sur-2, 1 paciente, La Gomera, 2 pacientes, La Palma, 1 paciente y no consta el lugar de residencia en 15 casos.

2.5. Supervivencia

Tenemos constancia en la Historia Clínica de una supervivencia de al menos 1 año en 4 pacientes, de al menos 2 años en 1 paciente, de al menos 3 años en 3 pacientes, de al menos 4 años en 1 paciente, de al menos 5 años en 3 pacientes, entre 5 y 10 años 3 pacientes, un paciente falleció y no consta en la Historia mas datos del paciente en 24 casos.

3. Melanoma nodular

3.1. Edad

La distribución por edad fue la siguiente: de 20 a 30 años 2 pacientes, de 31 a 40 años 4 pacientes, de 41 a 50 años ningún paciente, de 51 a 60 años 5 pacientes, de 61 a 70 años 3 pacientes, de 71 a 80 años 5 pacientes, de 81 a 90 años 3 pacientes y no consta la edad en una Historia.

3.2. Sexo

De los pacientes que presentaron Melanoma Nodular 7 eran varones y 16 eran mujeres.

3.3. Localización

Las lesiones aparecían en: la cara en 7 casos, en el tronco en 6 casos, en EESS 2 casos, en EEII 5 casos y no constaba en la historia clínica en 3 casos.

3.4. Localidad de residencia.

La distribución geográfica de los pacientes fue la siguiente: Zona Norte-2, 1 paciente, Zona Norte-1, 6 pacientes, Zona Centro, 3 pacientes, Zona Sur-1, 1 paciente, Zona Sur-2, 2 pacientes, La Gomera 1 paciente y no consta la residencia en 9 casos.

3.5. Supervivencia.

Nos encontramos con 2 pacientes con una supervivencia de al menos un año después de la intervención, 3 pacientes fallecieron dos lo hicieron a los tres años y uno al año. No encontramos mas datos después de la extirpación biopsia en 18 casos.

4. Melanoma lentiginoso acral

4.1. Edad

La distribución de la edad fue la siguiente: de 31 a 40 años 1 paciente, de 41 a 50 años 3 pacientes, de 51 a 60 años 2 pacientes, de 61 a 70 años 2 pacientes, de 71 a 80 años 2 pacientes y no aparecía la edad en 2 historias clínicas.

4.2. Sexo.

Nos encontramos que de los pacientes con melanoma lentiginoso acral 4 eran varones y 7 mujeres y no constaba en 1 caso

4.3. Localización

La distribución de las lesiones era: en manos 2 casos, en pies 6 casos y no constaba en 4 casos.

4.4. Localidad de residencia

La distribución de los pacientes fue: Zona Norte-1, 3 casos, Zona Centro, 4 casos, La Palma 1 caso y no consta en la historia el lugar de residencia en 4 casos.

4.5. Supervivencia

En 1 caso encontramos una supervivencia de al menos 2 años, en otro caso de al menos 5 años, 2 pacientes presentaban una supervivencia de al menos 10 años, uno mas de 10 años y no constaba mas datos que la biopsia extirpación en 7 casos

3.1.3. COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE MELANOMAS

1. Edad

La distribución por edades de los diferentes tipos de melanoma se reflejan en la Tabla 3.3.1. donde apreciamos que el Melanoma Lentiginoso Acral es el más precoz, ya que su pico de incidencia esta en el segmento de 41-50 años (25% del total de casos), siendo el Lentigo Maligno y el Lentigo Maligno Melanoma los que más tardíamente aparecen. (Figura 3.3.1.).

EDAD	L M		LMM		M E S		M N		M L A		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
20 a 30 ^a .	0	0	0	0	1	2,7	2	8,6	0	0	3	2,2
31 a 40 ^a .	1	1,69	1	6,66	4	10,8	4	17,3	1	8,3	10	7,6
41 a 50 ^a .	4	6,7	1	6,66	7	18,9	0	0	3	25	14	10,6
51 a 60 ^a .	11	18,6	2	13,33	11	29,7	5	21,7	2	16,6	29	22,1
61 a 70 ^a .	19	32,2	4	26,66	7	18,9	3	13	2	16,6	31	23,6
71 a 80 ^a .	17	28,8	4	26,66	6	16,2	5	21,7	2	16,6	30	22,9
> 80 ^a .	6	10,1	3	20	0	0	3	13	0	0	9	7,5
N. Consta	1	1,7	0	0	1	2,7	1	4,3	2	16,6	5	3,8
Totales	59	100	15	100	37	100	23	100	12	100	131	100

Tabla 3.3.1. Edad de todos los casos, clasificados por tipos.

En la Figura 3.3.1 se hace mas gráfico lo anteriormente expuesto.

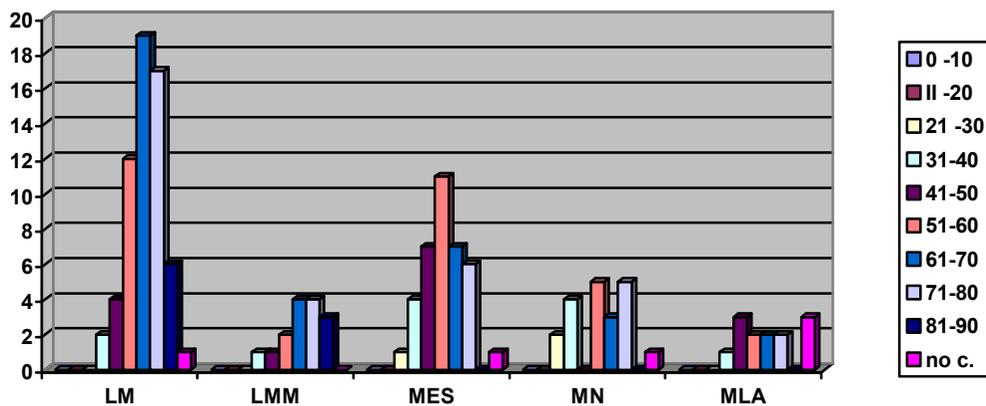


Figura 3.3.1. Distribución por edades de los diferentes tipos de melanomas.

2. Sexo

Como refleja la Tabla 3.3.2., nos encontramos una mayor incidencia de mujeres (70,6%), en todos los tipos de melanomas (Figura 3.3.2.).

SEXO	ML		LMM		MES		MN		MLA		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
VARONES	16	7,8	6	40	11	27,6	7	30,4	4	33,3	38	28,4
MUJERES	43	72,2	9	60	26	72,4	16	69,6	7	58,3	92	70,6
No Consta	0	0	0	0	0	0	0	0	1	8,3	1	0,7
TOTALES	59	100	15	100	37	100	23	100	12	100	131	100

Tabla 3.3.2. Sexo de todas las muestras obtenidas, clasificadas según el tipo de tumor

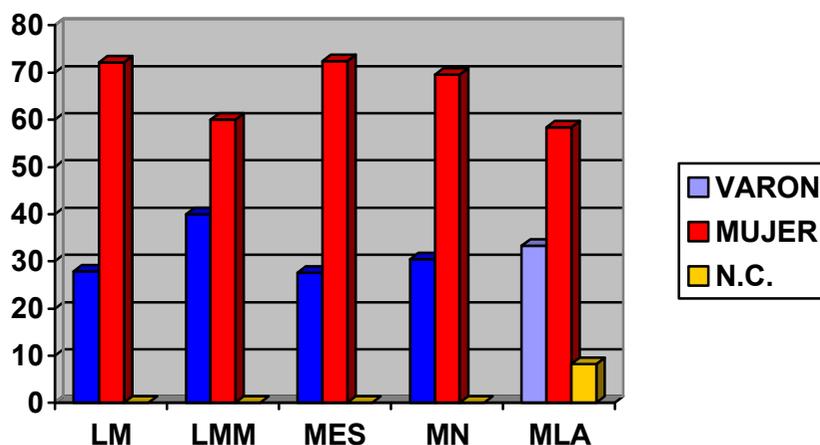


Figura 3.3.2. Distribución de los diferentes tipos de melanoma según el sexo

3. Localización

La comparación de la localización de las lesiones malignas según el tipo de melanoma (Tabla 3.2.2.) refleja que el Lentigo Maligno es más frecuente en cara (82,2%), así como que el Melanoma Lentiginoso Acral lo hace más frecuentemente en extremidades y los restantes lo hacen de forma uniforme por la superficie corporal (Figura 3.3.3.).

LOCALIZACION	LM		LMM		MES		MN		MLA		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
CARA	51	82,2	11	73,3	4	11,4	7	34	0	0	62	47,3
TRONCO	0	0	0	0	8	22,8	6	26	0	0	14	10,6
EESS	3	4,8	3	20	6	17	2	8,6	2	15	13	9
EEII	1	1,6	1	6,66	11	31,4	5	21,7	6	53	23	17,5
No Consta	4	11,4	0	0	8	17	3	13	4	37	19	14,5
TOTALES	59	100	15	100	37	100	23	100	12	100	131	100

Tabla 3.3.3. Localizaciones de todos los casos, clasificados por tipos.

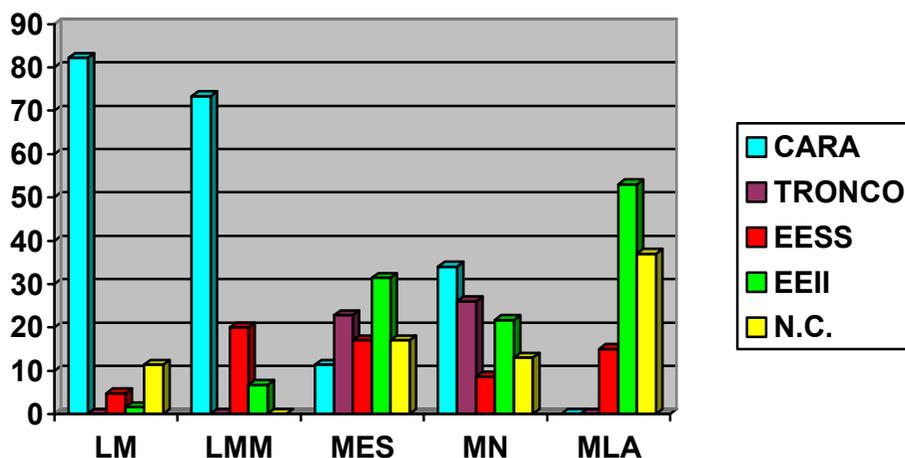


Figura 3.3.3. Distribución de los diferentes tipos de melanomas según la localización.

4. Localidad de Residencia

Respecto a las Zonas de residencia, encontramos en la Tabla 3.3.4. que el M L A es más frecuente en la Zona Norte -1 (25%) y en Centro (33.3%), el resto de tipos se distribuyen de forma uniforme en la provincia (Figura 3.3.4.).

RESIDENCIA	LM		LMM		MES		MN		MLA		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
NORTE-2	0	0	0	0	4	11,4	1	4,3	0	0	5	3,8
NORTE-1	16	27	4	26,6	3	8,5	6	26	3	25	28	21,3
CENTRO	10	16,9	2	13,3	8	22,8	3	13	4	33,3	25	19
SUR-1	4	6,8	1	6,66	3	8,5	1	4,3	0	0	8	6,1
SUR-2	3	5	2	13,3	1	2,8	2	8,7	0	0	6	4,4
GOMERA	0	0	0	0	2	5,7	1	4,3	0	0	3	2,2
LA PALMA	3	5	2	13,3	1	2,8	0	0	1	8,4	5	3,8
NO CONSTA	23	38,9	4	26,6	15	37,1	9	39,1	4	33,3	51	38,9
TOTAL	59	100	15	100	37	100	23	100	12	100	131	100

Tabla 3.3.4. Residencia de todos los casos, clasificados por tipos de melanomas

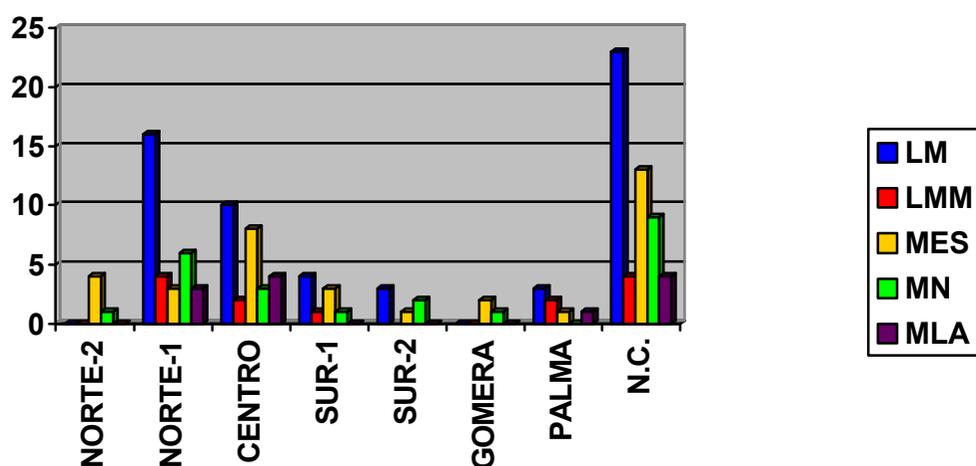


Figura 3.3.4. Distribución de los diferentes tipos según el lugar de residencia.

3.1.4. RESULTADOS DE LAS CLASIFICACIONES PRONOSTICAS APLICADAS AL MELANOMA DE EXTENSIÓN SUPERFICIAL

1. Resultados de los casos estudiados según las clasificaciones propuestas

Hemos estudiado los casos de melanoma de extensión superficial, revisando los índices de Clark, Breslow, así como los diferentes estadios en las clasificaciones de la UICC y la AJCC. Los resultados los vemos reflejados en la siguiente Tabla 3.4.1.

CASO N°	INDICE CLARK	INDICE BRESLOW	UICC	AJCC
5296-82	IV	1,24	1B	IIA
1985-82	II	0,89	1A	IB
640-84	IV	2,96	1B	IIA
2012-84	III	1,547	1B	IIA
3817-84	III	1,18	1A	IB
3343-85	IV	1,56	1B	IIA
5115-85	III	3,5	1B	IIA
809-86	II	1,05	1A	IB
1409-86	III	1,87	1B	IIA
1650-87	II	4,2	1B	IIB
2673-87	IV	2,18	1B	IIA
3987-87	IV	5,7	1B	IIB
4913-87	II	0,44	1A	IA
4190-90	II	0,49	1A	IA
462-91	II	0,29	1A	IA
3541-91	V	14,8	1B	IIB
6812-91	II	0,51	1A	IA
7080-91	I	0	1A	IA
8156-92	II	0,34	1A	IA
690-94	IV	1,6	1B	IIA
2702-94	II	0,46	1A	IA
3808-94	III	2,14	1B	IIA
4051-94	III	1,26	1A	IB

Tabla 3.4.1. Comparación de los estadios histopatológicos.

2. Concordancia de las clasificaciones pronósticas en los casos de melanoma.

Realizamos una revisión de los casos de Melanoma de Extensión Superficial utilizando las hojas realizadas por Cochran en 1962 y por Hardmeier, como modificación de la anterior en 1970. Hemos comparado estas hojas encontrando gran similitud

Cochran	Hardmeier		
	Favorable	Incierto	Desfavorable
Bueno	4 casos	7 casos	
Mediano		1 casos	2 casos
Malo			6 casos

Tabla 3.4.2. Comparación de las hojas pronósticas de Cochran y Hardmeier.

3. Clasificaciones histopatológicas y clínicas relacionadas

En la siguiente tabla 3.4.3. tenemos los resultados de los casos según la puntuación de las hojas de Cochran y Hardmeier, comparándolas con el índice de Clark y el de Breslow, así como los casos clasificados según la UICC Staging System y la American Joint Committee on Cancer Staging System.

CASO N°	HOJA	HOJA	INDICE	INDICE	UICC	AJCC
	COCHRAN	HARDMEIER	CLARK	BRESLOW		
5296-82	Bueno	Incierto	IV	1,24	1B	IIA
1985-82	Malo	Desfavorable	II	0,89	1A	IB
640-84	Bueno	Incierto	IV	2,96	1B	IIA
2012-84	Mediano	Desfavorable	III	1,547	1B	IIA
3817-84	Bueno	Incierto	III	1,18	1A	IB
3343-85	Bueno	Favorable	IV	1,56	1B	IIA
5115-85	Malo	Desfavorable	III	3,5	1B	IIA
809-86	Malo	Desfavorable	II	1,05	1A	IB
1409-86	Bueno	Favorable	III	1,87	1B	IIA
1650-87	Bueno	Incierto	II	4,2	1B	IIB
2673-87	Bueno	Incierto	IV	2,18	1B	IIA
3987-87	Malo	Desfavorable	IV	5,7	1B	IIB
4913-87	Bueno	Incierto	II	0,44	1A	IA
4190-90	Bueno	Favorable	II	0,49	1A	IA
462-91	Mediano	Desfavorable	II	0,29	1A	IA
3541-91	Bueno	Desfavorable	V	14,8	1B	IIB
6812-91	Bueno	Favorable	II	0,51	1A	IA
7080-91	Bueno	Favorable	I	0	1A	IA
8156-92	Bueno	Favorable	II	0,34	1A	IA
690-94	Malo	Desfavorable	IV	1,6	1B	IIA
2702-94	Bueno	Favorable	II	0,46	1A	IA
3808-94	Mediano	Desfavorable	III	2,14	1B	IIA
4051-94	Mediano	Desfavorable	III	1,26	1A	IB

Tabla 3.4.3. Comparación de las tablillas, con el estadio de cada uno.

3.2. RESULTADOS DE FISH EN EL MELANOMA DE EXTENSIÓN SUPERFICIAL

3.2.1 SONDAS DE SECUENCIA UNICA

Se estudiaron 3 sondas de secuencia única correspondientes a los oncogenes HST, INT-2 y P58. Las hibridaciones se realizaron sobre 20 casos preseleccionadas que correspondían a Melanomas de Extensión Superficial. Fueron identificadas con el mismo número de registro de entrada del departamento de Anatomía Patológica de Hospital Universitario de Canarias.

1. Controles de hibridación y criterios de amplificación

El control de falsos positivos y negativos para descartar amplificaciones inespecíficas se realizó, para cada Caso, mediante el análisis de la epidermis sana, en la que encontramos núcleos no tumorales, de tamaño uniforme y de forma redondeada que corresponden con el queratinocito. Estos núcleos deben presentar siempre de forma mayoritaria una o dos señales definidas.

Además, nos encontramos otra serie de núcleos mas pequeños que los de los queratinocitos que corresponden a linfocitos presentes en dermis como zona inflamatoria peritumoral. De éstos, no se contabilizaron las señales presentes, en ningún caso.

Los núcleos tumorales son grandes, de bordes irregulares y de fácil reconocimiento. Se consideró que la sonda (el oncogen) estaba amplificada en el tumor si estos núcleos apa-

recían con mas de dos señales de hibridación. El criterio de amplificación es, para este tipo de técnica por hibridación, esencialmente cualitativo. Los grados de amplificación y su presentación fueron variables. En algunos Casos la amplificación génica se manifestó en forma de señales múltiples dispersas por el núcleo. En otras ocasiones las señales múltiples aparecían agrupadas en dos acúmulos dentro del núcleo. Por último, en algunos casos el grado de amplificación fue muy elevado y las copias del gen ocupan la práctica totalidad del núcleo. En las tres situaciones descritas se consideró amplificación. La presencia de núcleos con amplificación también fue heterogénea. En algunos casos toda la zona tumoral presentaba núcleos con amplificación, mientras que en otros casos, los núcleos afectados se presentaban en islotes aislados. Si los núcleos presentaban una o dos señales, se consideraron como no amplificados.

2. P58

La descripción detallada de cada caso es la siguiente:

- Caso 2012-84: Amplificada. Encontramos aumento en el número de señales, así como el tamaño de la misma, los núcleos amplificados se agrupan en zonas y raramente están de forma aislada. La zona no patológica (epidermis) no está amplificada, apreciándose dos señales en todos los núcleos.
- Caso 5296-82: No amplificada. En la zona no patológica se parecían dos señales en todos los núcleos, en la zona patológica se aprecia señal de gran intensidad pero única, que afecta solamente a núcleos aislados.

-
- Caso 1985-82: Amplificada. En la zona no patológica se aprecian 2 señales en la casi totalidad de los núcleos de los queratinocitos, en la zona tumoral la señal afecta a la casi totalidad del núcleo, como múltiples puntos muy pequeños.
 - Caso 640-84: No amplificada. Se aprecian dos señales en la zona tumoral.
 - Caso 3987-87: No amplificada. En zona tumoral y en zona de núcleos no patológicos se aprecian dos señales en todos los núcleos.
 - Caso 5115-85: No amplificada. Encontramos dos señales en todos los núcleos tanto de zona tumoral como la no tumoral
 - Caso 3817-84: No amplificada. En zona de epidermis encontramos dos señales en la mayoría de epidermis y hay una zona con más señal en núcleos aparentemente normales, en la zona de núcleos grandes tumorales encontramos normalmente dos señales, apreciándose núcleos con mas señal.
 - Caso 3343-85: No amplificada. En zona no tumoral dos señales en todos los núcleos, lo mismo que en núcleos tumorales.
 - Caso 1650-87: No amplificada. En zona de epidermis así como en zona tumoral se aprecian núcleos con dos señales.
 - Caso 2673-87: No amplificada. Encontramos dos señales en todos los núcleos tanto tumorales como de control.
 - Caso 809-86: No encontramos señal en ninguno de los núcleos.
 - Caso 307-87: No amplificada. Se aprecian dos señales claras en todos los núcleos patológicos.

-
- Caso 5481-89: No amplificada. Se aprecian núcleos tumorales con muchas señales, aunque de forma dificultosa debido al exceso de fluorescencia sobrenadante (background).
 - Caso 462-91: No se aprecia señal en ninguno de los núcleos.
 - Caso 4190-90: No amplificada. Se aprecian dos señales en los núcleos patológicos además de mucho background, la zona de núcleos normales con dos señales.
 - Caso 6331-90: No amplificada. Se aprecian dos señales claras en zonas de núcleos patológicos, la zona control con dos señales en todos los núcleos.
 - Caso 3140-89: No amplificada. Se aprecia mucha fluorescencia en periferia de núcleos, que corresponde a restos de citoplasma por defecto de digestión. Por lo que se aprecia dificultosamente la señal.
 - Caso 320-90: No amplificada. Se aprecia mucho background por defecto de limpieza con PBD en los pasos de detección por fluorescencia, lo que dificulta la visualización de las señales, no pudiendo decir si las señales están en los núcleos o son sobrenadante.
 - Caso 489-90: No amplificada. Encontramos núcleos con múltiples señales tanto en epidermis en los núcleos uniformes considerados como control y las zonas en dermis con núcleos grandes, algunos de los cuales están fusionados o superpuestos. Hay zonas con mucho background que dificultan la visualización

Encontramos 3 casos amplificados (15%) y 17 casos no amplificados (85%).

Los resultados de cada caso con el oncogen P58 y su clasificación patológica se recogen en la Tabla 3.5.1.

Caso n°.	Amplificación	Indice de Clark	Indice de Breslow
2012-84	Si	III	1.54
5296-82	No	IV	1.24
1985-82	Si	II	0.89
640-84	No	IV	2.96
3987-87	No	IV	5.7
5115-85	No	III	3.5
3817-84	No	III	1.18
3343-85	No	IV	1.56
1650-87	No	II	4.2
2673-87	No	IV	2.18
809-86	No	II	1.05
307-87	No	III	1.95
462-91	No	II	0.29
4190-90	No	II	0.49
4913-87	No	II	0.44
6331-90	No	II	0.69
5481-89	Si	II	0.69
3140-89	No	IV	1.66
320-90	No	IV	2.45
489-90	No	II	0.55

Tabla 3.5.1. Resultados de la hibridación con la sonda del oncogen P- 58

3. Int-2

La descripción detallada de cada caso es la siguiente:

- Caso 2012-84: No amplificado. Se aprecian dos señales en los queratinocitos, así como zona tumoral clara sin ninguna amplificación, solo un núcleo aislado esta amplificado, se aprecia background.
- Caso 5296-82: Amplificada. Encontramos núcleos de zona patológica con clara amplificación así como algún núcleo no amplificado, la zona control con dos señales.
- Caso 640-84: Amplificada. Existen núcleos aislados con señal enorme que cubre todo el núcleo, así como otros con dos señales muy claras.
- Caso 3987-87: No amplificada. Los núcleos de la zona no tumoral presentan dos señales de forma clara, en núcleos con características de no tumorales localizados en dermis que podrían corresponder con linfocitos se aprecia amplificación, probablemente artefactadas. La señal muy marcada que encontramos en el borde de algunos núcleos corresponde a restos de citoplasma.
- Caso 5115-85: Amplificada. Encontramos muchas señales en núcleos patológicos mas evidentes en zona apical del tumor, en cambio en la zona basal de este tumor pedunculado no es tan manifiesta.
- Caso 3817-84: No amplificada. En epidermis núcleos con dos señales, además encontramos unas señales intensas dentro de algunos núcleos, que podría corresponder con bacterias o ser contaminante. En núcleos tumorales la amplificación se hace dudosa ya que presenta mucho background, algunos de los núcleos tumorales no tienen señal alguna.

-
- Caso 3343-85: No amplificada. Encontramos dos señales en todos los núcleos tanto patológicos como en los controles.
 - Caso 1650-87: No amplificada. Los núcleos presentan dos señales muy claras tanto los queratinocitos como los del melanoma.
 - Caso 2673-87: No amplificada. Todos los núcleos con dos señales.
 - Caso 809-86: No amplificada. Está muy digerida con lo que la mayoría de núcleos se han roto y se han unido en una masa compacta.
 - Caso 307-87: No amplificada. Tanto en epidermis como en dermis nos encontramos núcleos con dos señales.
 - Caso 462-91: Amplificada. En zona de epidermis núcleos con dos señales. En dermis los núcleos presentan clara amplificación (mas de dos señales).
 - Caso 4190-90: Amplificada. La zona tumoral presenta más de dos señales en todos los núcleos.
 - Caso 4913-87: No amplificada. Nos encontramos con dos señales en todos los núcleos.
 - Caso 6331-90: Amplificada. Presenta en zona de epidermis dos señales en cada núcleo. En los núcleos de zona patológica encontramos dos, tres, cuatros y cinco señales.
 - Caso 5481-89: Amplificada. Los núcleos de la zona tumoral presentan clara amplificación.
 - Caso 3140-89: Amplificada. Encontramos dos señales en algunas zonas y otras presentan más señales.

-
- Caso 320-90: Amplificada. Los núcleos de los queratinocitos presentan dos señales, en cambio en zona tumoral la mayoría de núcleos presentan mas de dos señales.
 - Caso 489-90: Amplificada. La zona de núcleos tumorales presentan muchas señales.

Encontramos 10 casos amplificadas (50%) y 10 casos no amplificadas (50%).

Los resultados de cada caso con el oncogen Int-2 y la clasificación patológica se recogen en la Tabla 3.5.2

Caso n°.	Amplificación	Indice de Clark	Indice de Breslow
2012-84	No	III	1.57
5296-82	Si	IV	1.24
1985-82	No	II	0.89
640-84	Si	IV	2.96
3987-87	No	IV	5.7
5115-85	Si	III	3.5
3817-84	No	III	1.18
3343-85	No	IV	1.56
1650-87	No	II	4.2
2673-87	No	IV	2.18
809-86	No	II	1.05
397-87	No	III	1.95
462-91	Si	II	0.29
4190-90	Si	II	0.49
4913-87	No	II	0.44
6331-90	Si	Recidiva	
5481-89	Si	II	0.69
3140-89	Si	IV	1.66
320-90	Si	IV	2.45
489-90	Si	II	0.55

Tabla 3.5.2 Resultados de la hibridación con la sonda del oncogen Int-2

4. HST

La descripción detallada de cada caso es la siguiente:

- Caso 5296-82: No amplificada. En la epidermis dos señales en todos los núcleos. En la zona tumoral encontramos núcleos con mucha señal a modo de amplificación granular.
- Caso 1985-82: Amplificada. Con muchas señales en la mayoría de los núcleos.
- Caso 2012-84: No amplificada. La Caso no presenta núcleos con señal.
- Caso 3987-87: No amplificada. Encontramos dos señales en todos los núcleos tanto de epidermis como de zona tumoral.
- Caso 5115-85: Amplificada. En la epidermis dos señales. En los núcleos de la zona tumoral se observa clara amplificación todos con mas de dos señales. Grado maximo de amplificación.
- Caso 3817-84: Amplificada. En la epidermis encontramos dos señales en todos los núcleos. En la dermis encontramos núcleos con mas de dos señales y otros con dos señales, por lo que hemos considera amplificación.
- Caso 3343-85: Amplificada. La epidermis con dos señales. Los núcleos de zona patológica están la mayoría amplificados, con pequeñas zonas con solo dos señales.
- Caso 1650-87: No amplificada. No encontramos amplificación en ninguna de los núcleos.
- Caso 2673-87: No amplificada. No encontramos amplificación en ninguna de los núcleos.
- Caso 809-86: No amplificada. Sin amplificación en ninguno de los núcleos.

-
- Caso 307-87: No amplificada. Encontramos núcleos agrupados formando una masa compacta que creemos sea debido a exceso de digestión o por exceso de calor en la hibridación.
 - Caso 6331-90: No amplificada. Se aprecian dos señales en todas las células estudiadas.
 - Caso 5481-89.- No amplificada. Núcleos patológicos con dos señales.
 - Caso 462-91: No amplificada. Los núcleos tanto de células control como de las patológicas solo presentan dos señales.
 - Caso 3140-89: No amplificada. Nos encontramos dos señales en los núcleos tumorales.
 - Caso 489-90: Amplificada. Los núcleos de los queratinocitos con dos señales. Los núcleos de las células tumorales presentan mas de dos señales, incluso algunos núcleos pequeños presentan aumento en el numero de señales.
 - Caso 320-90: Amplificada. Los núcleos de células tumorales presentan amplificación.
 - Caso 4913-87: No amplificada. Tanto los controles como los patológicos solo presentan dos señales.
 - Caso 4190-90: Amplificada. Encontramos dos, tres, cuatro y cinco señales en los núcleos de las células tumorales.

Encontramos 8 casos con amplificación (40%) y 12 no amplificadas (60%).

Los resultados con cada caso con el oncogen HST y la clasificación patológica se recogen en la tabla 3.5.3

Caso N°	Amplificación	Indice de Clark	Indice de Breslow
2012-84	No	III	1.547
5296-82	Si	IV	1.24
1985-82	Si	II	0.89
640-84	No	IV	2.96
3987-87	No	IV	5.7
5115-85	Si	III	3.5
3817-84	Mixto	III	1.18
3343-85	Si	IV	1.56
1650-87	No	II	4.2
2673-87	No	IV	2.18
809-86	No	II	1.05
307-87	No	III	1.95
462-91	No	II	0.29
4190-90	Si	II	0.49
4913-87	No	II	0.44
6331-90	No	Récidiva	
5481-89	No	II	0.69
3140-89	No	IV	1.66
320-90	Si	IV	2.45
489-90	Si	II	0.55

Tabla 3.5.3 resultados de la hibridación con la sonda del oncogen HST

5. Comparación de los tres oncogenes

En los 20 casos estudiados se han realizado estudios de amplificación de tres oncogenes por lo que se ha hecho en análisis comparativo de co-amplificación. El oncogen Int-2 es el más amplificado, en un 50% de los casos estudiados, de ellos un 25% lo hace conjuntamente con el HST (co-amplificación). El oncogen HST lo encontramos amplificado en el 40%, un 25% en co-amplificación y en un 15% lo hace solo. Además, tomando los dos oncogenes que pertenecen a la misma familia, HST e Int-2, el 65% de los tumores presentaron amplificación de al menos uno de ellos.

Solo en un caso encontramos amplificación en los tres oncogenes.

Para mas detalle ver Tabla 3.5.4.

Caso N°	P-58	Int-2	HST
2012-84	Si	No	No
5296-82	No	Si	Si
1985-82	Si	No	Si
640-84	No	Si	No
3987-87	No	No	No
5115-85	No	Si	Si
3817-84	No	No	Si
3343-85	No	No	Si
1650-87	No	No	No
2673-87	No	No	No
809-86	No	No	No
307-87	No	No	No
462-91	No	Si	No
4190-90	No	Si	Si
4913-87	No	No	No
6331-90	No	Si	No
5481-89	Si	Si	No
3140-89	No	Si	No
320-90	No	Si	Si
489-90	Si	Si	Si

Tabla 3.5.4. Resultados comparados de hibridación de los oncogenes

3.2.2. SONDAS CENTROMERICAS

1. Controles de hibridación y criterios de polisomía

Para el estudio de polisomías en estos tumores se llevó a cabo el recuento de núcleos con 1, 2, 3, 4, o más de 4 señales. Para alcanzar significación se contabilizaron, al menos, 200 núcleos. En primer lugar se definió el criterio de corte para determinar si un caso es polisómico. Para ello es necesario establecer en que grado aparecen núcleos trisómicos o polisómicos, en la población celular normal o no tumoral. Se realizó un control de polisomía realizando un recuento de 200 núcleos, como mínimo en varias muestras de epidermis para cada cromosoma. Se considero que un caso es polisómico para ese cromosoma, cuando el porcentaje de núcleos polisómicos observados supera al valor medio (media mas desviación típica), obtenido en epidermis.

2. Cromosoma 1

- Caso control de epidermis:

Control 1: 1 señal 80 (40%), 2 señales 104 (52%), 3 señales 10 (5%), 4 señales (3%), total 200.

Control 2: 1 señal 97 (48.5%), 2 señales 102 (51%), 3 señales 1 (0.5%), total 200.

- Caso 5296-82: Zona patológica: 1 señal 25 (12.8%), 2 señales 88 (45.1%), 3 señales 47 (24.1%), 4 señales 28 (14.3%), mas de 4 señales 7 (3.5%), total 195.

- Caso 1650-87: Zona patológica: 1 señal 33 (13.5%), 2 señales 123 (50.6%), 3 señales 66 (27.1), 4 señales 12 (4.9%), mas de 4 señales 9 (3.7%), total 243
- Caso 1985-82: Zona patológica: 1 señal 10 (6.4%), 2 señales 98 (63.2), 3 señales 35 (22.5%), 4 señales 10 (6.4%), mas de 4 señales 2 (1.2%), total 155.
- Caso 3343-85: Zona patológica: 1 señal 34 (15.3%), 2 señales 124 (55.8%), 3 señales 44 (19.8%), 4 señales 18 (8.1%), mas de 4 señales 2 (0.9%), total 224.
- Caso 2673-87: Zona patológica: 1 señal 15 (6.6%), 2 señales 84 (37.5%), 3 señales 58 (25.8%), 4 señales 42 (18.7%), mas de 4 señales 25 (11.2%), total 224.

Los resultados con cada Caso con la sonda del cromosoma 1 y la clasificación patológica se recogen en la tabla 3.5.5.

Caso Nº	Nº de señales (%)					Polisomías	Indice de Clark	Indice de Breslow
	1	2	3	4	>4			
2012-84						No valorable	III	1.547
5296-82	12.8	45.1	24.1	14.3	3.6	++	IV	1.24
1985-82	6.4	63.2	22.5	6.4	1.2	++	II	0.89
5115-85						No valorable	III	3.5
3343-85	15.3	55.8	19.8	8.1	0.9	+	IV	1.56
1650-87	13.5	50.6	27.1	4.9	3.8	++	II	4.2
2673-87	6.7	37.5	25.8	18.7	11.2	++	IV	2.18
307-87						No valorable	III	1.95

Tabla 3.5.5. Resultados de la hibridación con la sonda centromérica del cromosoma 1

El punto de corte, determinado por el control de hibridación negativo, quedó establecido en el 8%. Se consideró un grado de polisomía moderado cuando el porcentaje de núcleos polisómicos no superaba el 30%, representado en la tabla con una señal +. Como se aprecia en la tabla únicamente un caso (3343-85) presentaba polisomía moderada mientras que en el resto la cantidad de núcleos superaba el 30%, representado en la tabla con dos señales ++.

3. Cromosoma 6

- Muestras control de epidermis:

Zona control 1: 1 señal 92 (43%), 2 señales 121 (56.9%), total 213.

Zona control 2: 1 señal 87 (46.6%), 2 señales 102 (50.4%), 3 señales 15 (7.3%), total 204.

- Caso 426-91: Zona patológica: 1 señal 52 (22.2%), 2 señales 136 (58.1%), 3 señales 40 (17%), 4 señales 6 (2.5%), total 234.
- Caso 6331-90: Zona patológica: 1 señal 22 (8.4%), 2 señales 150 (57.6%), 3 señales 78 (30%), 4 señales 10 (3.8%), total 260.
- Caso 2012-84: Zona patológica: 1 señal 45 (23.8%), 2 señales 93 (49.2%), 3 señales 42 (22.2%), 4 señales 9 (4.7%), total 189.
- Caso 489-90: Zona patológica: 1 señal 40 (12.6%), 2 señales 180 (56.9%), 3 señales 72 (22.7%), 4 señales 16 (5%), más de 4 señales 8 (2.5%), total 316.
- Caso 3541-91: Zona patológica: 1 señal 27 (17%), 2 señales 113 (57.9%), 3 señales 46 (23.5%), 4 señales 7 (3.5%), más de 4 señales 2 (1%), total 195.

- Caso 320-90.- Zona patológica: 1 señal 64 (22.8%), 2 señales 168 (60%), 3 señales 44 (15.7%), 4 señales 2 (0.7%), más de 4 señales 2 (0.7%), total 240.
- Caso 1583-91: Zona patológica: 1 señal 50 (25.7%), 2 señales 112 (57.7%), 3 señales 26 (13.4%), 4 señales 5 (2.5%), mas de 4 señales 1 (0.5%), total 194.
- Caso 3140-89: Zona patológica: 1 señal 42 (42%), 2 señales 46 (46%), 3 señales 12 (12 %), total 200.

Los resultados de cada caso con el Cromosoma 6 y la clasificación patológica se recogen en la tabla 3.5.6.

Caso Nº	Nº de señales (%)					Polisomías	Indice de Clark	Indice de Breslow
	1	2	3	4	>4			
2012-84	23.8	49.2	22.2	4.7		+	III	1.547
462-91	22.2	58.1	17	2.5		+	II	0.29
6331-90	8.4	57.6	30	3.8		++	Recidiva	
3140-89	42	46	12			+	IV	1.66
320-90	22.8	60	15.7	0.7	0.7	+	IV	2.45
489-90	12.6	56.9	22.7	5	2.5	++	II	0.55
3541-91	17	57.9	23.5	3.5	1	+	V	14.1
1583-91	25.7	57.7	13.4	2.5	0.5	+	II	0.40

Tabla 3.5.6. Resultados de la hibridación con la sonda centromerica del cromosoma 6

Dentro de los casos estudiados y conociendo el rango de corte (7,3%), encontramos 6 casos con polisomia moderada y 2 con polisomia marcada, si bien estos se aproximan todos al 30%.

4. Cromosoma 7

- Caso control de epidermis:

Control 1: 1 señal 50 (23.1%), 2 señales 162 (75%), 3 señales 4 (1.8%), total 216.

Control 2: 1 señal 87 (43.5%), 2 señales 106 (53%), 3 señales 7 (3.5%), total 200.

Control 3: 1 señal 61 (27.9%), 2 señales 154 (70.6%), 3 señales 3 (1.3%), total 18.

- Caso 3817-84: . Zona Patológica: 1 señal 24 (10.6%), 2 señales 84 (37.1%), 3 señales 81 (35.8%), 4 señales 24 (10.6%), más de 4 señales 13 (5.7%), total 226.
- Caso 5481-89: Zona patológica: 1 señal 9 (4.3%), 2 señales 51 (24.6%), 3 señales 97 (46.8%), 4 señales 28 (13.5%), más de 4 señales 22 (10.6%), total 207.
- Caso 809-86: Zona patológica: 1 señal 70 (28%), 2 señales 110 (44%), 3 señales 70 (28%), 4 señales 10 (4%), total 260.
- Caso 3987-87: Zona patológica: 1 señal 8 (4%), 2 señales 37 (18.5%), 3 señales 99 (49.5%), 4 señales 42 (21%), más de 4 señales 15 (7.5%), total 200.
- Caso 307-87: Zona patológica: 1 señal 5 (2.3%), 2 señales 57 (27.1%), 3 señales 108 (51.4%), 4 señales 30 (14.2%), más de 4 señales 10 (4.7%), total 210.
- Caso 2012-84: Zona patológica: 1 señal 2 (0.9%), 2 señales 40 (19.3%), 3 señales 97 (46.8%), 4 señales 48 (23.1%), más de 4 señales 20 (9.6%), total 207.

- Caso 4913-84: Zona patológica: 1 señal 2 (0.8%), 2 señales 74 (30%), 3 señales 126 (51.2%), 4 señales 36 (14.6%), más de 4 señales 8 (3.2%), total 246.
- Caso 3140-89: Zona patológica: 1 señal 5 (2.3%), 2 señales 60 (28.5%), 3 señales 85 (40.4%), 4 señales 40 (19%), más de 4 señales 20 (9.5%), total 210.

Los resultados de cada caso con el Cromosoma 7 y la clasificación patológica se recogen en la Tabla 3.5.7.

Caso Nº	Nº de señales (%)					Polisomías	Índice de Clark	Índice de Breslow
	1	2	3	4	>4			
2012-84	0.9	19.3	46.8	23.1	9.6	++	III	1.547
3987-87	4	18.5	49.5	21	7.5	++	IV	5.7
3817-84	10.6	37.1	35.8	10.6	5.7	++	III	1.18
809-86	28	44	28			+	II	1.05
307-87	2.3	27.1	51.4	14.2	4.7	++	III	1.95
4913-87	0.8	30	51.2	14.6	3.2	++	II	0.44
5481-89	4.3	24.6	46.8	13.5	10.6	++	II	0.69
3140-89	2.3	28.5	40.4	19	9.5	++	IV	1.66

Tabla 3.5.7. Resultados de la hibridación con la sonda centromérica del cromosoma 7

Para este cromosoma el rango de corte estaba en 3,5%. Solo un caso presenta polisomía moderada, el resto 7 presentaban una marcada polisomía (++), siendo este el cromosoma con más polisomía de los cuatro estudiados.

5. Cromosoma 10

- Caso control de epidermis:

Control 1: 1 señal 93 (38%), 2 señales 148 (60%), 3 señales 4 (1.4%), total 245.

Control 2: 1 señal 104 (47%), 2 señales 105 (47.5%), 3 señales 12 (5.5%), total 221.

Control 3: 1 señal 94 (46.3), 2 señales 105 (51.7%), 3 señales 5 (2.4%), total 203.

- Caso 5296-82: Zona patológica: 1 señal 115 (55.9%), 2 señales 75 (36.2%), 3 señales 15 (7.2%), 4 señales 2 (0.7%), total 207.

- Caso 1985-82.- Zona patológica: 1 señal 95 (37.5%), 2 señales 129 (51%), 3 señales 22 (8.7%), 4 señales 6 (2.4%), más de 4 señales 1 (0.4%), total 253.

- Caso 2012-84: Zona patológica: 1señal 47 (19.9%), 2 señales 122 (51.7%), 3 señales 43 (18.2%), 4 señales 17 (7.2%), mas de 4 señales 7 (3%), total 236.

- Caso 5115-85.- Zona patológica: 1 señal 26 (12.6%), 2 señales 96 (46.6%), 3 señales 54 (26.2%), 4 señales 24 (11.6%), más de 4 señales 6 (2.9%), total 206.

- Caso 3343-85.- Zona patológica: 1 señal 87 (41.8%), 2 señales 88 (42.3%), 3 señales 30 (14.4%), 4 señales 3 (1.5%), total 208.

Los resultados con cada Caso con el Cromosoma 10 y la clasificación patológica se recogen en la Tabla 3.5.8.

Caso N°	N° de señales (%)					Polisomías	Índice de Clark	Índice de Breslow
	1	2	3	4	>4			
2012-84	19.9	51.7	18.2	7.2	3	+	III	1.547
5296-82	55.9	36.2	7.2	0.7		+	IV	1.24
1985-82	37.5	51.0	8.7	2.4	0.4	+	II	0.89
640-84						No valorable	IV	2.96
5115-85	12.5	46.8	26.5	10.9	3	++	III	3.5
3817-84						No valorable	III	1.18
3343-85	41.8	42.3	14.4	1.5		+	IV	1.56
809-86						No valorable	II	1.05

Tabla 3.5.8. Resultados de la hibridación con la sonda centromérica del cromosoma 10

Considerando el rango de corte (5,5%), este cromosoma presenta polisomía moderada ya que solo uno de los casos presentaban más del 30% de núcleos con 3,4 o más señales, siendo el resto muy próximos incluso al rango de corte.

6. Estudio comparativo de las sondas centroméricas

Encontramos que todas las sondas presentan polisomías, pero si bien los cromosomas 10 y 6 solo tenían trisomía en el 15% y 19.5% de los casos respectivamente, en cambio los cromosomas 1 y 7 presentaban trisomías en el 23.8% y 43.7% de los casos y tetrasomías en el 10.4% y 14.5% respectivamente.

Los resultados comparativos de los diferentes cromosomas estudiados los vemos en la Tabla 3.5.9.

Cromosoma	N° de casos	% de corte	N° de señales (%)				
			1	2	3	4	>4
1	5	8%	10.9	50.4	23.8	10.4	4.14
6	8	7,3%	21.8	55.4	19.5	3.0	1.5
7	8	3,5%	6.65	28.6	43.7	14.5	6.35
10	5	5,5%	23.5	45.6	15	4.36	1.28

Tabla 3.5.9. Resultados comparativos de los diferentes cromosomas y porcentaje de polisomias

3.3. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS CLÍNICOS, HITOLÓGICOS Y GENÉTICOS.

En la tabla 3.6. se presentara, para su comparación, los resultados de puntuación obtenidos según las hojas de Cochran y Hardmeier con los resultados obtenidos con los onco-genes estudiados Int-2 y HST y el diferente estadio de los casos según la UICC y la American Joint Committee on Cancer staging system.

CASO N°	HOJA COCHRAN	HOJA HARDMEIER	Int -2	HST	UICC	AJCC
5296-82	Bueno	Incierto	+	+	1B	IIA
1985-82	Malo	Desfavorable	-	+	1A	IB
640-84	Bueno	Incierto	-	-	1B	IIA
2012-84	Mediano	Desfavorable	-	-	1B	IIA
3817-84	Bueno	Incierto	-	+	1A	IB
3343-85	Bueno	Favorable	-	+	1B	IIA
5115-85	Malo	Desfavorable	+	+	1B	IIA
809-86	Malo	Desfavorable	-	-	1A	IB
6331-90	Bueno	Incierto	+	-	1A	1A
1650-87	Bueno	Incierto	-	-	1B	IIB
2673-87	Bueno	Incierto	-	-	1B	IIA
3987-87	Malo	Desfavorable	-	-	1B	IIB
4913-87	Bueno	Incierto	+	-	1A	IA
4190-90	Bueno	Favorable	+	+	1A	IA
462-91	Mediano	Desfavorable	+	-	1A	IA
307-87	Bueno	Favorable	-	-	1A	IA
5481-89	Bueno	Incierto	+	-	1A	IA
3140-89	Malo	Desfavorable	+	-	1B	IIA
320-90	Mediano	Incierto	+	+	1B	IIA
489-90	Malo	Desfavorable	+	+	1A	IA

Tabla 3.6. Comparación del grado de pronóstico y la amplificación de oncogenes.

Si comparamos los resultados obtenidos en la amplificación de los casos estudiados con los pronósticos bueno y malo (Cochran), encontramos que, de los de buen pronóstico, el 50% de los casos no está amplificado, el 30% presenta amplificación en Int-2 o HST y solo el 20% presenta amplificación tanto en HST como Int-2. En cambio, en los casos de pronóstico malo, el 66,6 % está amplificado, 33,3% tiene amplificado al menos uno de ellos y el otro 33,3 % presenta amplificación tanto de HST como Int-2.

Los resultados de las hojas de Hardmeier nos clasifican 3 casos como favorables, 9 casos como de pronóstico incierto y 8 casos con pronóstico desfavorable. Si esto lo comparamos con la amplificación de los oncogenes de la misma familia HST e Int-2 nos encontramos:

- De los 3 casos favorables, 1 era negativo para los dos oncogenes, 1 era positivo solo para el oncogen HST y el tercero estaba co-amplificado para estos dos oncogenes.
- De los 9 inciertos, 1 era positivo para el oncogen HST, 3 estaban amplificados para el oncogen Int-2, 2 estaban co-amplificados y 3 no presentaban amplificación para ninguno de los oncogenes.
- De los 8 casos con pronóstico desfavorable, 1 era positivo para el oncogen HST, 2 casos presentaron amplificación para el oncogen Int-2, 2 casos presentaban co-amplificación y 3 casos no presentaban amplificación para estos oncogenes.

4. DISCUSIÓN

4.1. DISCUSIÓN CLÍNICO-PATOLÓGICAS

4.1.1. INCIDENCIA DEL MELANOMA EN LA COMUNIDAD AUTONOMA DE CANARIAS (C.A.C.)

Para este estudio tomaremos como referencia el estudio que realizó el servicio Canario de Salud sobre incidencia de cáncer en las islas de Tenerife y Gran Canaria en el año 1993. Este estudio se revisa los cánceres según consta en los servicios de anatomía patológica, admisión, archivos, registros hospitalarios y diferentes servicios clínicos, hematológicos y de radiodiagnóstico de hospitales públicos y privados, en laboratorios privados de anatomía patológica y en los registros civiles de los municipios con mayor número de habitantes de cada isla.

En Gran Canaria durante 1993 se registraron un total de 35 casos nuevos de melanomas invasivos en piel. De éstos 14 se diagnosticaron en hombres (tasa bruta 4.22 por 100.000) y 21 mujeres (tasa bruta 6.28 por 100.000). Esto supone 1.3% del total de tumores malignos nuevos diagnosticados en los hombres y el 2.5% en mujeres durante ese año.

En Tenerife durante el año 1993 se registraron 17 casos nuevos de melanoma invasivos en piel. Los casos fueron diagnosticados en H.U.C. 5 casos, H. La Candelaria 7 casos, H. Del Torax 1 caso, H. San Juan de Dios 2 casos, Clínicas Privadas 2 casos. De éstos, 6 se diagnosticaron en hombres (tasa bruta de 1.96 por 100.000) y 11 en mujeres (tasa bruta de 3.47 por 100.000). Esto supone el 0,6% del total de tumores malignos nuevos diagnosticados en los hombres y el 1.48% en las mujeres.

Es importante señalar, que en esta revisión no han incluido los casos de Melanosis Precancerosa de Drubeuhl, que son lesiones de melanoma in situ del Melanoma Lentiginoso (Ackerman 1979)

En nuestro estudio se recogen 5 casos de melanoma invasivos en piel diagnosticados en el HUC durante 1993, de los cuales 2 eran mujeres y 3 eran hombres. Esto significa el 29,4 de la totalidad de los casos registrados por el Servicio Canario de Salud

Estas cifras colocan a las dos islas y tanto en hombres como en mujeres en un lugar intermedio-bajo con relación al entorno europeo (Boyle P y col. 1995); los registros españoles presentan en este tumor unos valores similares (Rubio 1991). Ambos registros quedan alejados de las cifras mundiales más altas que alcanzan un valor en la tasa estandarizada de 33.1 por 100.000 y año (Australia, Nueva Gales del Sur) en hombres y 29.8 por 100.000 y año (Nueva Zelanda no maories) en mujeres.

Esas diferencias en la incidencia son tradicionalmente atribuidos al fototipo de piel de nuestra población, que es Mediterránea (III-IV en la clasificación de Fitzpatrick)

El fototipo de la población isleña, III-IV, así como otras características (pelo negro, ojos marrones..), nos protegen del elevado número de horas del sol que afecta a las islas y da como resultado unos valores de incidencia de melanoma netamente alejado de la media mundial.

1. Edad

Respecto a la distribución por grupos de edad, en nuestra revisión encontramos que el mayor numero de casos se distribuían en el segmento de edad comprendido entre 50 y 80 años (68'6%), con una media de edad al diagnostico de 65.94 años (rango, 24-94),

referencias tabla 3.2.1.y figura 3.2.1.. Las estadísticas a nivel mundial (Popescu y cols. 1990), muestran que el pico de incidencia ocurre entre 30 y 60 años y con una media de diagnostico de 53 años.

En un estudio realizado en pacientes de melanoma en el sur español señala una edad media de 51,7 años (rango, 20-79), (Rodenas Lopez JM y col 1996).

Como vemos, tanto en referencia a la población mundial, como a la peninsular, nuestra casuística refleja que el melanoma en la C.A.C. afecta a individuos de mayor edad

Si realizamos una comparación de la edad separada por sexos, el mayor numero de casos en varones lo encontramos entre 51 y 60 años (9 casos) y entre 71 y 80 años (9 casos). En cambio, en mujeres, nos encontramos que el pico de incidencia aparece entre 61 y 70 años (23 casos), seguido por el segmento entre 71 y 80 años (21 casos).

Al comparar nuestra distribución con lo publicado hasta la fecha (Popescu y col. 1990), se comprueba que la distribución de la incidencia por edad en pacientes varones es similar, con el pico entre 50 y 59 años, mientras que nuestros datos no coinciden en la distribución en mujeres. Así, estudios internacionales (Popescu 1985), muestran una mayor incidencia en mujeres en los grupos entre 41 y 50 años, mucho más joven que en nuestra serie donde la mayor incidencia se da entre 60-80 años. Esta diferencia podría ser atribuida al tipo de melanoma más frecuente en la población estudiada. En nuestro estudio el tipo más frecuente es el Melanoma Lentiginoso, el cual se presenta frecuentemente a más edad. Esta razón también podría justificar el desplazamiento hacia mayor edad en el conjunto de nuestra serie

2. Sexo

En los países donde las tasas de incidencia son las más altas nos encontramos que los casos de melanoma cutáneo son muy similares para ambos sexos, aunque ligeramente más frecuente en el varón (Parkin et al, 1997). Como ejemplos nos encontramos que en Australia, de los casos registrados en 1997, los varones eran 33,1 por 100.000 habitantes y 25,7 para las mujeres; en Detroit USA (blancos) los varones eran 11,2 y las mujeres 7,3 por 100.00 habitantes; en Nueva Zelanda (no maories) varones 25,0 y las mujeres 29,8 por 100.000 habitantes. En Europa donde la incidencia es menor nos encontramos las siguientes cifras para 100.000 habitantes: Alemania 5,4 varones y 5,7 mujeres, Suecia 11,0 para varones y 11,1 para las mujeres, España (Zaragoza) 2,3 en varones y 3,3 en mujeres, Dinamarca 8,8 varones y 11,7 mujeres, Reino Unido (Oxford) 5,8 varones y 7,6 mujeres, Noruega 14,1 varones y 15,3 mujeres.

Nuestra casuística es muy diferente, ya que nos encontramos un 70,6% de los casos mujeres y 28,4% de varones (Tabla 3.2.3. y Figura 3.2.3.)

3. Localización

En nuestra casuística el mayor número de tumores, se localiza en la cara 62 casos (47,3 %) (Tabla 3.2.2.), en contra de las referencias mundiales que hablan del tronco en varones (Franceschi, 1992) y de EEII en mujeres (Osterlind A., 1990). Esta diferencia se sustenta en que nosotros encontramos más Melanomas Lentiginosos que Melanomas de Extensión Superficial, al contrario de las estadísticas mundiales (Clark y col. 1986). A este respecto encontramos referencias bibliográficas que relacionan la incidencia de los diferentes tipos

con la cantidad de insolación, así refieren mayor incidencia del M Lentiginoso en personas con exposición solar continua (Elder DE, 1995), el M Extensión Superficial mas frecuente en exposición solar esporádica (Green A y cols., 1993), el M Nodular queda en una posición intermedia y el Melanoma Lentiginoso Acral, que parece no tiene relación con la exposición solar (Elder DE 1995). La segunda localización mas frecuente fue la extremidad inferior (23 casos).

Los mayores incrementos en la incidencia se han descrito en Australia y EEUU en el tronco para el varón, aunque también se han comunicado incrementos en extremidad superior en Connecticut, cabeza y cuello e incluso en extremidad inferior. En la mujer el incremento de la incidencia se encuentra en extremidad inferior (mas debajo de la rodilla) y en brazo, lo que interpretamos como mayor exposición solar de las zonas referidas, que se relaciona con los hábitos de vestir (Gallagher RP 1990)

4. Lugar de residencia

Nuestro estudio ha sido realizado en un Hospital terciario de referencia para la zona norte de la isla de Tenerife (con exclusión de la ciudad de Santa Cruz de Tenerife, considerado centro geográfico), por lo que el lugar de residencia de los pacientes deberían estar acumulados en esas zonas. En la practica esto no ocurre asi observamos la distribución del lugar de residencia de los casos estudiados, nos encontramos que la mayoría de casos pertenecen a la zona centro, así como un número importante de casos en el resto de zonas no incluidas como zonas de referencia (Figura 3.1.1.4.).

Dentro de la distribución por diferentes tipos de melanoma (Tabla 3.2.4.), lo que llama la atención es que el M.L.A. no aparece en la zona sur de la isla, siendo mas frecuente en esta

zona el Melanoma Lentiginoso. Esta distribución podría explicarse por exposición solar continua de la zona relacionada con la aparición de Melanoma Lentiginosos (Green y col., 1993)

Si estos datos los relacionamos con la insolación total de las diferentes zonas que agrupamos, en una media sacada por en observatorio Meteorológico de Tenerife durante los años comprendidos entre 1961 y 1992, encontramos que la insolación en el Aeropuerto Reina Sofía (Zona Sur-2) es de 7,0 horas, la de el Aeropuerto Los Rodeos (Zona Norte-1) es de 6,5 horas, la del Puerto de la Cruz (límite de Zona Norte-2) es de 5,2 horas al día, en Santa Cruz la insolación total diaria es de 7,8 horas. Si bien conocemos que dentro de la zona sur el aeropuerto Reina Sofía no es muy representativo a tener mayor nubosidad que el resto de la zona.

También hay que tener en cuenta los diferentes hábitos tanto profesionales como lúdicos, que presentan las poblaciones estudiadas, ya que en la zona centro son mayormente trabajos con techo y las actividades con exposición solar son mayormente en épocas más estivales, es decir que estaríamos ante exposición esporádica lo que lleva a un mayor riesgo de melanoma (Osterlind 1988). En cambio en el resto de zonas, nos encontramos con poblaciones cuya profesión es más de cara al aire libre (agricultura, pesca, ...), a la vez que se acompaña de la exposición continua al sol por su tipo de vivienda (unifamiliares con jardín, huerta...), actividades sociales y deportivas, por lo que según referencias bibliográficas deberían estar aumentados los casos de ML, aunque según autores, la exposición continua podría ser un factor protector (Osterlind 1988 y Elwood JM 1985)

4.1.2. DISCUSIÓN DE LA MUESTRA SEGÚN LOS TIPOS CLÍNICOS.

1. Lentigo maligno melanoma

En este estudio aparecen 59 casos de Lentigo Maligno, lo que supone el 45% de todos los casos, si descartamos los casos no invasores tenemos 15 pacientes es decir un 17,24%.

Estas cifras son claramente superiores a la media de la mayoría de autores que estipulan los casos de LMM entre el 5 y el 15% de los casos totales.

Se calcula que entre el 5 y el 15% de los casos de LM, evolucionan a LMM.

1.1. Edad

La edad de los casos estudiados de LMM concuerda con los casos de la literatura mundial, con la mayoría de casos entre 51 y 80 años. Aparecen un número de casos importantes (8%), en edades jóvenes lo que ocurre en climas templados donde la exposición solar se hace forma continua a lo largo del año.

1.2. Sexo

La mayoría de los casos son mujeres entre el 72 y 60% si consideramos casos totales o solo los invasores respectivamente. La casuística mundial da un 75% de casos de LM en mujeres, lo que concuerda con nuestra estadística.

1.3. Localización

La aparición más frecuente es la facial, en torno, al 80% de los casos, lo que está de acuerdo con las referencias bibliográficas mundiales.

2. Melanoma extensión superficial

Los casos de M E S fueron 37 lo que supone el 28,2% de todos los casos y 42,5% si descartamos los casos no invasores de LM.

Estas cifras son claramente inferiores a las series mundiales que consideran que los casos de MES son entre el 50 y el 70% de todos los casos (Barnhill y col 1993).

Popescu y col 1990, consideran las cifras del Melanoma de Extensión Superfial en torno al 61% del total de melonamas invasores.

2.1. Edad

En nuestro estudio encontramos la mayoría de casos entre 30 y 80 años, con un incremento en la década de los 50, esto difiere con la literatura que refiere la mayoría de casos entre 40 y 60 años de edad (Popescu y col 1990).

2.2. Sexo

Suele aparecer por igual en ambos sexos, en cambio en los casos registrados en el HUC nos encontramos que el 72,4% eran mujeres y 27,6% eran varones, claramente diferente a otras estadísticas.

2.3. Localización

La localización mas frecuente en mujeres son las EEII y en los varones la espalda. Esto

esta de acuerdo con nuestros resultados ya que en nuestra casuística tenemos que de las mujeres 9 casos estaban localizados en EEII, 6 casos en EESS, 4 casos en el tronco y 2 en la cara. En los varones tenemos 4 casos en tronco, 2 en cara y 2 en EEII.

3. Melanoma nodular

Los casos de MN fueron 23, lo que supone el 17,5% del total de casos y el 26,4% si descartamos los LM.

Las series mundiales consideran que los casos de MN son entre el 10 y 15% (Barnhill y col 1993), por lo que nuestra casuística es bastante similar.

3.1. Edad

En nuestro estudio, la edad de los pacientes era mas frecuente entre 31 y 80 años, con picos de mayor incidencia en las décadas de 50 y 70 años. En la literatura la edad mas frecuente esta entre 45 y 55 años. Nosotros, sin embargo, entre 41 y 50 años no tenemos registrado ningún caso de MN.

3.2. Sexo

En nuestro estudio el 69,6% de los casos de MN eran mujeres y el 30,4% eran varones, cosa que tampoco esta de acuerdo con la casuística al uso, ya que en ella aparecen en porcentajes similares.

3.3. Localización

La localización mas frecuente era la cara (34%), luego el tronco (26%) y luego las piernas (21,7%), coincidiendo con la referencias mundiales.

4. Melanoma lentiginoso acral.

En nuestra revisión tenemos 12 casos de MLA, lo que supone el 9,1% del total y el 13,79% si descartamos los LM.

La estadística mundial consideran que los casos de MLA están entre el 5 y el 9% de los casos totales de melanoma

4.1. Edad

La edad media al momento de diagnostico está entre 40 y 50 años, nosotros encontramos una incidencia mayor entre 41 y 50 años (25%), siendo igual (16,6%) para las decadas de 50, 60 y 70 años.

4.2. Sexo.

La incidencia de mujeres en MLA fue en nuestro estudio del 58,3% y la de varones el 33,3%, diferente a las medias mundiales donde los casos de varones y mujeres son similares.

4.3. Localización.

Es mas frecuente en las plantas de los pies que en las palmas de las manos, pero el número de lesiones ungueales es similar en ambas localizaciones. En nuestra casuística nos encontramos que el 53% asienta en EEII y el 15% en EESS, lo cual resulta concordante.

4.1.3. COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE MELANOMAS.

1. Edad

Nos encontramos que casi el 70% de los casos están entre 51 y 80 años, con claras diferencias según refleja la Figura 3.3.1. para los distintos tipos, con uniformidad relativa en los MLA y MN y con picos de incidencia para el MES y el LMM

2. Sexo

Todos los tipos presentan mayor incidencia de casos en las mujeres que en los varones, siendo casi un 70% para los casos de LM, MES, Mn y del 58,3 para el MLA

3. Localización

Los casos de MLA estan localizados en EE y los de LMM en cara el resto de tipos clínicos (MN y MES) tenían una distribución mas homogénea, por la superficie corporal.

4. Lugar de residencia

Llama la atención, observando la tabla 3.3.4. o la figura 3.3.4., que no existía ningún caso de MLA que resida en las zonas Sur de la isla, así como que la mayoría de los casos de LMM residían en la zona centro norte de la isla

4.1.4. DISCUSIÓN DE LAS CLASIFICACIONES PRONOSTICAS HISTOPATOLÓGICAS Y CLÍNICAS

1. Niveles de Clark

Clark en 1969 estudió la mortalidad a los 5 años para cada grado, encontrando el 8% para el grado II, el 35% en el grado III, el 46% en el grado IV y el 52% en el grado V. En otra serie, valorando la posibilidad de metástasis encontraba el 32% de pacientes con grado III, 67% en los que presentaban grado IV y 66% en los de grado V (Holmes y col 1976). Por último, Buttner y cols, en 1995, dan como supervivencias a 10 años en melanomas que están en estadio I, es decir enfermedad localizada, las siguientes, en relación con los grados de Clark:

Nivel I de Clark (estadio 0 de la AJCC): 100% de supervivencia

Nivel II	“	96%	“
Nivel III	“	86%	“
Nivel IV	“	66%	“
Nivel V	“	53%	“

2. Índice de Breslow

Se ha encontrado una supervivencia del 98% para el primer grupo, entre 44 y 66% para el tercero y muy discutido para el segundo (Breslow y col 1978). La posibilidad de metástasis en los tres años siguientes a la extirpación primaria también ha sido evaluada considerando 0% para el primer grupo, 25% para el segundo grupo y de 51 % para el tercero (Balch y col 1978).

3. Comparación de los estadios histopatológicos.

Como podemos ver en la tabla 3.4.1. los diferentes índices histopatológicos presentan una valoración diferente, por lo que no tienen equiparación los datos entre si.

4. Concordancia de las clasificaciones pronósticas.

Observamos que las hojas pronosticas de Cochran y Hardmeier son similares en los casos de resultados bueno-favorable-incierto pero que son idénticos en los casos de resultado malo-desfavorable.

5. Relación de las hojas pronosticas y clasificaciones histopatológicas.

Nos encontramos en la tabla 3.4.3. que no existe relación entre los índices de Clark y Breslow con las hojas pronosticas de Cochran y Hardmeier, existen pronosticos

desfavorables con índices de grado II, III, IV y V de forma indiscriminada. Tampoco tienen relación con las clasificaciones de la UICC y la de la AJCC

4.2. DISCUSIÓN GENÉTICA

4.2.1. SONDAS DE SECUENCIA UNICA

1. P-58

El gen p58 fue descrito por Barber y cols.s. en 1994 en células infectadas por virus influenza. Se trata de un gen que codifica para una proteína kinasa y que inicialmente se localizó en el brazo corto del cromosoma 1 a nivel de la banda 1p36. Posteriores estudios de hibridación también han propuesto que p58 se localiza en el cromosoma 13 a nivel de la banda 13q32 (Korth y cols., 1996a). Este gen parece estar involucrado en el control del ciclo celular, concretamente se conoce su actividad inhibidora en la regulación de la síntesis de proteínas. También se ha demostrado su capacidad *in vitro* de inducir la transformación maligna de células humana y de ratón (Korth y cols., 1996b). Este grupo de investigadores han demostrado, además, que p58 puede adquirir carácter oncogénico merced a su sobreexpresión (aumento neto en el ambiente intracelular de la presencia de la proteína que codifica). Dada su localización y sus propiedades, p58 se relacionó con el desarrollo de diferentes tumores, entre ellos, neuroblastoma, carcinoma de pulmón, y melanoma maligno (Eipers y cols., 1991). Recientemente también se ha apuntado su posible relación con otros tipos de cánceres, particularmente la leucemia aguda (Korth y cols., 1996a)

La implicación propuesta de p58 en melanoma maligno ha sido observada en nuestro estudio. Nuestros resultados (Tabla 3.5.1.) detectan amplificación de p58 en 4 de los 20 melanomas analizados (20%) lo que nos permite, de un lado, confirmar la relación patogenética de la amplificación de p58 con el melanoma, y en concreto con el melanoma de extensión superficial, y de otro, estimar que esta alteración genética no es muy frecuente en este tipo de tumores.

2. Int-2 y HST

Estos oncogenes, que pertenecen a la familia de los factores de crecimiento fibroblástico, se ha implicado de forma importante en la aparición de tumores epiteliales. Se localizan en el brazo largo del cromosoma 11, concretamente en la banda q13, próximos al gen de la ciclina D1 (Vogelstein y Kinzler, 1998).

Tsuda y cols. (1988) describieron la amplificación del oncogen HST en el 42,1% de los 19 carcinomas escamosos del esófago que estudiaron. También se han referido amplificaciones de estos oncogenes en otros tumores como el de mama (Yoshida y cols. 1987; Theillet y cols., 1989) , el carcinoma hepático (Hatada y cols. 1988), mientras que no se ha encontrado esta alteración de hst en adenocarcinoma gástricos o tumores testiculares (Strhmeyer y cols., 1991) o en carcinoma colorectal. Posteriormente, Yoshida y cols. (1993) describieron que el conjunto de genes localizados en 11q13 (int-2, hst y cyclinD1/prad1) estaba amplificado en el 50% de los tumores esofágicos analizados. Este grupo de investigadores sugieren que, en el carcinoma esofágico, el elemento principal en el proceso de génesis tumoral, no es tanto la amplificación génica de hst-int-2 sino el elevado nivel de transcripción del gen de la ciclina D1. El mismo fenómeno de co-

amplificación de hst y cyclinD1 se ha observado en el 12,5% de un grupo de 40 casos de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (Volling y cols., 1993).

En el melanoma, sólo se tiene constancia de un estudio por Adelaide y cols. (1988) donde también se ha detectado la co-amplificación de hst e int-2.

Nosotros nos encontramos que, de los 20 casos de melanoma de extensión superficial estudiados, 5 estaban coamplificados (25%), 8 estaban amplicados para HST o para Int-2 (40%), elevandose así el % de tumor que presentara amplificación de alguno de estos dos oncogenes al 65% de los melanomas estudiados, por lo tanto quedan 7 que no presentaron amplificación (35%), (Tabla 3.5.4.).

Dado que los oncogenes amplificados pertenecen a la familia de los genes que codifican factores de crecimiento fibroblástico, es razonable suponer que un exceso de estos genes, produciría un incremento en la cantidad de proteína tanto extra como intracelular. Esta circunstancia, que está implícita en la proliferación tumoral será más evidente en aquellos tumores de componente celular eminentemente fibroblásticos. Esto explicaría la alta incidencia (50% coamplificación) en neoplasias esofágicas. Mientras que en el caso nos ocupa, melanoma extensión superficial, el papel del crecimiento fibroblástico, aunque presente, no es tan acusado, de ahí, que los fenómenos de coamplificación no sea tan frecuente, alcanzando un nivel del 25% de los casos estudiados.

Por otro lado, hemos encontrado que la amplificación de uno de los dos oncogenes es un fenómeno menos frecuente, ya que únicamente el 35% de los casos no presentó ningún tipo de amplificación.

La significación pronóstica de este tipo de alteración génica está por aclarar. A este respecto se han descrito correlaciones clínicas que asocian las coamplificaciones con el mal pronóstico. Volling y cols. en 1993 encontraron que en tumores epiteliales de cabeza y

cuello, los pacientes con estadio III y IV que presentaban coamplificación tenían menor supervivencia.

4.2.2. SONDAS CENTROMERICAS

Las alteraciones citogenéticas de tipo numérico son las más frecuentes en los tumores sólidos. Estos cambios en la dotación cromosómica son, en la inmensa mayoría de las ocasiones, ganancias de cromosomas. El aumento numérico no se corresponde con aumentos de la dotación completa, es decir, los pares cromosómicos no se ven afectados de forma generalizada ni aleatoria. Se desconoce el efecto real sobre el fenotipo tumoral de las trisomías y otras ganancias múltiples cromosómicas, pero es un hecho conocido que pueden y deben ser consideradas como marcadores genéticos tumorales. Por ejemplo, la trisomía 7 es un fenómeno genético frecuente en tumores renales y nerviosos, pudiendo también aparecer en tejido epitelial próximo a la zona tumoral (Cigudosa y cols., 1991).

La revisión de la literatura sobre alteraciones cromosómicas en melanomas (Heim y Mitelmna, 1994) nos indica que los pares que aparecen afectados con mayor frecuencia son los cromosomas 1, 6, 7,9,10 y 11.

De forma más detallada podemos resumir la información publicada en lo siguiente:

- La alteración mas frecuente aparece implicando al cromosoma 1, mas concretamente en 1p12-q12, y se interpreta como pérdida a del brazo corto y ganancia del largo (Morse y cols. 1994).
- En el cromosoma 6, además de alteraciones numéricas, se han encontrado translocaciones y deleciones del brazo largo (Trent y cols. 1989, Millikin y cols. 1991).

- Los cromosomas 7 y 10 aparecen implicados en forma de trisomías y tetrasomías (Mitelman y cols. 1994).
- En el 20% de los melanomas malignos con alteraciones en el cariotipo, se encuentra anormalidades en el cromosoma 9 (Fountain y cols. 1992).
- En el estudio realizado por Trent y cols. en 1990, también se demostró la implicación del cromosoma 11 y se obtuvieron datos que hicieron proponerlo como factor de mal pronóstico.

Nosotros encontramos polisomía de los cromosomas 1, 6, 7 y 10 (tabla 3.5.9.), para todos los casos estudiados de melanoma de extensión superficial no familiar, aunque en grado diferente. A efectos puramente descriptivos, hemos diferenciado los casos en alto y bajo grado de polisomía, para los casos que tuvieran más o menos de 30% de los núcleos con más de 3 señales, respectivamente.

Para el cromosoma 1, nos encontramos que en los casos estudiados solo uno de ellos tenía el 28,8% de núcleos con más de 3 señales (polisomía de bajo grado o moderada), mientras que el resto superaba el 30% llegando al 55,7% en un caso (tabla 3.5.5).

Para el cromosoma 6, nos encontramos que el número de núcleos con más de 3 señales va desde el 12% hasta el 33,8%. Solo dos casos superaron el 30% uno con 30,2 y otro con 33,8%, mientras que los otros 6 casos restantes presentaron polisomía de bajo grado o moderada, (tabla 3.5.6.).

Para el cromosoma 7, nos encontramos que el número de núcleos con más de 3 señales iba desde 28% hasta el 79,5%. De los 8 casos, sólo uno presentaba polisomía moderada (el 28% de los núcleos eran polisómicos), mientras que el resto de las muestras mostraba una proporción de núcleos polisómicos en torno al 70%.(tabla 3.5.7.). Esta es la polisomía más evidente en nuestro estudio.

Para el cromosoma 10, el número de núcleos con más de 3 señales van desde el 7,9% hasta el 40,4%. Solo uno de los casos presentaba más del 30% de núcleos con más de 3 señales. (tabla 3.5.8.).

Por lo tanto, en nuestro estudio se observa una marcada diferencia en los 4 cromosomas estudiados. El cromosoma 6 y el 10 presentan polisomía moderada con un 23 y 20%, respectivamente, de núcleos con más de 3 señales. En cambio, los cromosomas 1 y 7 presentan polisomía muy marcada, con un 38% y 58% de núcleos trisómicos, respectivamente.

4.3. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS CLÍNICOS, HISTOLÓGICOS Y GENÉTICOS

Con relación a lo expuesto en la tabla 3.6. encontramos que la casi totalidad (excepto uno), de los casos con positividad para ambos, Int-2 y HST, tenían pronóstico incierto o desfavorable, en la clasificación pronóstica establecida por Hardmaier, pero cuando solo uno de ellos era positivo, nos encontramos que 1 era favorable, 4 eran inciertos y 3 desfavorables.

No hemos podido encontrar, como en el caso de los tumores de esófago, una correlación de co-amplificación de estos dos oncogenes, HST e Int-2, con un mayor grado en la clasificación de Clark y Mihm.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Ackerman AB, David KM. A unifying concept of malignant melanoma. *Hum Pathol* 1986; 17: 438-440.
2. Ackerman AB. The expert witness. *Human Pathol* 1986; 17 (9): 973-974. Adane J, Gaudray P, Dionne CA, Crumley G, Jaye M, Schlessinger J, Jeanteur P, Birnbaum D, Theillet C. BEK and FLG, two receptors to members of the FGF family, are amplified in subsets of human breast cancers. *Oncogene* 1991; 6: 659.
3. Ackerman AB. The concept of malignant melanoma in situ. *Pigment Cell* (edited by Elder, Basel, Karger) 1987; vol 8: 205.
4. Adelaide J, Mattei MG, Marics I, Raybaud F, Planche J, De Lapeyriere O, Birnbaum D. Chromosomal localization of the hst oncogene and its co-amplification with the int.2 oncogene in a human melanoma. *Oncogene* 1988 Apr; 2 (4): 413-416.
5. Akama Y, Yasui W, Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitahara K, Ishikawa T, Tahara E. Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1995; 86: 617.
6. Albino AP, Fountain JW. Molecular genetics of human malignant melanoma. *Cancer Treat Res* 1993 ; 65: 201-255.
7. Alvarez-Mon Soto M, Camacho Martinez F, Diaz Perez JL, Diaz-Rubio E, Gonzalez Larriba JL, Guillem Porta V, López López JJ, Moreno Nogueira JA, Serrano Ortega S, Toribio Perez J. Panorámica actual del melanoma. *Accion Medica*, 1997.
8. Aly MS, Dal Cin P, Van de Voorde W, et al. Chromosome abnormalities in benign prostatic hyperplasia. *Genes Chromosom Cancer* 1994; 9: 227.
9. Andersen LB, Fountain JW, Gutman DH, Tarle SA, Glover TW, Dracopoli NC, Housman DE, Collins FS. Mutations in the neurofibromatosis 1 gene in sporadic melanoma cell lines. *Nat Genet* 1993; 3: 118.

10. Aoki M, Hamada F, Sugimoto T, Sumida S, Akiyama T, Toyoshima K. The human cot proto-oncogene encodes two protein serine/threonine kinases with different transforming activities by alternative initiation of translation. *J-Biol-Chem.* 1993 Oct 25; 268 (30): 22723-22732.
11. Argezano G, Fabbrocini G, Carli P, De Giorgi V, Delfino M. Clinical and dermoscopic criteria for the preoperative evaluation of cutaneous melanoma thickness. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 61-68.
12. Armstrong BK, Kricger A. Cutaneous melanoma. *Cancer Sur* 1994; 19: 219-240.
13. Arps S, Rodewald A, Schmalenberger B, Carl P, Bressel M, Kastendieck H. Cytogenetic survey of 32 cancers of the prostate. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 66: 93-99.
14. Bailly C, Colon J, Noel P, Mayer M, Dargen M. L'histo-pronostic du mélanome malin cutané. *Annales d'Anatomie pathologique*, 1974; tome 19; 29-50.
15. Balch CM, Murad TM, Soong S-J, Ingalls AL; Halpern NB, Maddox WA. A multifactorial analysis of melanoma. Prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods. *Ann Surg* 1978; 188: 732-742.
16. Balch CM, Soong SJ, Milton GW, Shaw HM, McGovern VJ, Mccarthy WH, Murad TM, Maddox WA. Changing trends in cutaneous melanoma over a quarter century in Alabama, USA, and New South Wales, Australia. *Cancer* 1983; 52 (9): 1748-1753.
17. Balch CM, Soong SJ, Milton GW, Shaw HM, McGovern VJ, Murad TM, McCarthy WH, Maddox WA. A comparison of prognostic factors and surgical results in 1,786 patients with localized (stage I) melanoma treated in Alabama, USA, and New South Wales, Australia. *Ann Surg* 1982; 196 (6): 677-684.

18. Bale SJ, Greene MH, Lovrien E, Hereditary melanoma, the dysplastic nevus syndrome and transferrin. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23: 279-286.
19. Barber GN, Thompson S, Lee TG, Strom T, Jagus R, Darvean A, Katse MG. The 58-kilodalton inhibitor of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase is a tetratricopeptide repeat protein with oncogenic properties. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 May 10; 91 (10): 4278-4282.
20. Barnhill RL, Mihm MC. The histopathology of cutaneous malignant melanoma. *Semin Diagn Pathol* 1993; 10: 47-75.
21. Bauer J, Sokol L, Stribrna J, Kremen M, Krajsova I, Hausner P, Hejnar P. Amplification of N-myc oncogene in human melanoma cells. *Neoplasma* 1990; 37 (3): 233-238.
22. Beahrs OH, Henson DE, Hutter RV, Myers MH (eds). *Manual for staging of cancer* (3rd ed). Lippincott, Philadelphia, 1988, 139-144.
23. Beahrs OH, Henson DE, Hutter RVP, Kennedy BJ. *Handbook for staging of cancer*. American Joint Committee on Cancer. TNM Committee of the International Union Against Cancer. Ed J.B. Lippincott Company. Philadelphia, 1993; Chapter 24: 155-160.
24. Berger CS, Sandberg AA, Todd IAD, et al. Chromosome in kidney, ureter, and bladder cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23: 1-6.
25. Berns EM, Klijn JG, van Staveren IL, Portengen H, NoorEGRaaf E, Foekens JA. Prevalence of amplification of the oncogenes cMYC, HER2/neu, and INT in one thousand human breast tumours: correlation with steroid receptors. *Eur J Cancer* 1992; 28: 697.

26. Bianchi G, Tripodi G, Casari G, Salardi S, Barber BR, Garcia R, Leoni P, Torielli L, Cusi D, Ferrandi M, et al. Two point mutations within the adducin genes are involved in blood pressure variation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 Apr 26; 91: 3999-4003.
27. Bishop JM. Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 1991; 34: 235-248.
28. Bishop JM. Viral oncogenes. *Cell* 1985; 42: 23-38.
29. Bodey B, Bodey B Jr, Groger AM, Luck JV, Siegel SE, Taylor CR, Kaiser HE. Clinical and prognostic significance of the expression of the c-erbB-2 and c-erbB-3 oncoproteins in primary and metastatic malignant melanomas and breast carcinomas. *Anticancer Res* 1997; 17(2B): 1319-1330.
30. Bodey B, Bodey B Jr, Groger AM, Siegel SE, Kaiser HE. Nm23/nucleoside diphosphate (NDP) kinase expression in human malignant melanomas: significance and implications in tumor biology. *Anticancer Res* 1997; 17: 505-511.
31. Bomme L, Bardi G, Pandis N, Fenger C, Kronborg O, Heim S. Clonal karyotypic abnormalities in colorectal adenomas. Clues to the early genetic events in the adenoma-carcinoma sequence. *Genes Chromosom Cancer* 1994; 10: 190-199.
32. Boyle P, Maisonneuve P, Doré J-F. Epidemiology of malignant melanoma. *Br Med Bull* 1995; 51: 523-547.
33. Breslow A, Cascinelli N, Van der Esch EP, Morabito A. Stage I melanoma of the limbs. Assessment of prognosis by level of invasion and maximum thickness. *Tumori* 1978; 64: 273-284.
34. Breslow A. Thickness, cross-sectional area, and depth of invasion in the prognosis of melanoma. *Am Surg* 1970; 172: 902-908.

35. Breslow A. Tumor thickness, level of invasion and node dissection in stage I cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1975; 182: 572-575.
36. Burden AD, Newell J, Andrew N, Kavanagh G, Connor JM, MacKie RM. Genetic and environmental influences in the development of multiple primary melanoma. *Arch Dermatol* 1999 Mar; 135: 261-265.
37. Cairns P, Shaw ME, Knowles MA. Initiation of bladder cancer may involve deletion of a tumor-suppressor gene on chromosome 9. *Oncogene* 1993; 8: 1083-1087.
38. Cannon-Albright LA, Goldgar DE, Meyer LJ, Lewis CM, Anderson DE, Fountain JW, Hegi ME, Wiseman RW, Petty EM, Bale AE, Olopade OI, Diaz MO, Kwiatkowski DJ, Piepkorn MW, Zone JJ, Skolnick MH. Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science* 1992; 258: 1148.
39. Cannon-Albright LA, Meyer LJ, Goldgar DE, Lewis CM, McWhorter WP, Jost M, Harrison D, Anderson DE, Zone JJ, Skolnick MH. Penetrance and expressivity of the chromosome 9p melanoma susceptibility locus (MLM). *Cancer Res* 1994; 54: 6041.
40. Caputo R, Ackerman AB, Sison-Torre EQ. *Dermatología y Dermopatología pediátrica*. Edika-med, Barcelona 1990, 350.
41. Carli P, Massi D, Santucci M, Biggeri A, Giannotti B. Cutaneous melanoma histologically associated with a nevus and melanoma de novo have a different profile of risk: result from a case-control study. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 549-557.
42. Cawley EP. Genetic aspects of malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1952; 65: 440.
43. Clark WH jr., Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions: "the B-K mole syndrome". *Arch Dermatol* 1978; 114: 732-738.

-
44. Clark WH, Elder DE, Van Horn M. The biological forms of malignant melanoma. *Human Pathol* 1986; 17: 443-450.
 45. Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biological behaviour of primary human malignant melanoma of the skin. *Cancer Res* 1969; 29: 705-727.
 46. Cochran AJ. Histology and prognosis in malignant melanoma. *J Pathol* 1969; 97: 459-468.
 47. Cochran AJ. Method of assessing prognosis in patients with malignant melanoma. *The Lancet* 1968; 16: 1062-1064.
 48. Cohen LM. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 1995; 33: 923-932.
 49. Collins C, Rommens JM, Kowbel D, Godfrey T, Tanner M, Hwang SI, Polikoff D, Nonet G, Cochran J, Myambo K, Jay KE, Froula J, Cloutier T, Kuo WL, Yaswen P, Dairkee S, Giovanola J, Hutchinson GB, Isola J, Kallioniemi OP, Palazzolo M, Martin C, Ericsson C, Pinkel D, Gray JW, et al. Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 Jul 21; 95 (15): 8703-8708.
 50. Cooper GM. *Oncogenes*. Jones & Bartlett Publishers. Boston, 1990.
 51. Copeland WC, Tan X. Active site mapping of the catalytic mouse primase subunit by alanine scanning mutagenesis. *J Biol Chem* 1995 Feb 24; 270 (8): 3905-3913.
 52. Copeland WC, Wang TS. Enzymatic characterization of the individual mammalian primase subunits reveals a biphasic mechanism for initiation of Dna replication. *J Biol Chem* 1993; 268 (35): 26179-26189.

-
53. Chikuba K, Saito T, Kaketani K, Uchino S, Sato K, Shimoda K, Miyahara M, Kobayashi M. The intensity of HST-1 gene amplification and malignant potential of esophageal carcinoma in relation to intratumoral heterogeneity. *Gan to kagaku Ryoho* 1993; 20: 763-766.
 54. Christiansen H, Schestag J, Christiansen NM, Grzeschik K-H, Lampert F. Clinical impact of chromosome 1 aberrations in neuroblastoma. A metaphase and interphase cytogenetic study. *Genes Chromosom Cancer* 1992; 5: 145.
 55. Christophers AJ. Melanoma is not caused by sunlight. *Mutat Res* 1998 Nov 9; 422 (1): 113-117.
 56. Davis NC et al. The macroscopic appearance of malignant melanoma of the skin. *Med J Aust* 1966; 2: 882-886.
 57. Daya-Grosjean L, Robert C, Drougard C, Suarez H, Sarasin A. High mutation frequency in ras genes of skin tumors isolated from DNA repair deficient xeroderma pigmentosum patients.
 58. Dennis LK. Analysis of the melanoma epidemic, both apparent and real: data from the 1973 through 1994 surveillance, epidemiology, and end results program registry. *Arch Dermatol* 1999 Mar; 135 (3): 275-280.
 59. Devesa SS, Blot WJ, Stone BJ, Miler BA, Tarone RE, Fraumeni JF Jr. Recent cancer trends in the united states. *J Natl Acncer Inst* 1995; 87: 175-182.
 60. Drier JK, Swanson PE, Cherwitz DL, et al. S-100protein immunoreactivity in poorly differentiated carcinoma. *Arch Pathol* 1987; 111: 447-452.
 61. Easton J, Kidd VJ. Analysis of the 5' flanking sequences from the human protein kinase p58 (PITSLRE beta 1) encoding gene. *Gene* 1994 Aug 5; 145 (2): 279-282.

-
62. Eipers PG, Barnoski BL, Han J, Carroll AJ, Kidd VL. Localization of the expressed human p58 protein kinase chromosomal gene to chromosome 1p36 and a highly related sequence to chromosome 15. *Genomics* 1991 Nov; 11 (3): 621-629.
 63. Elder DE. Skin Cancer: melanoma and other non-melanoma skin cancers. *Cancer* 1995; 75: 245-256.
 64. Elwood JM, Gallagher RP, Hill GB, Spinelli JJ, Pearson JC, Threlfall W. Pigmentation and skin reaction to sun as risk factors for cutaneous melanoma: Western Canada Melanoma Study. *Br Med J* 1984; 288: 99-102.
 65. Elwood JM, Gallagher RP, Hill GB, Spinelli JJ, Pearson JCG. Cutaneous melanoma in relation to intermittent and constant sun exposure: western Canada melanoma study. *Int J Cancer* 1985; 35: 427-443.
 66. Elfving P, Cigudosa JC, Lundgren R, Limon J, Mandahl N, Kristofferson U, Heim S and Mitelman. Trisomy 7, trisomy 10, and loss of the Y chromosome in short-term cultures of normal kidney tissue. *Cytogenet Cell Genet* 1990; 53: 123-125
 67. Falor WH, Ward RM. Prognosis in early carcinoma of the bladder based on chromosomal analysis. *J Urol* 1978; 199: 44-447.
 68. Fitzpatrick TB. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* 1988; 124: 869-871.
 69. Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IM, Austen KF. Dermatology in general medicine. Fourth Edition. International Edition 1998; Chapter 82: pag 1078-1115
 70. Foley PA, Marks R, Dorevitch AP. Lentigo maligna is more common on the driver's side. *Arch Dermatol* 1993; 129: 1211-1212.

-
71. Fornzler D, Altschmied J, Nanda I, Kolb R, Baudler M, Schmid M, Scharrtl M. The Xmrk oncogene promoter is derived from a novel amplified locus of unusual organization. *Genome Res* 1996 Feb; 6 (2): 102-113.
 72. Fountain JW, Bale SJ, Housman DE, Dracopoli NC. Genetics of melanoma. *Cancer Surv* 1990; 9: 645.
 73. Fountain JW, Karayiourgou M, Ernstoff MS, Kirkwood JM, Vlock DR, Titus-Ernstoff L, Bouchard B, Vijayasaradhi S, Houghton AN, Lahti J, et al. Homozygous deletions within human chromosome band 9p21 in melanoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10557.
 74. Franceschi S, Cristofolini M. Cutaneous malignant melanoma: epidemiological considerations. *Semin Surg Oncol* 1992; 8: 345-352.
 75. Friedman RJ, Rigel DS, KOPF aw, Grin CM, Heilman E, bart RS, Kamino H, Harris MN, Roses DF, Postel AH, et al. Volume of malignant melanoma in superior to thickness as a prognostic indicator. Preliminary observation. *Dermatol Clin* 1991; 9: 643-648.
 76. Gallagher RP et al. Trends in basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the skin from 1973 through 1987. *J. Am Acad Dermatol* 1990; 23: 413-421.
 77. Garbe C, Buttner P, Bertz J. Primary cutaneous Melanoma. Prognostic classification on anatomic location. *Cancer* 1995; 75: 2492.
 78. Garcia I, Dietrich PY, Aapro M, Vauthier G, Vadas L, Engel E. Genetic alterations of cMYC, cERBB, and cRAS protooncogenes and clinical associations in human breast carcinomas. *Cancer Res* 1989; 49: 6675.

-
79. Gerhard DS, Dracopoli NC, Bale SJ, Houghton AN, Watkins P, Payne CE, et al. Evidence against HA-ras-1 involvement in sporadic and familial melanoma. *Nature* 1987; 325: 73-81.
 80. Goldman LI, Elder D, Clark WH, Mastrangelo MJ, Stennett J. Assessment of survival rates with metastatic malignant melanomas. *Surg Gynecol Obstet* 1986; 162 (3): 199-203.
 81. Gonzalez Barón M, Ordóñez Gallego A. *Melanoma*. Ed Masson S.A. 1998.
 82. Gorey KM, Holowaty EJ, Laukkanen E, Fehringer G, Richter NL. Association between socioeconomic status and cancer incidence in Toronto, Ontario: possible confounding of cancer mortality by incidence and survival. *Cancer Prev Control* 1998; 2 (5): 236-241.
 83. Gosshans EM. La ligereza de un concepto y la potencia de una palabra. *Arch Dermatol (ed Española)* 1997; vol 8: 303-304.
 84. Grammatico P, Catricala C, Potenza C, et al. Cytogenetic findings in 20 melanomas. *Melanoma Res* 1993; 3: 169.
 85. Grana X, Claudio PP, De Luca A, Sang N, Giordano A. P18, a human novel CDC2-related protein kinase. *Oncogene* 1994; 9 (7): 2097-2103.
 86. Green A, Mac Lennan R, Siskind V. Common acquired nevi and the risk of malignant melanoma. *Int J Cancer* 1985; 35: 297-300.
 87. Green M, Ackerman B. Thickness is not an accurate gauge of prognosis of primary cutaneous melanoma. *Am J Dermatopathol* 1993; 15: 461-473.
 88. Greene MH. Genetics of Cutaneous melanoma and nevi. *Mayo Clin Proc* 1997; 72: 467-474.

-
89. Greene MH. The prevention of cutaneous malignant melanoma: high-risk groups, chemoprevention, education and screening. En Nathanson L, ed. Current research and clinical management of melanoma. Norwell, Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 1993; 103-140.
 90. Greene MH, Goldin LR, Clark WH Jr et al. Familial cutaneous malignant melanoma: an autosomal dominant trait possibly linked to the Rh locus. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 6.071-6.075.
 91. Greene MH, Fraumeni JF Jr. The hereditary variant of malignant melanoma, in Clark WH Jr, Goldman LI, Mastrangelo MJ (eds). Human Malignant Melanoma, New York, Grune & Stratton, 1979
 92. Grin-Jorgensen CM, Rigel DS, Friedman RJ. The worldwide incidence of malignant melanoma. En: Balch CM, Houghton AN, Milton GW, Sorber AJ, Soong S, editores. Cutaneous melanoma. Philadelphia: Lippincott 1992; 27-39.
 93. Grob JJ, Gouvernet J, Aymar D y cols. Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk of non-familial nodular and superficial spreading melanoma. Cancer 1990; 66: 387-395.
 94. Gruis NA, Sandkuijl LA, van der Velden PA, Bergman W, Frants RR. CDKN2 explains part of the clinical phenotype in Dutch familial atypical multiple –mole melanoma (FAMMM) syndrome families. Melanoma Res 1995b; 5: 169.
 95. Guan X-Y, Cao J, Meltzer PS, Trent J. Rapid generation of region-specific genomic clones by chromosome microdissection: Inolation of DNA from a region frequently deleted in malignant melanoma. Genomics 1992; 14: 680.
 96. Hardmeier Th. Le pronostic du melanome malin en fonction de son image anatomo-pathologique. Revue de l'Intitut Pasteur de lyon 1970; tomo 3: 303-311.

-
97. Hatada I, Tokino T, Ochida T, Matsubara K. Co-amplification of integrated hepatitis B virus DNA and transforming gene HST-1 in a hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 1988; 3: 537-540.
 98. Healy E, Rehman I, Angus B, Rees JL. Loss of heterozygosity in sporadic primary cutaneous melanoma. *Genes Chromosom Cancer* 1995; 12: 152.
 99. Heenan PJ, Matz LR, Blackwell JB, Kelsall GR, Singh A, ten Seldam RE, Holman CD. Inter-observer variation between pathologists in the classification of cutaneous malignant melanoma in western Australia. *Histopathology* 1984 Sep; 8(5): 717-729.
 100. Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cell*, 2d ed. New York, Wiley-Liss, 1995
 101. Holman CD, Armstrong BK, Heenan PJ. Cutaneous malignant in women: exogenous sex hormones and reproductive factors. *Br J Cancer* 1984; 50: 673-680.
 102. Holman CD, Armstrong BK. Cutaneous malignant melanoma and indicators of total accumulated exposure to the sun: an analysis separating histogenetic types. *J Natl Cancer Inst* 1984 Jul; 73: 75-82.
 103. Holman CD, Armstrong BK. Pigmentary traits, ethnic origin, benign nevi, and family history and risk factors for cutaneous malignant melanoma. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 257-266.
 104. Holmes EC, Clark W, Morton DL, Eilber FR, Bochow AJ. Regional lymph node metastases and the level of invasion of primary melanoma. *Cancer* 1976; 37: 199-201.
 105. Horns-Ross P, Holly EA, Brown SR, Aston DA. Temporal trends in the incidence of cutaneous malignant melanoma among caucasians in the San Francisco Oakland MSA. *Cancer Causes Control* 1991; 2: 298-305.

-
106. Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, Van Baren N, Baurain JF, De Smet C, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T, Coulie PG. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 1997 Feb; 6 (2): 199-208.
 107. Izquierdo Rojo M. *Biología molecular del cáncer*. Ed Sintesis S.A. 1995.
 108. Jerkegren E, Sandrieser L, Brandberg Y, Rosdahl I. Sun-related behaviour and melanoma awareness among Swedish university students. *Eur J Cancer Prev* 1999 Feb; 8 (1): 27-34.
 109. Jiang W, Kahn SM, Tomita N, Zhang YL, Lu SH, Weinstein IB. Amplification and expression and of the human cyclin D gene in esophageal cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 2980-2991.
 110. Johson MR, Look AT, DeClue JE, Valentine MB, Lowy DR. Inactivation of the NF1 gene in human melanoma and neuroblastoma cell lines without impaired regulation of GRP.Ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 5539.
 111. Juang SH, Huang J, Li Y, Salas PJ, Fregien N, Carraway CA, Carraway KL. Molecular cloning and sequencing of a 58-kDa membrane- and microfilament-associated protein from ascites tumor cell microvilli with sequence similarities to retroviral gag proteins. *J Biol Chem* 1994 May 27; 269(21): 15067-15075.
 112. Karlseder J, Zeillinger R, Schneeberger C, Czerwenka K, Speiser P, Kubista E, Birnbaum D, Gaudray P, Theillet C. Patterns of DNA amplification at band q13 of chromosome 11 in human breast cancer. *Genes Chromosom Cancer* 1994; 9: 42.
 113. Kirkpatrick CS, White E, Lee JA. Case-control study of malignant melanoma in Washington State. II. Diet, alcohol, and obesity. *Am J Epidemiol* 1994; 139 (9): 869-880.

-
114. Klepp O, Magnus K. Some environmental and bodily characteristics of melanoma patients. A case-control study. *Int J Cancer* 1979; 23: 482-486.
 115. Koh HK. Cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 1991; 325: 171-182
 116. Koh J, Enders GH, Cynlacht BD, Harlow E. Tumor-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* 1995; 375: 506.
 117. Korth MJ, Edelhoff S, Disteché CM, Katze MG. Chromosomal assignment of the gene encoding the human 58-kDa inhibitor (PRKRI) of the interferon-induced dsRNA-activated protein kinase to chromosome 13q32. *Genomics* 1996 Jan 15; 31: 238-239.
 118. Korth MJ, Lyons CN, Wambach M, Katze MG. Cloning, expression, and cellular localization of the oncogenic 58-kDa inhibitor of the RNA-activated human and mouse protein kinase. *Gene* 1996 May 8; 170 (2): 181-188.
 119. Kovacs G, Szucs S, De Reise W, Baumbartel H. Specific chromosome aberration in human renal cell carcinoma. *Int J cancer* 1987; 40: 171-176.
 120. Kraemer KH, Tucker M, Tarone R, Elder DE, Clark WH Jr. Risk of cutaneous melanoma in dysplastic nevus syndrome types A and B. *N Engl J Med* 1986 Dec 18; 315: 1615-1616.
 121. Kundson AG. Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820.
 122. Lahti JM, Valentine M, Xiang J et al. Alterations in the PITSLRE protein kinase gene complex on chromosome 1p36 in childhood neuroblastoma. *Nat Genet* 1994 Jul; 7 (3): 370-375.

123. Lam KY, Law S, Wong J. Malignant melanoma of the oesophagus: clinicopathological features, lack of the p53 expression and steroid receptors and a review of the literature. *Eur J Surg Oncol* 1999 Apr; 25: 168-172.
124. Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler KW, Vogelstein B. p53 mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res* 1993; 53: 2231.
125. Lee JA, Scotto J. Melanoma: linked temporal and latitude changes in the United States. *Cancer Causes Control* 1993 Sep; 4 (5): 413-418.
126. Lee JAH. Trends in melanoma incidence and mortality. *Clin Dermatol* 1992; 10: 9-13.
127. Lee JAH, Stickland D. Malignant melanoma; social status and outdoor work. *Br J Cancer* 1980; 41: 757-763.
128. Lee JE, Reville JD, Platsoucas CD. HLA-DQB1*0301 association with increased cutaneous melanoma risk. *Int J Cancer* 1994; 59: 510-513.
129. Leonard JH, Kearsley JH, Chenevix G, Hayward NK. Analysis of gene amplification in head and neck squamous carcinomas. *Int J Cancer* 1991; 48: 511.
130. Levin DB, Wilson K, Valadares de Amorim G, Webber J, Kenny P, Kusser W. Detection of p53 mutations in benign and dysplastic nevi. *Cancer Res* 1995; 55: 4278.
131. Lewis MG. Malignant melanoma in Uganda. *Br J Cancer* 1967; 21: 483-495.
132. Lida S, Yoshida T, Naito K et al. Human HST-2 (FGF-6) oncogene: cDNA cloning and characterization. *Oncogene* 1992; 7: 309-309.
133. Lubs HA, Salmon JH. The chromosomal complement of human solid tumors: II. Karyotypes of glial tumors. *J Neurosurg* 1965; 22: 160-163.

-
134. Maelandsmo GM, Berner JM, Florenes VA, Forus A, Hovig E, Fodstad O, Myklebost O. Homozygous deletion frequency and expression levels of the CDKN2 gene in human sarcomas: relationship to amplification and mRNA levels of CDK4 and CCND1. *Br J Cancer* 1995; 72: 393.
 135. Maelandsmo GM, Florenes VA, Hovig E, Oyjord T, Engebraaten O, Holm R, Borresen AL and Fodstad O. Involvement of the pRb/p16/cdk4/cyclin D1 pathway in the tumorigenesis of sporadic malignant melanomas. *British Journal of Cancer* 1996; 73: 909-916.
 136. Magnani I, Gueneri S, Pollo B, et al. Increasing complexity of the karyotype in 50 human gliomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 75: 77-89.
 137. Magnus K. Incidence of malignant melanoma of the skin in Norway, 1955-1970. Variatons in time and space and solar radiation. *Cancer* 1973; 32 (5): 1275-1286.
 138. Magnus K. Incidence of malignant melanoma of the skin in the five Nordic countries: significance of the solar radiation. *Int J Cancer* 1977 Oct 15; 20 (4): 477-485.
 139. Magnus K. Prognosis in malignant melanoma of the skin. Significance of stage of disease, anatomical site, sex, age and period of diagnosis. *Cancer* 1977; 40: 389-397.
 140. Marille E, Herrmann ME, Lalley PA. Significance of trisomy 7 in thyroid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 62: 144-149.
 141. Marshall CJ. Tumor supressor genes. *Cell* 1991; 64: 249-264.
 142. Mascaro JM, Molgo M, Castell T, Castro J. Plasma cells within the infiltrate of primary cutaneous malignant melanoma of the skin. A confirmation of its histoprognostic value. *Am J Dermatopathol* 1987; 9: 497-499.

143. McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW, McCarthy WH. Ulceration and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *Histopathology* 1982; 6: 399-407.
144. McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW. Prognosis in patients with thin malignant melanoma. Influence of regression. *Histopathology* 1983; 7: 673-680.
145. McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW. Prognostic significance of a polypoid configuration in malignant melanoma. *Histopathology* 1983; 7: 663-672.
146. Meier J, Georgatos SD: Type B lamins remain associated with the integral nuclear envelope protein p58 during mitosis: implications for nuclear reassembly. *EMBO-J* 1994 Apr 15; 13 (8): 1888-1898.
147. Micklos DA, Freyer GA. *DNA Science*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Burlington, 1990.
148. Millikin D, Meese E, Vogelstein B, Trent J. Loss of heterozygosity for loci on the long arm of chromosome 6 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 1991; 51: 5449.
149. Misra DN, Dickman PS, Yunis EJ. Fluorescence in situ hybridization (FISH) detection of MYCN oncogene amplification in neuroblastoma using paraffin tissues. *Diag Mol Pathol* 1995; 4: 128.
150. Mitelman F (ed). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel. Karger, 1995.
151. Mitelman F. *Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer*, 5th ed. New York, Wiley-Liss, 1995.
152. Miyao N, Tsai YC, Lerner SP, et al. Role of chromosome 9 in human bladder cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 4066-4071.

-
153. Moore AL, Wang TS. Down-regulation of genes encoding DNA replication proteins during cell cycle exit. *Cell Growth Differ* 1994 May; 5 (5): 485-494.
 154. Moretta A, Vitale M, Bottino C, Orengo AM, Morelli L, Angugliano R, Barbaresi M, Ciccone E, Moretta L. P-58 molecules as putative receptors for major histocompatibility complex (MHC) class I molecules in human natural killer (NK) cells. Anti-p58 antibodies reconstitute lysis of MHC class I-protected cells in NK clones displaying different specificities. *J-Exp-Med.* 1993 Aug 1; 178 (2): 597-604.
 155. Morse HG, Moore GE, Ortiz LM, Gonzalez R, Robinson WA. Malignant melanoma: From subcutaneous nodule to brain metastasis. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 72: 16.
 156. Morse HG, Moore GE. Cytogenetic homogeneity in eight independent sites in a case of malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 69: 108
 157. Muir SC, Waterhouse JAH, Mach T et al. Cancer incidence in five continents. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987; vol V.
 158. Muleris M, Salmon R-J, Dutrillaux B. Characteristic chromosomal imbalances in near-diploid colorectal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 29: 298-306.
 159. Muleris M, Salmon R-J, Dutrillaux B. Chromosome study demonstrating the clonal evolution and metastatic origin of a metachronous colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 1986; 38: 167-175.
 160. Muleris M, Zafrani B, Validire P, Girodet J, Salmon R-J, Dutrillaux B. Cytogenetic study of 30 colorectal adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 74: 104-108.
 161. Nguyen C, Roux D, Mattei MG, Lapeyriere O, Goldfarb M, Birnbaum D, Jordan BR. The FGF-related oncogenes HST and int-2 and Bcl-1 loci are contained within one

- megabase in band q13 of chromosome 11, while the *fgf-5* oncogene maps to 4q21. *Oncogene* 1988; 3: 703-708.
162. Nicolini C. *Molecular basis of human cancer*. Plenum Press. New York, 1991.
163. Noguchi T, Marics I, Adelaide J, Raybaud F, Planche J, Batoz M, Auberts C, de Lapeyriere O, Birnbaum D. Detection of transforming sequences in human melanomas and leukemias. *Cancer Detect Prev* 1988; 12: 383-388.
164. O'Doherty CJ, Prescott RJ, White H, McIntyre M, Hunter JAA. Sex differences in presentation of cutaneous malignant melanoma and in survival from stage I disease. *Cancer* 1986; 58: 788-792.
165. Olopade OI, Jenkins R, Linnenbach AJ, et al. Molecular analysis of chromosome 9p deletion in human solid tumors. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1990; 21: 318.
166. Olson DC, Maredial V, Momand J, Chen J, Ronocki C, Levine AJ. Identification and characterization of multiple *mdm-2* proteins and *mdm-2-p53* protein complexes. *Oncogene*. 1993 Sep; 8(9): 2353-2360.
167. Osterlind A. Epidemiology on malignant melanoma in Europe. *Reviews in Oncologica* 1992; 5: 903-908.
168. Osterlind A. Malignant melanoma in Denmark. *Acta Oncol* 1990; 29: 833-854.
169. Osterlind A, Tucker MA, Stone BJ, Jensen OM. The Danish case-control study of cutaneous malignant melanoma, II: importance of UV-light exposure. *Int J Cancer* 1988; 42: 319-324.
170. Ozisik YY, Meloni AM, Altungoz O, et al: Cytogenetic finding in 21 malignant melanoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 77: 69.
171. Parkin DM, Iscovich J. Risk of cancer in migrants and their descendant in Israel: II. Carcinomas and germ-cell tumours. *Int J Cancer* 1997 Mar 17; 70 (6): 654-660.

-
172. Parkin DM, Mvir CS, Whelan SL, Gao YT, Ferlay J, Powell J, editores. Cancer incidence in five continent, Vol IV-VII. Lyon Iarc Scientific Publication 1992 Vol VI; 120.
 173. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the world wide incidence of eighteen major cancer in 1985. *Int J Cancer* 1993; 54: 594-606.
 174. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L, Young J, editores. Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publications 1997; 143: Vol VII.
 175. Parmiter AH, Balaban G, Herlyn M, Clark WH Jr, Nowell PC. A t(1;19) chromosome trnaslocation in three cases of human malignant melanoma. *Cancer Res* 1986; 46 (3): 1526- 1529.
 176. Parmiter AH, Nowell PC. Cytogenetics of melanocytic tumors. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 254S.
 177. Pastan I, Gottesman M. Multiple resistance in human cancer. *N Engl J Med* 1987; 316: 1388-1397.
 178. Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worlwide mortality from eighteen major cancer in 1985. Implications for preventio and projections of future burden. *Int J Cancer* 1993 Dec 2; 55 (6): 891-903.
 179. Popescu NA, Beard CM, Treacy PJ, Winkelmann RK, O'Brien PC, Kurland LT. Cutaneous malignant melanoma in Rochester, Minnesota: trends in incidence and survivorship; 1950 through 1985. *Mayo Clin Proc* 1990; 65: 1293-1302.
 180. Ranade K, Hussussian CJ, Sikorski RS, Varmus HE, Goldstein AM, Tucker MA, Serrano M, Hannon GJ, Beach D, Dracopoli NC. Mutations associated with familial melanoma impair p16 INK4 function. *Nat Genet* 1995; 10: 114.

-
181. Rasheed BKA, McLendon RE, Friedman HS, et al. Chromosome 10 deletion mapping in human gliomas: A common deletion region in 10q25. *Oncogene* 1995; 10: 2243-2249.
 182. Raybaud F, Noguchi T, Marics I, Adelaide J, Planche J, Batoz M, Aubert C, de Lapeyriere O, Birnbaum D. Detection of a low frequency of activated ras genes in human melanomas using a tumorigenicity assay. *Cancer Res* 1988 Feb 15; 48: 950-953.
 183. Reed JA, McNutt NS, Albino AP. Defferential expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in melanocytic lesions. Demonstrated by in situ hidridization. *Am J of Pathology* 1994; 144: 329-336.
 184. Reed JA, McNutt NS, Prieto VG, Albino AP. Expression of transforming Growth factor-b2 in malignant melanoma correlates with the depth of tumor invasion. *Am J Pathology* 1994; 1445: 97-104.
 185. Rodenas Lopez JM. Factores de riesgo del melanoma cutaneo (I). Factores de riesgo individuales: rasgos pigmentarios. *Piel* 1998; 13: 437-445.
 186. Rodenas Lopez JM. Factores de riesgo del melanoma cutáneo (II). Factores de riesgo individuales: nevos melanocíticos. *Piel* 1998; 13: 491-498.
 187. Rodenas JM, Delgado-Rodriguez M, Fariñas Alvarez C, Herranz MT, Serrano S. Melanocytic nevi and risk of cutaneous malignant melanoma in southern Spain. *Am J. Epidemiol* 1997; 145: 1020-1029.
 188. Rodenas Lopez JM, Delgado-Rodriguez M, Herranz MT, Tercedor J, Serrano S. Sun exposure, pigmentary traits, and risk of cutaneous malignant melanoma: a case-control study in a Mediterranean population. *Cancer Causes Control* 1996; 7 (2): 275-283.

189. Rodenas Lopez JM, Delgado Rodriguez M. Factores de riesgo en el melanoma cutáneo en una población del sur de España. *Actas Dermosifiliograficas* 1996; 87: 243-252.
190. Rodenas Lopez JM. Factores de riesgo en el melanoma maligno cutáneo. Tesis Doctoral. Granada: Universidad de Granada 1994
191. Rogers GS, Kopf AW, Rigel DS et al. Influence of anatomic location on prognosis of malignant melanoma. *J Am Acad dermatol* 1986; 15: 231-237.
192. Rook AJ, Wilkinson DS, Ebling FJG. *Textbook of Dermatology*. Fifth edition. Edited by RH Champion, JL Burton and FJG Ebling. Blackwell Scientific Publications. 1998; Chapter 34: 1545-1560.
193. Rubio Ruiz J, Giménez García R, Naveiro Rilo J, Salcedo joven V, Diaz Estrada M, Mayoral Gómez A. Estudio epidemiológico y clínico del melanoma maligno cutáneo en el área sanitaria de León. *Med Clin* 1991; 97: 683-696.
194. Saida T, Ishihara Y, Tokuda Y. Effective detection of plantar Malignant melanoma. *Int J Dermatol* 1993; 32: 722-725.
195. Sandberg AA. *The chromosome in human cancer and leukemia*, 2d ed. New York, Elsevier, 1990.
196. Sasaki A, Kubo M, Hasan S, Yano Y and Kahimura M. Regulation of human HST expression by an enhancer element residing in the third exon. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 1191-1195.
197. Schapers RFM, Smeets AWGB, Pauwels RPE, Van Den Brandt PA, Bosman FT. Cytogenetic analysis in transitional cell carcinoma of the bladder. *Br J Urol* 1993; 72: 887-893.

-
198. Schhring E. The involvement of the chromosome 11q13 region in human malignancies: cyclin D1 and EMS1 are two new candidate oncogenes: a review. *Gene* 1995; 159: 83.
 199. Schimke RT. Gene amplification in cultured cells. *J Biol Chem* 1988; 263: 5989.
 200. Schreiber MM, Bozzo PD, Moon TE. Malignant melanoma in southern Arizona : increasing incidence and sunlight as an etiologic factor. *Arch Dermatol* 1981; 117: 6-11.
 201. Sekiya T, Fushimi M, Hirohashi S, Tokunaga A. Amplification of activated c-Ha-ras-1 in human melanoma. *Jpn J Cancer Res* 1985 Jul; 76(7): 555-558.
 202. Shapiro DN, Valentine MB, Rowe ST, Sinclair AE, Sublett JE, Roberts WM, Look AT. Detection of NMYC gene amplification by fluorescence in situ hybridization. Diagnostic utility for neuroblastoma. *Am J Pathol* 1993; 142: 1339.
 203. Shaw JP, Goldsmith HS. Malignant melanoma in the nort american negro. *Surg Gynecol Obstet* 1971; 133: 437-439.
 204. Sherman CD. Melanoma. *Manual of Clinical Oncology*. UICC. Fifth Edition. Ed.Springer-Verlag D.K. Hosfeld, 1990 ; 179-187.
 205. Shiga C, Shiga K, Hirayama K, Katayama M, Mishihira T and Mori S. Prognostic significance of HST-1 gene amplification in primary esophageal carcinomas and its relatilnship to ortther prognostic factors. *Anticancer Res* 1994; 14: 651-656.
 206. Singlestary SE, Balch CM. Malignant Melanoma. *American Cancer Society Texbook of Clinical Oncology*. Ed. American Cancer Society Inc., Atlanta 1991: 263-270.
 207. Sluysen M. *Molecular Biology of cancer cells*. Ellis Horwood. Chichester, 1990.

-
208. Sobrero A, Bertino JR. Clinical aspects of drug resistance. *Cancer surv* 1986; 5: 93-106.
 209. Solz W, Schmoeckel C, Landthaler M, Braun Falco O. Association of early malignant melanoma with melanocytic nevi. *Cancer* 1989; 63: 550-555.
 210. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, Tornielli S, Pilotti S, De Gregorio L, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K, Croce CM. The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* 1996; 85: 17.
 211. Stanbridge EJ, Nowell PC. Origins of human cancer revisited. *Cell* 1990; 63: 867.
 212. Strohmeyer T, Peter S, Hartmann M, Munemitsu S, Ackermann R, Ullrich A and Slamon D.J. Expression of the HST-1 and C-Kit protooncogenes in human testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 1991; 51: 1811-1816.
 213. Su YA, Ray ME, Lin T, Seidel NE, Bodine DM, Meltzer PS, Trent JM. Reversion of monochromosome-mediated suppression of tumorigenicity in malignant melanoma by retroviral transduction. *Cancer Res* 1996; 56: 3186.
 214. Sugimura T, Yoshida T, Sakamoto H, Katoh O, Hattori Y and Terada M. Molecular biology of the HST-1 gene. *Ciba Found Symp* 1990; 150: 79-89; discussion 89-98.
 215. Terada M, Yoshida T, Sakamoto H, Sakamoto et al. Biological significance of the HST-1 gene. *Int Symp Princess Takamatsu Cancer Res Fund* 1989; 20: 71-80.
 216. Theillet C, Adelaide J, Louason GFB, Jacquemier J, Adane J, Longy M, Katsaros D, Sismondi P, Gaudray P et al. FGFR1 and PLAT genes and DNA amplification at 8p12 in breast and ovarian cancers. *Genes Chromosom Cancer* 1993; 7: 219.
 217. Theillet C, Le Roy X, De Lapeyriese O, Grosgerges J, Adane J, Raynaud SD, Simony-Lafontaine J, Goldfarb M, Escot C and Birnbaum D. Amplification of FGF-

- related genes in human tumors: possible involvement of HST in breast carcinomas. *Oncogene* 1989; 4: 915-922.
218. Thompson FH, Emerson J, Olson S, et al. Cytogenetics in 158 patients with regional or disseminated melanoma: Subset analysis of near diploid and simple karyotypes. *Cancer Genet Cytogenet* (in press).
219. Thompson FH, Liu Y, Alberts D, Taetle R, Trent JM. Cytogenetic findings in 51 colorectal carcinomas: Correlations with sample site (abstract). *Am J Hum Genet* 1993; 53.
220. Trent JM, Stanbridge EJ, McBride HL, et al. Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. *Science* 1990; 247: 568.
221. Trent JM, Thompson FH, Meyskens FL. Identification of a recurring translocation site involving chromosome 6 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 1989; 49: 420.
222. Trent JM, Yang J-M, Thompson FH, Leibovitz A, Villar H, Dalton WS. Chromosome alterations in human breast cancer. Ellis Horwood 1987, pag 142.
223. Tsuda T, Nakatani H, Matsumura T, Yoshida K, Tahara E, Nishihira T, Sakamoto H, Yoshida T, Terada M and Sugimura T. Amplification of the HST-1 gene in human esophageal carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1988; 79: 584-588.
224. Tsuda T, Tahara E, Kajiyama G, Sakamoto H, Terada M and Sugimura. Incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas. Department of Pathology, Hiroshima University School of Medicine, Japan.
225. Tucker MA, Crutcher WA, Hartge P, Sagebiel RW. Familial and cutaneous features of dysplastic nevi: a case-control study. *J Am Acad Dermatol* 1993; 28: 558-564.

-
226. Tucker MA, Fraser MC, Goldstein AM, Elder DE, Guerry IV DP, Organic SA. Risk, of melanoma and other cancers in melanoma-prone families. *J Inves Dermatol* 1993; 100: 350S-355S.
 227. Vaisanen A, Kallioinen M, Taskinen PJ, Turpeenniemi-Hujanen T. Prognostic value of MMP-2 immunoreactive protein (72kD type IV collagenase) in primary skin melanoma. *J Pathol* 1998 Sep; 186: 51-58.
 228. Van der Esch EP, Cascinelli N, Preda F, Morabita A, Bufalino R. Stage I melanoma of the skin. Evaluation of prognosis according to histologic characteristics. *Cancer* 1981; 48: 1668-1673.
 229. Varmus H, Weinberg RA. Genes and the biology of cancer. Scientific American Library. New York, 1993.
 230. Veronesi U, Cascinelli N, Adamus J et al. Thin stage I primary cutaneous malignant melanoma. *N Engl J Med*. 1988; 318: 1159-1162.
 231. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532.
 232. Volkenandt M, Schlegel U, Nanus DM, Albino AP. Mutational analysis of the human 53 gene in malignant melanoma cell lines. *Pigment Cell Res* 1991; 4: 35.
 233. Volling P, Jungehulsing M, Jucker M, Stutzer H, Diehl V and Tesh H. Coamplification of the HST and bcl-1 oncogenes in advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *Eur J Cancer* 1993; 29^a: 383-389.
 234. Wabinga HR, Parkin DM, Wabwire-Mangen F, Mugerwa JW. Cancer in Kampala, Uganda, in 1989-91: changes in incidence in the era of AIDS. *Int J Cancer* 1993; 54: 26-36.

-
235. Wagner SN, Ockenfels HM, Wagner C, Hofler H, Goos M. Ras gene mutations: a rare event in nonmetastatic primary malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 1995 May; 104 (5): 868-871.
236. Walker GJ, Hussussian CJ, Flores JF, Glendening JM, Haluska FG, Drocopoli NC, Hayward NK, Fountain JW. Mutations of the CDKN2/p16INK4 gene in Australian melanoma kindreds. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1845.
237. Walker MJ, Silliman E, Dayton MA, Lang JC. The expression of C-myc in human metastatic melanoma cell lines and specimens. *Anticancer Res* 1988; 18: 1129-1135.
238. Wallasch C, WeissFU, Niederfellner G, Jallal B, Issing W, Ullrich A. Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3. *EMBO J* 1995 Sep 1; 14(17): 4267-4275.
239. Wang M-R, Perissel B, Taillandier J, Kemeny JL, Fonck Y, Lautier A, Malet P. Nonrandom changes of chromosome 10 in bladder cancer- detection by FISH to interphase nuclei. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 73: 8-10.
240. Weaver-Feldhaus J, Gruis NA, Neuhausen S, Le Paslier D, Stockert E, Skolnick MH, Kamb A. Localization of a putative tumor suppressor gene by using homozygous deletions in melanomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 7563.
241. Weinstock MA, Morris BT, Lederman JS et al. Effect of BANS location on the prognosis of clinical stage I melanoma. *Br J Dermatol* 1988; 119: 559-565.
242. Weinstock MA, Sober AJ. The risk of progression of lentigo maligna to lentigo maligna melanoma. *Br J Dermatol* 1987; 116: 303-310.
243. Welch DR, Chen P, Miele ME, McGary Ct, Bower JM, Stanbridge EJ, Weissman BE. Microcell-mediated transfer of chromosome 6 into metastatic human C8161

- melanoma cells suppresses metastasis but does not inhibit tumorigenicity. *Oncogene* 1994; 9: 255.
244. White E, Kirkpatrick CS, LeeJA. Case-control study of malignant melanoma in Washington State. I. Constitutional factors and sun exposure. *Am J Epidemiol* 1994; 139: 857-868.
245. Wingo PA, Tong T, Bolden S. *Cancer Statistics 1995*. CA 1995; 45: 8.
246. Xiang J, Lahti JM, Grenet J, Easton J, Kidd VJ. Molecular cloning and expression of alternatively spliced PITSLRE protein kinase isoforms. *J Biol Chem* 1994 Jun 3; 269 (22): 15786-15794.
247. Yang R, Gombart AF, Serrano M, Koeffler P. Mutational effects on p16 INK4a. *Cancer Res* 1995; 55: 2503.
248. Yoshida MC, Wada M, Satoh H, Yoshida T, Sakamoto H, Miyagawa K, Yokota J, Koda T, Kakinuma M, Sugimura T, Yoshida ****et al Human HST1 (HSTF1) gene maps to chromosome band 11q13 and coamplifies with the INT2 gene in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 Jul; 85 (13): 4861-4864.
249. Yoshida T, Miyagawa K, Odagiri H, Sakamoto H, Little PF, Terada M, Sugimura T. Genomic sequence of HST, a transforming gene encoding a protein homologous to fibroblast growth factors and the int-2 encoded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 Oct; 84: 7305-7309.
250. Yoshida T, Miyagawa K, Odagiri H, Sakamoto H, Little PF, Terada M, Sugimura T. Genomic sequence of hst, a transforming gene encoding a protein homologous to fibroblast growth factors and the int-2-encoded protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987 Oct; 84: 7305-7309.

-
251. Yoshida T, Sakamoto H, Miyagawa K, Odagiri H, Terada M. Studies on HST a transforming gene wich belong to a new superfamily of growth factors. Hum Cell 1988; 1: 10-16.
 252. Yoshida T, Sakamoto H, Terada M. Amplified genes in cancer in upper digestive tract. Semin Cancer Biol 1993 Feb; 4: 33-40.