



Dpto. de Histología y Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

**MELANOMA CUTÁNEO:
LINFANGIOGÉNESIS TUMORAL Y SU
RELACIÓN CON EL ESTADO DEL
GANGLIO CENTINELA**

Elena Gallego Domínguez

Julio 2009



AUTOR: Elena Gallego Domínguez

Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Málaga

ISBN: 978-84-9747-630-0



Esta obra está sujeta a una licencia Creative Commons:

Reconocimiento - No comercial - SinObraDerivada (cc-by-nc-nd):

[Http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es)

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o
hacer obras derivadas.



Dpto. de Histología y Anatomía Patológica
Facultad de Medicina
Universidad de Málaga

Prof. Dr. Luís Vicioso Recio, Prof. Titular de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga.

Prof. Dr. D. Alfredo Blanes Berenguel, Catedrático de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga.

Prof. Dr. D. Alfredo Matilla Vicente, Catedrático de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga.

CERTIFICAN:

Que DÑA. **ELENA GALLEGO DOMÍNGUEZ**, ha realizado personalmente y bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral "**MELANOMA CUTÁNEO: LINFANGIOGÉNESIS TUMORAL Y SU RELACIÓN CON EL ESTADO DEL GANGLIO CENTINELA**", que ha sido concluido con todo aprovechamiento, habiendo los que suscriben revisado esta Tesis y estando conformes con su presentación para ser juzgada.

Prof. Dr. D. L. Vicioso

Prof. Dr. D. A. Blanes

Prof. Dr. D. A. Matilla

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES ETIOLÓGICOS DEL MELANOMA CUTÁNEO

1.1. Incidencia	4
1.2. Edad y sexo	5
1.3. Raza	5
1.4. Factores de riesgo	5

2. ASPECTOS CLÍNICOS DEL MELANOMA CUTÁNEO

8

3. ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL MELANOMA CUTÁNEO

3.1. Histología de la piel. El melanocito. La síntesis de melanina	9
3.2. Variantes clínico-patológicas del melanoma	11
3.3. Tipos celulares y perfil inmunohistoquímico	23
3.4. Progresión local y metástasis	27

4. FACTORES PRONÓSTICOS

4.1. Relativos al tumor	31
4.2. Relativos al huésped	56

5. GANGLIO LINFÁTICO CENTINELA

5.1. El sistema linfático	60
---------------------------	----

5.2. Ganglio linfático centinela	65
5.3. Estudios inmunopatológicos y moleculares	71
6. LINFANGIOGÉNESIS	77
II. OBJETIVOS	91
III. MATERIAL Y MÉTODO	
1. MATERIAL	94
2. DATOS REGISTRADOS DE CADA CASO	94
3. PROTOCOLO DE GANGLIO CENTINELA DE MELANOMA	99
4. ESTUDIO DE LA LINFANGIOGÉNESIS	102
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	105
IV. RESULTADOS	106
V. DISCUSIÓN	128
VI. CONCLUSIONES	141
VII. BIBLIOGRAFÍA	143

I. INTRODUCCIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES ETIOLÓGICOS DEL MELANOMA CUTANEO

1.1. Incidencia

El melanoma cutáneo es una enfermedad de distribución mundial, con una frecuencia variable según las distintas áreas geográficas. Diversos autores han comprobado que la incidencia del melanoma maligno ha aumentado significativamente durante las dos últimas décadas, en la población blanca de distintos países industrializados, y existe cierta evidencia que sugiere que las tasas de incidencia seguirán aumentando durante la próxima década o más (*Rigel DS et al, 1996*), (*Armstrong BK, Kricger A, 1994*). A pesar de esta alarmante cifra, el pronóstico ha continuado mejorando, ya que los pacientes se diagnostican en estadios más precoces con lesiones más pequeñas y, por tanto, potencialmente curables (*Shafir R et al, 1982*). La incidencia más alta de melanoma se encuentra en el estado de Queensland en el norte de Australia con 42,89 nuevos casos en mujeres, y 55,8 en hombres por cada 100.000 habitantes, al año (*Mac Lennan et al, 1992*). Nueva Zelanda, Hawai y California presentan también una elevada tasa de incidencia (*Whelan SL et al, 1990*).

En España se diagnostican unos 3.200 casos anuales. La incidencia en nuestro país se puede considerar alta (tasa ajustada mundial en 2002: 5,3 nuevos casos/100.000 habitantes/año en hombres y 5,5 en mujeres), con un ascenso muy importante, especialmente desde los años 90 (*López-Abente G et al, 2004*).

En Andalucía se registraron 7,38 y 8,34 casos por 100.000 habitantes en Granada y Sevilla, respectivamente, durante el año 1990

y en Málaga, entre los años 1990-1994, la incidencia registrada fue de 6,8 por 100.000 habitantes (Márquez AJ, 1999).

1.2. Edad y sexo

La edad de aparición abarca desde los 15 a los 70 años, aunque sigue una distribución bimodal, con un primer pico de incidencia a los 50-59 años en varones, 40-49 para las mujeres, y un segundo pico de incidencia por encima de los 70 años para ambos sexos (Popescu NA et al, 1990). La incidencia en general es superior en la mujer, en una proporción de 2:1, pero existen grandes variaciones según las diferentes áreas geográficas (Armstrong BK, English DR, 1992).

1.3. Raza

La raza blanca es la que presenta mayor incidencia de melanoma cutáneo, frente a la raza negra y la asiática. En la raza amarilla la incidencia es mucho menor que en la raza blanca, con tan solo 1 caso por cada 100.000 habitantes y año, y de éstos, un 74% se localizan en zonas acras. (Collins RJ, 1984).

1.4. Factores de riesgo.

1.4.1. Factores ambientales. La radiación ultravioleta B es considerada el principal factor etiológico del melanoma cutáneo (Sober AJ, 1987) (Rodenas JM et al, 1996) (Langley RG, Sober AJ, 1997). A medida que nos acercamos al ecuador la incidencia del melanoma aumenta. Estas radiaciones producen lesiones en el material genético que no pueden ser reparadas. La exposición solar durante la infancia con dos o más episodios de quemaduras dolorosas o con formación de ampollas antes de los 20 años parece ser un factor de riesgo importante (Lew RA et al, 1983) (Auter P et al, 1997). Especial

importancia parece tener la exposición solar intermitente, sobre todo en personas que no broncean y en aquellos que lo hacen pobremente (*Armstrong BK, 1988*). La exposición a rayos ultravioletas en salas de bronceado también se ha relacionado con aumento del riesgo de padecer melanoma (*Walter SD et al, 1990*) (*Bataille V, 2003*). La disminución de la capa de ozono favorece el paso de la radiación ultravioleta B por lo que es posible un aumento de la incidencia de melanoma relacionado con este cambio ambiental.

1.4.2. Factores fenotípicos. Los individuos con piel clara, pelo rubio o rojizo, con presencia de múltiples pecas y con tendencia a la quemadura y a broncear poco, presentan un fototipo especial que junto a la exposición solar aumentan la incidencia de melanomas. (*Beral V et al, 1983*) (*Rodenas JM et al, 1996*) (*Garbe C y Orfanos CE, 1992*).

La presencia de ciertos tipos de nevos parece ser también un factor de riesgo. Los nevos congénitos grandes (especialmente cuando su tamaño es superior a 20 cm.) y los nevos displásicos han sido reconocidos como lesiones precursoras durante mucho tiempo. (*Schneider JS et al, 1994*) (*Kroon BB et al, 1997*) (*Newton JA et al, 1993*). El fenotipo del síndrome del nevus displásico está presente en el 15% de los melanomas (*Newton JA et al, 1993*) (*Halpern AC et al, 1991*). La presencia de nevos banales sólo parece estar implicada en la etiología del melanoma cuando aparecen en un número muy elevado (más de 50 nevos), esto es, lo que Briollais et al llamaron fenotipo GNN (gran número de nevos) (*Briollais L et al, 1996*).

1.4.3. Factores genéticos: la mayor incidencia de melanoma en miembros de la misma familia ha llevado al estudio de posibles genes

responsables de esta enfermedad. Se han encontrado dos genes, el gen CDKN2A y el gen CDK4, que están permitiendo un mayor conocimiento de la biología del melanocito en relación con los defectos en la senectud. Por otro lado, se ha comprobado que el gen MC1R está relacionado con la coloración del pelo y de la piel y se está estudiando su relación con la inmunidad y la senectud (*Bataille V, 2003*). La relación entre el melanoma familiar y los genes CDKN2A y CDK4 no está clara, ya que los dos juntos se han identificado en un número muy bajo de casos de melanoma familiar y, Toker y Goldstein, han sugerido que la penetrancia de los mismos ha de estar alterada por otros factores genéticos o ambientales (*Toker MA y Goldstein AM, 2003*). En muchas familias con melanomas se ha encontrado una delección en el cromosoma 9 (9p21) (*Meyer LJ y Zone JH, 1994*).

Por otra parte, el denominado síndrome del nevus displásico representa un incremento en el riesgo de desarrollar melanoma (está presente en el 15% o más de los pacientes con melanoma) (*Halpern AC et al, 1991*). Este síndrome consiste en la aparición de múltiples nevus, principalmente en tronco, con unas características clínicas e histopatológicas especiales. Este síndrome suele ser de carácter familiar y presenta una herencia autosómica dominante aunque también puede presentarse de forma esporádica (*Clark WH et al, 1978*) (*Marghoob AA et al, 1996*).

1.4.4. Otros factores: han sido muchos los factores que se han relacionado con un mayor riesgo de padecer melanoma pero, en la mayoría de ellos, no se ha podido demostrar una relación causa-efecto. Parece haber un incremento del riesgo en trabajadores expuestos a

sustancias químicas como el cloruro de polivinilo, el peróxido de benzoilo, plaguicidas y radiaciones ionizantes, (Espinosa J et al, 1998) (Rockley PF et al, 1994), en cicatrices de quemaduras (Lee JY-Y et al, 1992) y sobre úlceras de Majolin (Gan BS et al, 1995). El estado inmunitario parece jugar un papel importante, ya que se ha descrito una mayor incidencia de melanoma en pacientes transplantados, en pacientes con enfermedades autoinmunes y tras radioterapia en pacientes con linfomas T cutáneos (Licatasa AG et al, 1995).

2. ASPECTOS CLÍNICOS DEL MELANOMA CUTÁNEO

Los signos clínicos que diferencian una lesión melanocítica benigna de un melanoma se conocen como el ABCDE del melanoma: asimetría, bordes irregulares, color variado, diámetro de la lesión mayor de 6 mm y elevación de la lesión. Los aspectos clínicos de las lesiones iniciales son iguales en todas las localizaciones anatómicas.

MacKie en 1990 publicó una revisión de 100 melanomas y describió unos signos clínicos mayores y menores (Tabla I.1).

Tabla I.1. Melanoma: signos clínicos mayores y menores

SIGNOS MAYORES	SIGNOS MENORES
Cambios en el tamaño.	Inflamación.
Cambios en la forma.	Costra o sangrado.
Cambios en el color.	Cambios sensoriales.
	Diámetro igual o mayor 7 mm

*Tomada de MacKie RM.,1990.

Los signos mayores los encontró en el 95% de las lesiones estudiadas. En cuanto a los signos menores, en el 51% había inflamación, en el 46% cambios sensoriales, y en el 31% sangrado o formación de costra.

En general, cualquier cambio en el aspecto clínico de un nevus melanocítico preexistente, o el desarrollo de una nueva lesión pigmentada, en particular después de los 40 años de edad, debe alertar al médico sobre la posibilidad de un melanoma (*Jones RE Jr et al, 1981*).

3. ANATOMÍA PATOLÓGICA DEL MELANOMA CUTÁNEO

3.1. Histología de la piel

La piel está constituida por una parte epitelial, de origen ectodérmico, la epidermis, y por una parte conjuntiva, de origen mesodérmico, la dermis. Por debajo y en continuidad con la dermis está la hipodermis que, aunque tenga el mismo origen que la dermis, no forma parte de la piel.

La epidermis está constituida por un epitelio pavimentoso poliestratificado, queratinizado (Fig I.1), que presenta los siguientes estratos: 1. basal; 2. espinoso; 3. granuloso; 4. lúcido; 5. córneo.

Además de los queratinocitos, la epidermis presenta otros tres tipos celulares, los melanocitos, las células de Langerhans y las células de Merkel. Los melanocitos son células que se originan de la cresta neural del embrión e invaden la piel entre las semanas 12 y 14 de vida

intrauterina (Fig I.2). Se trata de una célula de citoplasma globuloso y núcleo irregular y central; del citoplasma parten prolongaciones que se dirigen a la superficie de la epidermis.

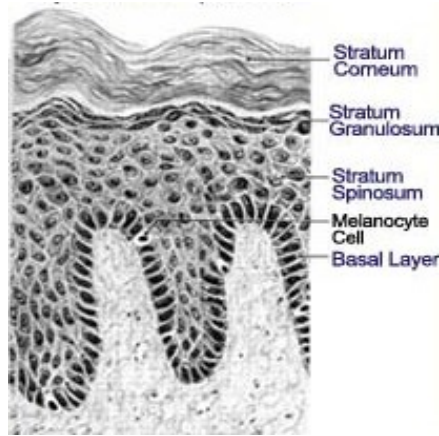


Figura I.1. Histología de la epidermis

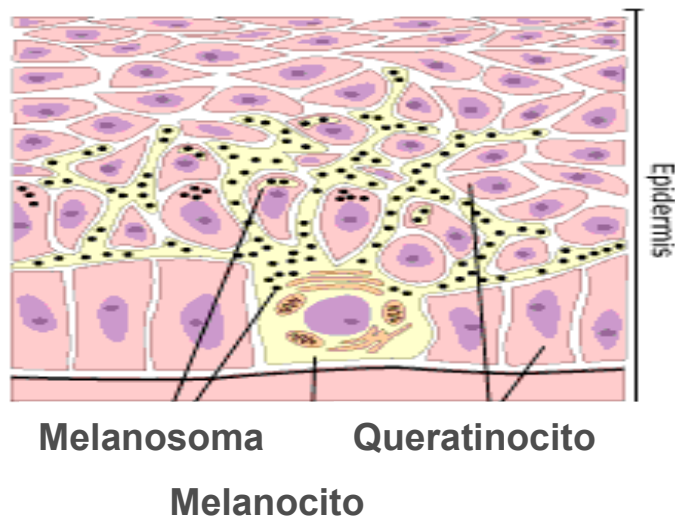


Figura I.2. Morfología del melanocito

Estas células sintetizan melanina, un pigmento que tiene función protectora frente a los rayos ultravioletas. En la síntesis de melanina la enzima tirosinasa desempeña un papel muy importante ya que transforma la tirosina, primero en DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina) y después en DOPA-quinona y, por último, se transforma en melanina. Se sabe que la tirosinasa se sintetiza en los ribosomas del melanocito y se acumula en unas vesículas redondeadas, melanosomas estadio I. La tirosinasa se dispone en una matriz proteica, formando delgados filamentos, dentro de los melanosomas tipo II (premelanosomas), lugar donde se inicia la síntesis de melanina. Estas vesículas se transforman en melanosomas tipo III, donde coexisten tirosina, melanina y tirosinasa. La melanina se deposita en los filamentos oscureciéndolos. Cuando se termina la síntesis de melanina los melanosomas pierden su actividad tirosinasa transformándose en melanosomas tipo IV ó gránulos de melanina (*Camacho F y Castells A 1998*).

3.2. Variantes clínico-patológicas del melanoma cutáneo

Actualmente, la mayoría de los autores reconocen cuatro tipos de melanomas, atendiendo a criterios clínicos, patológicos y epidemiológicos: melanoma de extensión superficial, lentigo maligno y lentigo maligno melanoma, melanoma lentiginoso acral y melanoma nodular. Pero existen otras variantes menos frecuentes, la mayoría de ellas bien diferenciadas (Tabla I.2) (*Garbe C et al, 1995; Reed RJ y Martin P, 1997; Ordóñez A et al, 1998*).

Tabla I.2. Variantes clínicopatológicas de melanoma

VARIANTES RECONOCIDAS	VARIANTES POCO FRECUENTES
Melanoma de extensión superficial	Melanoma de desviación mínima
Lentigo maligno y léntigo maligno melanoma	Melanoma desmoplásico
Melanoma lentiginoso acral	Melanoma neurotrófico
Melanoma nodular	Melanoma de células claras
	Melanoma verrucoso
	Melanoma de células en anillo de sello
	Melanoma con estroma mixoide
	Melanoma nevoide
	Melanoma melanofágico
	Melanoma de partes blandas

Melanoma de extensión superficial (MSE). También denominado por algunos autores melanoma pagetoide (*McGover VJ, 1970*), debido a la imagen que producen estas neoplasias al invadir la epidermis. Es el tipo encontrado con mayor frecuencia, constituyendo entre 53-70% de las lesiones diagnosticadas, aunque en algunas series alcanza hasta el 80% (*Clark WH et al, 1986; Milo Y et al, 1995; Garbe C et al, 1995*). Puede originarse en cualquier zona del cuerpo, si bien su localización más habitual es la parte superior de la espalda, en hombres, y las piernas, en mujeres (*Mckee PH et al, 1989.*). Afecta, principalmente, a adultos jóvenes de piel y pelo claro y está asociado a una historia de exposición solar intermitente. Es el tipo que generalmente se asocia con nevus pigmentocelulares (20-33% de los casos). También, puede observarse junto a nevus displásicos,

síndromes de melanomas familiares y melanomas primarios múltiples (Barnhill RL y Mihm MC, 1993).

La morfología clínica de esta lesión constituye el ejemplo más claro de la aplicación de la regla nemotécnica ABCDE (Fig I.3). La aparición de áreas sobreelevadas, nódulo-papulares o con fenómenos de ulceración debe hacer pensar en la fase crecimiento vertical de la lesión; es decir el melanoma está invadiendo en profundidad, pasando a una "fase tumoral". Su fase de crecimiento radial es muy corta y en el momento del diagnóstico, es, por lo general, superficialmente invasivo.

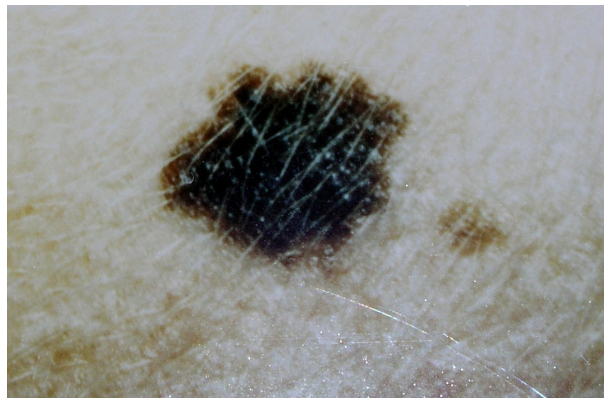


Figura I.3. Melanoma de extensión superficial

Histológicamente, las lesiones suelen ser irregulares y asimétricas, mostrando a nivel de la unión dermo-epidérmica, una proliferación de células melanocíticas atípicas, con citoplasmas más o menos amplios (1,5-2 veces el tamaño de un queratinocito), variable cantidad de pigmento melánico y núcleos pleomórficos, hipercromáticos y con nucléolos prominentes. Las células tumorales se extienden, en un primer momento, en sentido radial permeando la epidermis (en "suelta de zorros"), ascendiendo hasta el estrato granuloso y por la dermis superficial, para más tarde invadir los tejidos dérmicos en profundidad

(Fig I.4). A diferencia de los nevus pigmentocelulares y los nevus atípicos, las células neoplásicas no maduran en profundidad. En la base de la lesión puede observarse un infiltrado inflamatorio liquenoide, más o menos intenso. Pueden existir fenómenos de ulceración y de regresión.

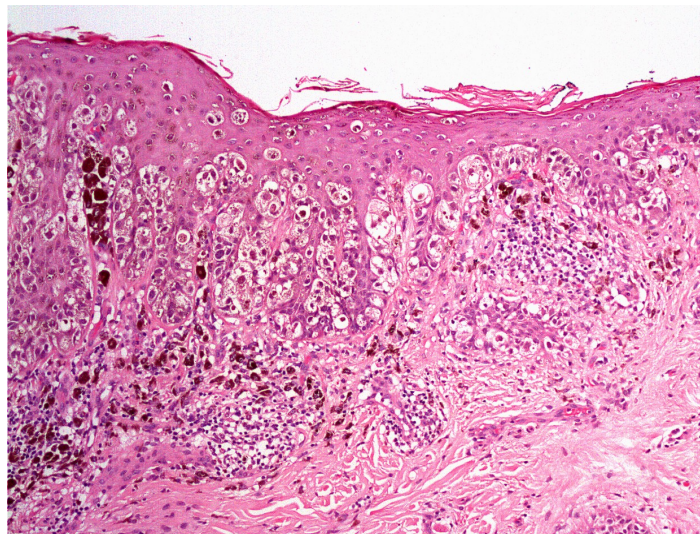


Figura I.4 Melanoma de extensión superficial: melanocitos atípicos ascendiendo por la epidermis hasta el estrato granuloso.

Lentigo maligno (LM) y lentigo maligno melanoma (LMM). Representan entre 10-12% de los melanomas (*Garbe C et al, 1995*). Generalmente se localizan en zonas de exposición solar continuada, principalmente en la cara y extremidades superiores de personas mayores (*Wayte DM y Helwig EB, 1986; Cohen LM, 1995*).

El LM, clínicamente se manifiesta como una mácula pigmentada irregularmente que se extiende lentamente (peca melanótica de Hutchinson). Existe gran variación en la coloración, con áreas bronceadas, oscuras, áreas rosadas y áreas hipopigmentadas, debido a los cambios regresivos que tienen lugar sobre ella (*Clak WH et al,*

1969). Es una lesión plana, no palpable. El LMM se caracteriza por un engrosamiento de la lesión con formación de placas elevadas o nódulos (fase de crecimiento vertical) (Fig I.5). El riesgo de progresión de LM a LMM es bajo, de aproximadamente el 5% (*Weinstock MA y Sober AJ, 1987*). En un 3% de los casos se asocia a nevos pigmentocelulares.

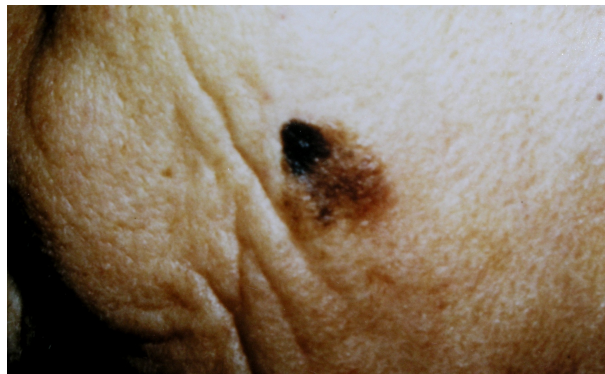


Figura I.5 Lentigo maligno melanoma

Histológicamente, la epidermis suele estar adelgazada o atrófica, siendo evidentes los cambios degenerativos actínicos producidos en el colágeno dérmico (elastosis solar). En el LM, los melanocitos atípicos se distribuyen en hileras o en pequeños nidos a lo largo de la unión dermo-epidérmica, extendiéndose, a veces, a la capa basal de los folículos pilosos y los conductos ecrinos, y mostrando, raramente, migración transepidérmica y/o mitosis, los cuales si se ven en el LMM (Fig I.6). Las células neoplásicas poseen un núcleo irregularmente agrandado, hipercromático y de contornos angulosos, con retracción citoplásmica focal. El componente invasor suele estar constituido por células fusiformes (*Weinstock MA y Sober AJ, 1987*).

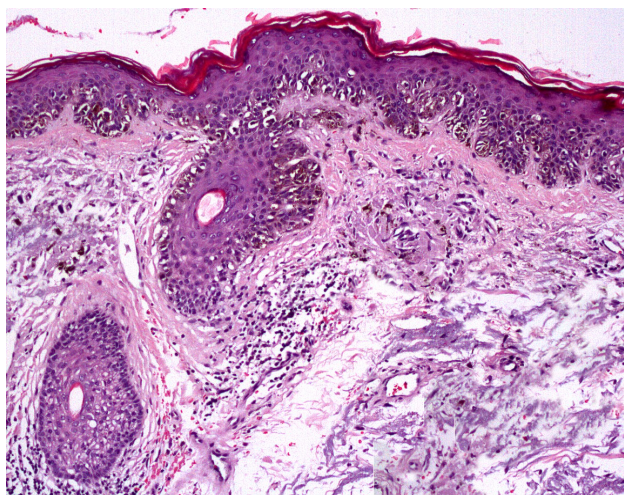


Figura I.6 Lentigo maligno melanoma

Melanoma lentiginoso acral (MLA). Representa del 10-12% de los melanomas (*Garbe C et al, 1995*). Generalmente, se localizan en piel de las palmas, plantas o en el lecho subungueal de pacientes de edad avanzada, siendo más frecuente en varones (*Vázquez M et al, 1984; Patterson RH y Helwig Eb, 1980*) son más frecuentes en la raza negra y en japoneses (*Coloman WP et al, 1980*). Clínicamente, se presenta como placas irregulares pigmentadas, en los casos de MLA "in situ" o microinvasor, o como nódulos pigmentados, frecuentemente ulcerados, en la fase de crecimiento vertical. La asociación con nevus pigmentocelulares es extremadamente rara.



Figura I.7 Melanoma lentiginoso acral

Histológicamente, el MLA se caracteriza, en la fase de crecimiento radial, por la presencia de células melanocíticas atípicas a lo largo de la unión dermo-epidérmica, con patrón lentiginoso, en hileras o formando pequeños nidos. Son células de núcleos hipercromáticos y contornos angulados. Los melanocitos pueden estar hinchados, con un halo claro circundante que les da una apariencia lacunar ó pueden tener procesos dendríticos fuertemente pigmentados (Weedon D, 2002). A diferencia del LM/LMM, la epidermis no está adelgazada, mostrando generalmente acantosis, y los cambios actínicos no son patentes. El componente invasivo puede estar formado por células fusiformes o epitelioides. Puede existir una respuesta estromal desmoplásica.

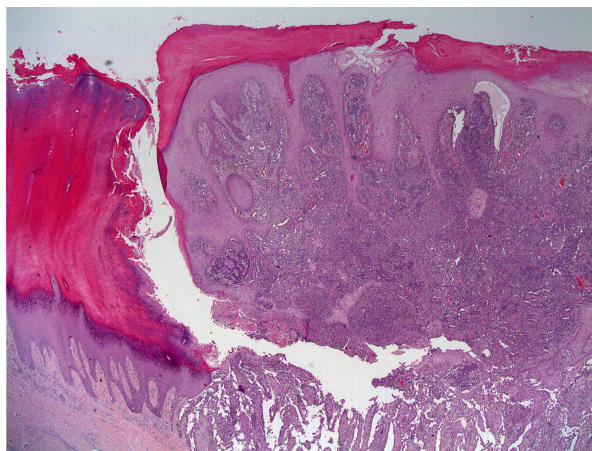


Figura I.8 Melanoma lentiginoso acral

Melanoma nodular (MN). La frecuencia del melanoma nodular oscila entre 10-19,3% (Garbe C et al, 1995). Por definición, el MN carece de fase de crecimiento radial y se extiende de forma vertical desde el inicio (Elder D et al, 1997). Clínicamente son lesiones papulosas o nodulares, de crecimiento rápido, a veces polipoides, a

veces pediculadas ulceradas o no, con coloración marronácea o azuladas. Afecta a pacientes, entre 40-50 años, con predominio por el sexo masculino y pueden localizarse en cualquier parte del cuerpo, aunque se observan con mayor frecuencia en el tronco y en las porciones proximales de las extremidades. En el 8% de los casos se asocian a nevus pigmentocelulares (Kiene P et al, 1995).



Figura I.9: Melanoma nodular

Histológicamente, está constituido por una masa de células atípicas (más frecuentemente epitelioides redondeadas u ovals, aunque también pueden ser fusocelulares, pleomórficas...), más o menos simétrica, sin componente de extensión lateral, que crece en sentido vertical infiltrando la dermis. También se produce invasión epidérmica de células neoplásicas directamente sobre la masa dérmica.

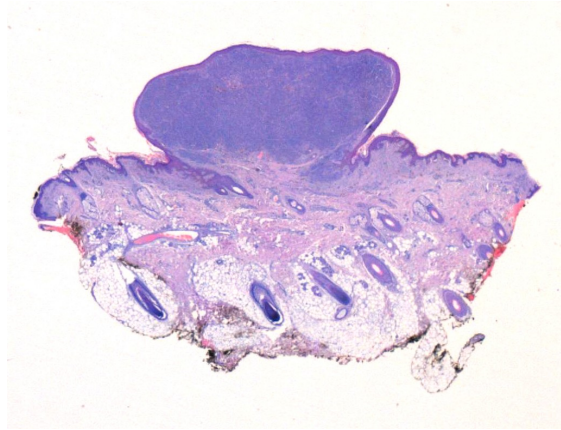


Figura I.10: Melanoma nodular

Otros tipos menos frecuentes de melanomas

Melanoma de desviación mínima. Este tipo de melanoma, considerado de mejor pronóstico, sólo es reconocido por algunos autores. Corresponde a melanomas en fase de crecimiento vertical cuyas células se diferencian mínimamente de las de un nevus. Para otros autores se trata de melanomas nevoides (*Stas M et al, 2000; Reed RJ, 1990*)

Melanoma desmoplásico. Representa menos del 1% de todos los melanomas (*Pizarro A et al, 1998*). Afecta, generalmente, a personas de edad avanzada, localizándose más frecuentemente en la cabeza o el cuello. Clínicamente se presenta como una placa indurada o como una tumoración pigmentada o no. Es frecuente la recidiva de la lesión tras su extirpación. Histológicamente, están constituidos por células fusiformes entremezcladas con haces de colágeno maduro en diferente cuantía, aunque por lo general este último suele ser muy abundante. Existe con frecuencia un componente epidérmico de lentigo maligno en el borde de la lesión (*Egbert B et al, 1988*). Las células tumorales a menudo son amelanóticas, pero son positivas para la

vimentina en todos los casos y para proteína S-100 y enolasa neuronal-específica en casi el 95%. Sin embargo, el HMB-45 es positivo tan solo entre el 0-20% (*Skelton HG et al, 1995; Anstey A et al, 1994*). Este hecho hace que se plantee con frecuencia el diagnóstico diferencial con tumores mesenquimales.

Melanoma neurotrofo. Son lesiones con tendencia a envolver los nervios de la dermis profunda y del tejido subcutáneo (*Reed RJ et al, 1979*). Clínicamente se presentan como lesiones poco específicas que se localizan preferentemente en la cabeza y el cuello. Es frecuente que las células neoplásicas pierdan el pigmento melánico. Está constituido por células fusiformes semejantes a las del neuroma por lo que se plantea el diagnóstico diferencial principalmente con tumores mesenquimales de extirpe neural (*Ackerman AB y Godomski J, 1984; Benda JA, 1997; Tsao H et al, 1997*).

Melanoma de células claras o balonzantes. Es una variante histológica rara, que supone alrededor de un 0,15% de todos los melanomas cutáneos. Clínicamente, se presentan como nódulos cutáneos o subcutáneos, poco dolorosos, que se localizan más frecuentemente en la cabeza, cuello y espalda. Está constituido, totalmente o en su mayoría, por células con citoplasmas claros y amplios y núcleos centrales con atipia moderada, siendo, a veces difíciles de separar de su contrapartida benigna (nevus de células balonzantes). Para algunos autores, al menos el 50% de las células deben tener este aspecto (*González C et al, 1997*). El aspecto de las células balonzantes se ha asociado a la presencia de diversas sustancias en el citoplasma: vesículas de protirosinasa, vacuolas lipídicas, glucógeno, etc. (*Kao GF*

et al, 1992). Suelen mostrar positividad para el HMB-45 (*Aloi FG et al, 1988*).

Melanoma verrucoso. Es una variante clínico-morfológica más frecuentemente del MES que hace referencia a una lesión de superficie irregular y papilomatosa, semejante a una verruga vulgar o un carcinoma verrucoso. Aparece con mayor frecuencia en espalda y extremidades de varones de edad media y avanzada. Histológicamente puede observarse una marcada hiperqueratosis y papilomatosis epidérmica (*Steiner A et al, 1988; Merkle T et al, 1991; Kamino H et al, 1990*).

Melanoma de células en anillo de sello. Constituye una variante extremadamente rara de melanoma. *Nakhleh et al (1990)* realizaron un estudio sobre 335 melanomas, con la finalidad de identificar variantes morfológicas inusuales, hallando tan solo dos casos compuestos por células en anillo de sello (*Nakhleh RE et al, 1990*). Se ha comprobado ultraestructuralmente que su aspecto se debe al cúmulo de filamentos de vimentina (*Sheibani K y Battifora H, 1988*).

Melanoma con estroma mixoide. Representan menos del 1% de los melanomas (*Nakhleh RE et al, 1990*). Esta variante fue descrita por primera vez en melanomas metastásicos, pero también se ha observado en lesiones primarias. La matriz mixoide parece derivar, según algunos autores, de células estromales reactivas más que de células estromales propiamente dichas. El estroma se tiñe con azul alcian, y las células tumorales expresan proteína S-100 y enolasa neuronal específica, pero no HMB-45 a pesar de que se ha demostrado en su citoplasma, con

microscopia electrónica, la presencia de premelanosomas (*Cabra B et al, 1998; Bhuta S, 1993; Sarode VE et al, 1992*).

Melanoma nevoide. Se trata de una lesión nodular formada, a su vez, por nódulos expansivos de células tumorales con escasa atipia que simulan un nevus compuesto o un nevus intradérmico. Estas células incluso pueden presentar maduración en profundidad. El diagnóstico se realiza por la presencia de mitosis en profundidad de la lesión y por la presencia de nucléolos también en la base. Se reconocen dos variantes histológicas, una de células pequeñas, similares a las de un nevus, y otra de células fusiformes, similares a las del nevus de Spitz, con el que hay que realizar el diagnóstico diferencial. Inmunohistoquímicamente son positivos para la S-100, HMB-45, antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y Ki-67 (*McNutt NS et al, 1995; Stas M et al, 2000; Schmoeckel C et al, 1985*). Aunque en algunos estudios se planteaba un mejor pronóstico para este tipo de melanoma, estudios posteriores han desmentido este hecho (*Wong T-Y et al, 1995; Zembowicz A et al, 2001; Cassarino DS et al, 2003*).

Melanoma melanofágico (tipo ecrino). Es una variante de melanoma de color azabache y compuesto por células epitelioides y dendríticas fuertemente pigmentadas con numerosos melanófagos. Se parece al tumor visto en muchos caballos grises, que es una lesión progresiva, de crecimiento lento, generalmente benigna. En humanos se comporta de forma impredecible, con metástasis descritas en varios casos (*Weedon D, 2002*).

Melanoma de partes blandas (sarcoma de células claras). Se origina en relación con tendones y aponeurosis, principalmente de las extremidades. Sus células son redondas o fusiformes, con citoplasma claro, y se disponen formando nidos separados por finos tractos fibrosos. La melanina y el glucógeno se observan hasta en 2/3 de los casos. Las células habitualmente expresan S-100 y/o HMB-45 y la citoqueratina Cam 5.2 también pueden expresarla (*Sara AS et al, 1990; Bisceglia M et al, 1998; Scott GA y Trepeta R, 1993; Mooi WJ et al, 1995*).

3.3. Tipos celulares y perfil inmunohistoquímico

Las células tumorales observadas pueden ser de morfología diversa, reconociéndose fundamentalmente las variantes epitelioides, fusocelulares y pleomórficas, aunque existen otros tipos menos frecuentes como los de células en anillo de sello, células claras o balonizantes, o con caracteres rabdoideas (*Aloi FG et al, 1988; Sheibani K et al, 1988*). Las **células epitelioides** presentan núcleo redondo u oval, con citoplasma amplio, con un diámetro 1,5 veces mayor que el diámetro nuclear. Las **células fusiformes** poseen núcleo y citoplasma alargados (sarcomatoides). Las células pleomórficas pueden ser mono o multinucleadas, grandes y bizarras. El tipo celular mas frecuente en el componente invasivo es el epitelioides (*Barnhill RL, 2004*).

El tamaño celular oscila entre células pequeñas, de tamaño similar a un linfocito, sin apenas citoplasma, o cuboideas, con citoplasma poligonal, escaso, con núcleo pequeño de localización central, hasta células gigantes multinucleadas (*Rosai J, 1994*).

Inmunohistoquímica

Las células del melanoma presentan positividad para marcadores inmunohistoquímicos tales como proteína S-100, HMB-45, MELAN-A/MART-1, NKI/C3, enolasa neuronal específica y vimentina.

La **proteína S-100** es una proteína ácida, ligadora de calcio que fue aislada por primera vez en el tejido cerebral. Es positiva en prácticamente el 100% de los melanomas primarios cutáneos y en sus metástasis y es positivo también en la mayoría de los melanomas desmoplásicos. No obstante, también se marcan con este anticuerpo los nevos, las células de Langerhans así como los tumores de extirpe neural. Por lo tanto, aunque es un marcador altamente sensible de melanoma, es muy poco específico de este tumor (*Cochran AJ et al, 1993; Orchard GE, 2000*).

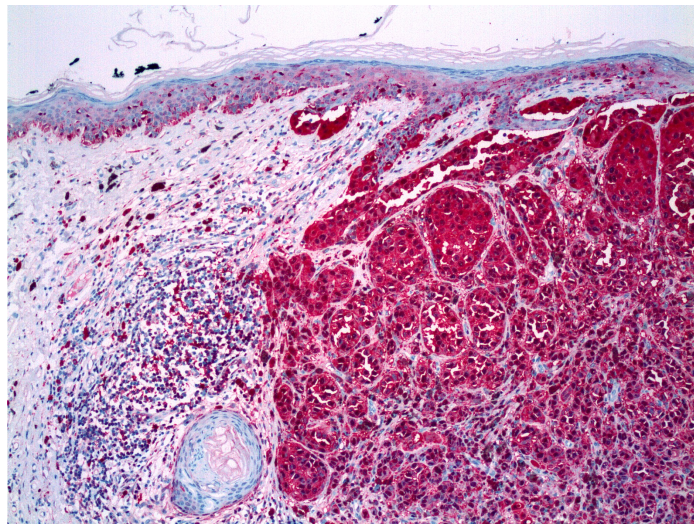


Figura I.11: Melanoma cutáneo: inmunoexpresión de S-100

El **HMB-45** es un anticuerpo monoclonal con especificidad selectiva para las células del melanoma. Tiñe los melanosomas precoces en su formación (melanosomas estadio I y II y la porción no melanizada de los melanosomas estadio III), no tiñe los melanosomas estadio IV ni los melanosomas complejos de los queratinocitos así como tampoco los melanófagos (*Schaumburg-Lever G et al, 1991*). Además, tiñe melanocitos estimulados, como los de la unión en un nevus y las células névicas de la dermis en lesiones pigmentadas de algunos pacientes infectados por el VIH (*Smith KJ et al, 1993*), nevus azul, nevus penetrante profundo y algunas células en la dermis papilar del nevus displásico y del nevus de Spitz (*Weedon D, 2004*). Es un marcador altamente específico de melanoma (algunos autores hablan del 100% de especificidad) pero menos sensible que la proteína S-100 (93%) (*Wick MR et al, 1988*). Se ha observado positividad en algunos casos de cáncer de mama así como en el angiomiolipoma renal (*Tuna EB et al, 2003*). Sin embargo, no se tiñen con HMB-45 algunos melanomas fusocelulares ni la mayor parte de los melanomas desmoplásicos (*Anstey A et al, 1994; Walts AE et al, 1988*).

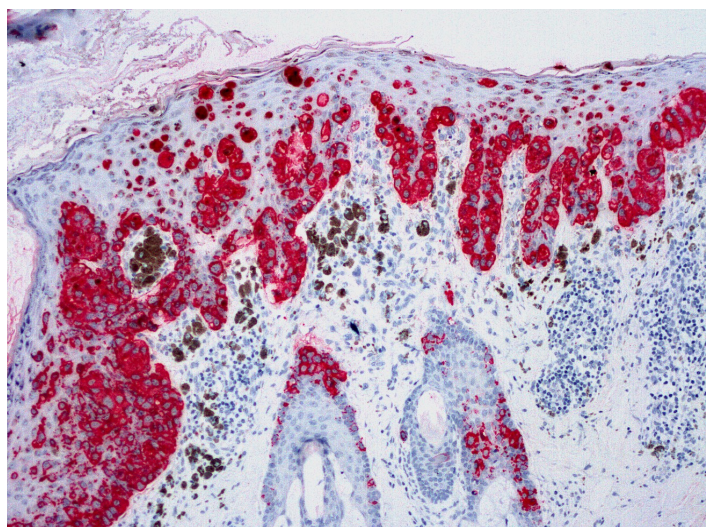


Figura I.12: Melanoma cutáneo: inmunopresión de HMB-45

El **Melan-A/MART-1** es una proteína transmembrana cuya función es aún desconocida. Es positivo en el 90% de los melanomas así como en los melanocitos (*Murer K et al, 2004*). No se ha demostrado positividad en ningún otro tumor, tan sólo (como ocurre con en HMB-45), en el angiomiolipoma renal (*Tuna EB et al, 2003*).

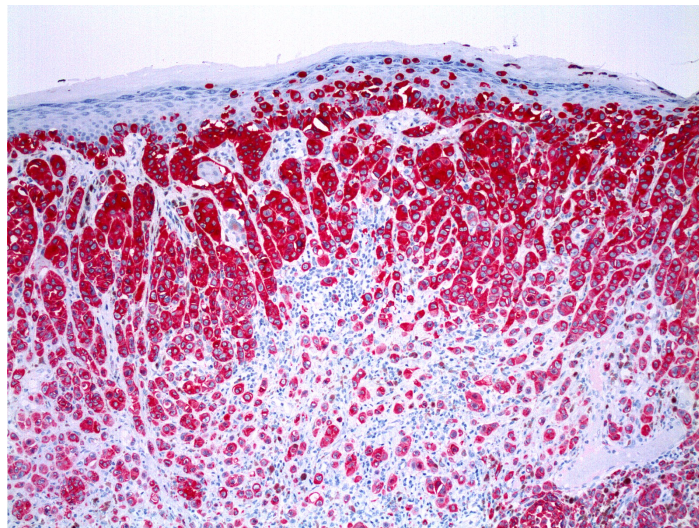


Figura I.13: Melanoma cutáneo: inmunexpresión de melan A

El **NKI/C3** es un anticuerpo que reconoce una proteína premelanosómica y presenta una tinción similar al Melan-A, con una sensibilidad de aproximadamente el 95%. La mayor parte de los melanomas que no se tiñen con este antígeno son de tipo fusocelular (*Fernando SS et al, 1994*).

La **tirosinasa** es una enzima que regula la fase inicial de la síntesis de la melanina (paso de tirosina a DOPA) tanto en los melanocitos como en las células de melanoma. Esta puede ser detectada inmunohistoquímicamente en melanocitos de la epidermis, en lesiones melanocíticas benignas así como en melanomas. En las lesiones

benignas tiñe fuertemente las células de la unión y de la dermis superficial. En melanomas la tinción es difusa y, en algunos estudios, se recoge hasta una sensibilidad del 94% en melanomas, siendo negativa en los casos de melanomas desmoplásicos estudiados (*Clarkson KS et al, 2001; Hofbauer GF et al, 1998; Yao-Tseng Chen et al, 1995*).

La **enolasa neuronal específica** es positiva también en el melanoma y, para algunos autores, puede ser una herramienta útil en el diagnóstico diferencial de éste con algunos nevus como el de Spitz (*Dhillon AP y Rode J, 1982*).

Por su parte la vimentina, que es un marcador propio de células mesenquimales, es positiva en lesiones melanocíticas, mostrando una tinción variable en todos los casos de melanoma, con predominio en las células de la periferia de la lesión (*Puches R et al, 1991*).

Es importante señalar que, aunque la mayor parte de los melanomas son citoqueratina negativos, puede encontrarse algún caso en que exista reactividad para ellas, especialmente en los melanomas metastásicos que pueden sufrir un cambio en su inmunofenotipo y presentar positividad frente a citoqueratinas y negatividad para el HMB-45 aún cuando su tumor primario fuese HMB-45 positivo y citoqueratinas negativo (*Ben-Izhak O et al, 1994*).

3.4. Progresión local y metástasis

Una vez que se produce la transformación neoplásica de los melanocitos, la historia natural del melanoma pasa por, al menos, tres estadios histológicos diferentes que tienen como veremos más

adelante, una gran importancia en el curso evolutivo de la enfermedad (*Elder DE et al, 1997*).

En una primera fase, que viene definida por la lesión no invasora o melanoma "in situ", la proliferación neoplásica ya establecida queda confinada a la epidermis. Es una etapa de duración variable, en la que las células tumorales se extienden a lo largo de la capa basal, permeando la epidermis y extendiéndose a los anejos cutáneos.

En una segunda fase, las células neoplásicas aisladas, o en pequeños grupos, invaden la dermis, pero sin formar una "verdadera masa tumoral", lesión que se denomina melanoma microinvasor. Para algunos autores, en esta fase las células carecen de capacidad proliferativa y de formar verdaderos nódulos tumorales lo que se traduce en la escasa capacidad metastásica de estas lesiones (*Elder DE et al, 1984; Elder DE y Murphy GF, 1991*).

Por último, las células del melanoma pueden dar lugar a la formación de una verdadera masa tumoral, definida por la presencia en la dermis de, al menos, un nido de células tumorales de mayor tamaño que los nidos intraepidérmicos o junturales observados y/o presencia de mitosis en el componente tumoral dérmico, hechos que definen al melanoma en fase tumoral (*Elder DE et al, 1997*).

Clásicamente, los melanomas "in situ" y los microinvasivos se han incluido en la categoría de melanomas no tumorales o en fase de crecimiento radial; mientras que los melanomas tumorales se han denominado melanomas en fase de crecimiento vertical. En la tabla 3,

tomada de Elder et al, 1997 se recogen los principales tipos de melanoma.

En el primer grupo se incluyen el melanoma de extensión superficial, lentigo maligno, lentigo maligno melanoma, melanoma lentiginoso acral y melanoma en fase de crecimiento radial no clasificable, tanto en su forma *in situ* (sin rebasar la membrana basal) como microinvasivo (las células tumorales invaden la dermis papilar pero sin formar una verdadera masa tumoral).

El segundo grupo está constituido por dos categorías, una en la que no se aprecia fase de crecimiento radial, el melanoma nodular, y una segunda categoría donde sí se aprecia fase de crecimiento radial previo pero el tumor ya se encuentra en fase de crecimiento vertical.

Tabla I.3. Tipos de melanomas.

Melanomas no tumorales o en fase de crecimiento radial
In situ o microinvasivo
Melanoma de extensión superficial
Lentigo maligno y lentigo maligno melanoma
Melanoma lentiginoso acral
Melanoma en fase de crecimiento radial no clasificable
Melanomas tumorales o en fase de crecimiento vertical
<i>Sin crecimiento radial reconocible</i>
Melanoma nodular
<i>Con crecimiento radial reconocible</i>
Melanoma de extensión superficial
Lentigo maligno melanoma
Melanoma lentiginoso acral
Melanoma en fase de crecimiento vertical no clasificable
Melanomas desmoplásicos y neurotropos
<i>Variantes: nevoide, de células claras, amelanótico...</i>

Metástasis. El melanoma cutáneo es el tumor que metastatiza con mayor frecuencia, pudiendo hacerlo a cualquier área u órgano corporal, y lo hace bien por vía linfática (lo más frecuente) o hemática. La probabilidad de que un melanoma metastatice está íntimamente relacionado con el nivel de Clark y el espesor de Breslow (*Balch CM et al, 1979*). Así, cuando el tumor es menor de 1 mm de espesor las metástasis ganglionares son bastante infrecuentes y se aproximan al 50% cuando el tumor presenta un espesor de unos 4 mm.

Metástasis locales: se localizan en la piel, ocurren por vía linfática, y son llamadas satelitosis si se encuentran a menos de 5 cms del tumor primario. Cuando se encuentran a más de 5 cm., en dirección a las cadenas ganglionares regionales, pero sin sobrepasarlas, se denominan metástasis en tránsito.

Metástasis regionales: consisten en la invasión del grupo ganglionar de drenaje del tumor primario, por las células tumorales.

Metástasis a distancia: pueden aparecer en cualquier órgano pero las localizaciones más habituales son la piel y tejido subcutáneo, los ganglios linfáticos y el pulmón. El cerebro y las meninges, el tracto gastrointestinal, el corazón, el hígado y las glándulas suprarrenales también pueden afectarse con cierta frecuencia (*Amer MH et al, 1978; Caputy G et al, 1991*).

La melanososis es una complicación infrecuente que presentan algunos pacientes con melanoma diseminado. Consiste en que toda la piel del paciente adquiere una coloración gris azulada debido al

depósito de pigmento melánico a nivel de los macrófagos y de las células endoteliales de la dermis (Steiner A, 1991).

El periodo de tiempo entre el diagnóstico de la enfermedad primaria y la primera metástasis se ha demostrado que difiere significativamente para los diferentes tipos de metástasis. En un esquema de Leiter et al (2004) se resumen los diferentes porcentajes de las metástasis y la media de los meses que tardaron en aparecer (Figura I.14).

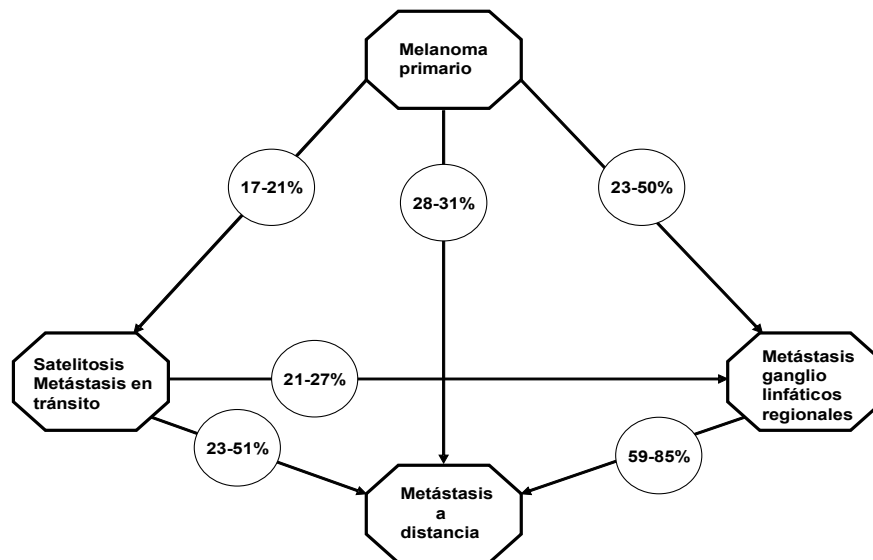


Figura I.14. Frecuencias de los diferentes tipos de metástasis

4. FACTORES PRONÓSTICOS

4.1. Relativos al tumor

4.1.1. **Localización:** la localización del tumor primario es un parámetro muy importante, especialmente en tumores de igual espesor. Day y colaboradores describieron, en 1982, unas localizaciones de alto riesgo

que denominaron "zonas BANS" para melanomas de igual espesor (B=back (espalda); A=arm (brazo); N=neck (cuello); S=scalp (cuero cabelludo)), que se asociaban a peor pronóstico (Day CL y Lew RA, 1982). Los autores sugieren varias explicaciones posibles:

- son zonas que drenan a más de un territorio linfático.
- son zonas de diagnóstico más tardío.
- son zonas más vascularizadas, favoreciéndose la diseminación metastásica.

Otros estudios no han podido confirmar una diferencia dependiente de la localización. Por otro lado, Wong encuentra que la localización anatómica de la lesión es significativa para los melanomas de espesor intermedio (0,76-1,69) y en melanomas en estadio II (Wong JH et al, 1991).

4.1.2. Factores histológicos

A. Tipo histológico: aunque clásicamente se le atribuían peor pronóstico a los melanomas de tipo nodular y lentiginoso acral frente al melanoma de extensión superficial y el lentigo maligno melanoma (Clark WH et al, 1969), hoy se está de acuerdo en que no existen diferencias en la supervivencia entre el melanoma de extensión superficial, el lentiginoso acral y el nodular cuando se tiene en cuenta el espesor (Mc Govern VJ et al, 1979; Sondergaard K, 1983; Elder DE et al, 1997).

B. Nivel de invasión de Clark: en 1969 Clark et al dividieron los melanomas en cinco grupos dependiendo del nivel de invasión (Clark WH et al, 1969).

I. Limitado a la epidermis (melanoma *in situ*).

II. Invasión de la dermis papilar por elementos aislados o por pequeños grupos de células tumorales.

III. Invasión de toda la dermis papilar alcanzando la unión entre dermis papilar y reticular.

IV. Invasión de la dermis reticular.

V. Invasión de la grasa subcutánea.

Elder et al, en 1997, establecieron la relación entre el nivel de Clark y la supervivencia media a los cinco años (Figura I.13.)

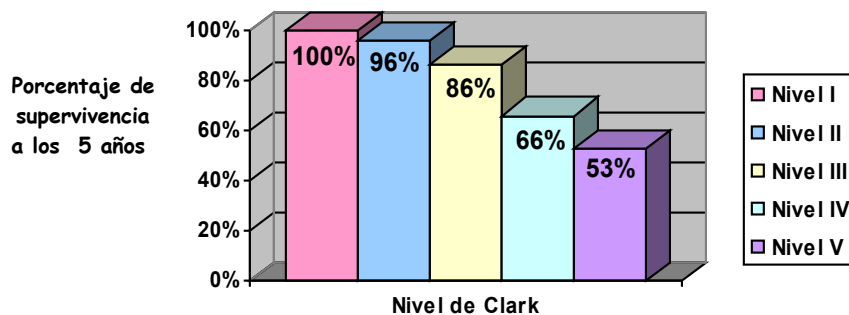


Figura I.13. Supervivencia a los cinco años según el nivel de Clark

Actualmente, la mayoría de los autores están de acuerdo en que el significado pronóstico del nivel del Clark deriva de su correlación secundaria con el espesor tumoral (Maite JC, 1983), aunque puede servir como predictor de la evolución en melanomas delgados (Blois MS, 1983; Vilmer C et al, 1996).

C. Espesor tumoral máximo (Índice de Breslow): Breslow en 1970 afirmó que "el máximo grosor tumoral de la lesión primaria,

medido desde la capa granulosa hasta la última célula tumoral, es el factor pronóstico más exacto para predecir la aparición de metástasis". (Breslow A, 1970). Hoy se sabe que el espesor tumoral máximo es el predictor más importante, por sí solo, de la supervivencia en melanomas en estadio clínico I. (Van der Esch EP et al, 1981; Smolle J, 1995). Además, se correlaciona de forma directa con la probabilidad de afectación linfática regional y las metástasis a distancia (Tabla I.4.).

Tabla I.4. Relación entre el índice de Breslow, afectación regional (N1), metástasis a distancia (M1) y supervivencia global.

INDICE BRESLOW	% N1 A LOS 3 AÑOS	%M1 A LOS 5 AÑOS	SUPERVIVENCIA (MESES)
< 0,76 mm	2%	3%	98
0,76 - 1,50 mm	25%	8%	85
1,51 - 4 mm	57%	15%	64
> 4 mm	62%	72%	41

*Tomada de Guillem y Burriel, 1997

Clásicamente, según el espesor tumoral, se han clasificado a los melanomas como, de bajo riesgo, cuando el índice de Breslow era inferior a 0,76 mm; de riesgo moderado, cuando era entre 0,76-1,50 mm; de riesgo moderado-alto, cuando era entre 1,51-4 mm; y de alto riesgo sí era mayor a 4 mm. (Garbe C et al, 1995). Los melanomas de bajo riesgo no presentan recidivas locales ni metástasis y curan con la exéresis simple. En algunas series su supervivencia a los 5 años es del 100%, aunque algunos estudios han recogido un pequeño número de muertes, especialmente en tumores con Clark mayor de 2 o con signos de regresión (Lemish WH et al, 1983; Woods JE et al, 1983).

D. Ulceración: la presencia de ulceración es un factor de mal pronóstico, particularmente cuando el espesor tumoral es mayor de 3 mm (*Mc Mover VF et al, 1983*). En este sentido y para algunos autores, la supervivencia a los cinco años desciende desde el 80% al 55% en melanomas ulcerados (*Balch CM et al, 1980*). No obstante, la ulceración aparece en tumores con elevado índice de Breslow, ya que estos se ulceran con más facilidad que los melanomas delgados (*Day CL Jr et al, 1982*) y, además, a todo esto se suma la dificultad que añade la ulceración a la hora de valorar el índice de Breslow (desde la base de la úlcera hasta la célula tumoral más profunda), proporcionando valores de Breslow, en muchos casos, inferiores a los reales, que podrían explicar en parte la peor evolución de estos melanomas.

E. Índice mitótico: el número de mitosis por mm² parece tener relación con el pronóstico. Para algunos autores cuando el número de mitosis es menor de 6/mm² la supervivencia aumenta hasta un 80%, y cuando es mayor de 6/mm² disminuye al 40% (*Day CL Jr, 1982*). Schmoeckel en 1978 definió el "índice pronóstico" como el número de mitosis/mm² multiplicado por el máximo espesor en mm.

$$\text{Índice pronóstico} = n^{\circ} \text{mitosis/mm}^2 * \text{máximo espesor (mm)}$$

Para este autor, este índice pronóstico es más exacto que el espesor tumoral o el nivel de invasión para predecir, por sí solos, la supervivencia (Tabla I.5) (*Schmoeckel CH y Braun-Falco O, 1978*).

Tabla I.5. Relación entre el índice pronóstico y la presencia de metástasis (Tomada de Schmoeckel, 1978).

Categoría de riesgo	Índice pronóstico	Metástasis (5años)
Bajo	1-6	10%
Intermedio	6-13	40%
Alto	Mayor de 13	80%

F. Regresión: los cambios regresivos consisten en la sustitución de células tumorales por fibrosis, melanófagos e infiltrado inflamatorio linfocitario, junto con cuerpos acidófilos (restos de células melánicas). (*Menzies SW y Mc Carthy WH, 1997*). Se producen como consecuencia de la interacción entre el huésped y el tumor (*Kang S et al, 1993*). La existencia de estos cambios no ha demostrado tener un significado pronóstico independiente, excepto en melanomas delgados (*Tran H et al, 1996*) (*Weedon D, 2002*).

La explicación del peor pronóstico de estas lesiones podría estar en relación con el insuficiente espesor que se les atribuye en el momento del diagnóstico.

G. Infiltrado inflamatorio dérmico: para Clark et al (1989) la existencia de un infiltrado inflamatorio linfoide de características infiltrantes (entre células tumorales) es un factor pronóstico independiente, asociándose a mejor pronóstico (*Clark WR Jr et al, 1989*). Sin embargo, la presencia de agregados de células plasmáticas es, para algunos autores, un signo indicador de metástasis ganglionares ocultas. (*Weissman A et al, 1984*).

H. Microsatelitos: los microsatélites se definen como nidos tumorales de 0,05 mm de diámetro mínimo, separados de la masa tumoral principal por tejido colágeno dérmico reticular o grasa subcutánea (Day CL et al, 1981). La presencia de estos satélites microscópicos se relacionan con una mayor incidencia de afectación ganglionar (53% frente a 12%) y con una menor tasa de supervivencia a los 5 años (36% frente al 89%) (Rigel DS et al 1991).

I. Invasión vascular: al igual que en la mayoría de los tumores, la invasión vascular o linfática se asocia a un pronóstico desfavorable. En el caso del melanoma no se ha podido demostrar la validez de este dato como factor pronóstico independiente, ya que parece depender del espesor tumoral y del diámetro de la lesión (Straume O, Akslen LA 1996). En cualquier caso, la invasión vascular es más frecuente en los melanomas en fase de crecimiento vertical que en los melanomas en fase de crecimiento radial.

J. Tipo celular: aunque en el melanoma de globo ocular parece estar claro que el tipo celular es un factor pronóstico independiente, en el melanoma cutáneo no ha podido establecerse esta relación a pesar de los múltiples estudios realizados por diversos autores. (Day CL JR et al, 1982; Baak JP y Tan CJ, 1986; Drzewiecki KT et al, 1980). Para Day el tipo celular epitelioides se asocia con un mejor pronóstico, pero estos resultados no han podido ser contrastados con posterioridad.

K. Nevus preexistente: en aproximadamente un 20% de los casos el melanoma se desarrolla sobre un nevus preexistente (Friedman RJ et al, 1983). Para muchos autores, entre ellos Friedman, los melanomas desarrollados sobre nevus tienen mejor pronóstico y, además, esta variable se comporta como un factor independiente (Stolz W et al, 1989). No obstante, el significado pronóstico del nevus coexistente es aún controvertido (Schmoeckel C et al, 1983; Weedon D, 1985).

L. Pigmentación: aunque para algunos autores la falta de pigmentación es un signo de desdiferenciación, lo que conllevaría un peor pronóstico, no ha demostrado tener valor pronóstico independiente (Mc Govern VJ, 1970; Lever WF y Schaumburg-Lever G, 1990).

M. Volumen de la lesión: el volumen tumoral es un valor tridimensional que tiene en cuenta el espesor tumoral y el diámetro de la lesión y es superior al valor de Breslow como indicador pronóstico (Friedman Rj et al, 1991; Rigel Ds et al, 1991; Ordóñez A et al, 1994). Friedman et al realizaron un estudio del volumen tumoral en melanomas con los siguientes resultados (Tabla I.6):

Tabla I.6. Relación entre el volumen tumoral y la supervivencia a los 5 años

VOLUMEN TUMORAL	SUPERVIVENCIA A LOS 5 AÑOS
Menor o igual a 200 mm ³	89-91,4%
Mayor a 200 mm ³	11-16,7%

*Tomada de Friedman et al, 1991.

Para calcular el volumen tumoral se requieren cortes seriados del tumor y la reconstrucción mediante un sistema informático, por lo que,

aunque es un valor pronóstico importante, no se realiza de manera rutinaria.

N. Parámetros de proliferación celular.

Recuento de mitosis. La mitosis es un fenómeno que ocurre en un momento muy concreto del ciclo celular. El recuento de las figuras mitóticas representa la forma más tradicional y antigua de estimar la proliferación de una población celular, especialmente en los tumores. Sin embargo, esta estimación es bastante inespecífica. Las oscilaciones en la duración del ciclo celular, hecho que ocurre en algunos tumores, inciden en la cuantificación de figuras mitóticas, sin que ello vaya necesariamente parejo con alteraciones en la tasa de crecimiento. A pesar de ello, constituye un método aceptable para la valoración de la proliferación celular en la mayoría de los tumores. Azzola et al (2003) proponen la *Tasa de mitosis* de un tumor como un importante e independiente predictor de la supervivencia de los pacientes con melanoma, llegando a superar a la ulceración como factor pronóstico cuando el recuento se realiza siguiendo las recomendaciones de la Clasificación del Melanoma Maligno de Sydney de 1972 (Azzola MF et al, 2003). Sondak et al, en un análisis multivariante, observaron que los únicos factores que se asocian significativamente con la presencia de ganglio linfático centinela positivo son la tasa de mitosis del tumor, el espesor tumoral de Breslow y la edad del paciente. La importancia práctica de sus resultados recae en que pacientes con espesores tumorales ≤ 1 mm de Breslow, con elevada tasa mitótica y jóvenes (menos de 35 años) deben ser incluidos para estudio de ganglio centinela (Sondak VK et al, 2004). Thompson et al (2004) corroboran el modelo de Sondak y apoyan la propuesta de realizar estudio de

ganglio linfático centinela a pacientes con espesores tumorales ≤ 1 mm, jóvenes (menores de 40 años) y con elevada tasa mitótica (mayor 5 mitosis/mm²) debido a que estos pacientes presentan un riesgo incrementado de padecer enfermedad metastásica en ganglio linfático centinela (*Thompson JF y Shaw HM, 2004*).

Ki-67/MIB-1. Ki-67 es una proteína nuclear que está presente en las células proliferantes es decir, células en mitosis o en fase G1, G2 y S, pero no en las células en fase G0 (quiescentes). Los anticuerpos MIB-1 reaccionan con este antígeno permitiendo valorar la capacidad proliferativa de los distintos tejidos (*Gerdes J, 1990*). La cuantificación de Ki-67/MIB-1 en el melanoma es reconocida como factor pronóstico en numerosos trabajos (*Soyer HP, 1991*), encontrándose, en algunas series, niveles de Ki-67 elevados ligados a mayores índices de mortalidad e incluso a mayor número de metástasis. Lo que no está del todo claro es su papel como factor pronóstico independiente ya que, mientras algunos autores apoyan esta idea, otros como Soyer lo correlacionan con el grosor tumoral, así como con otros factores pronósticos clásicos (nivel de Clark, índice mitótico) (*Gerdes J, 1990; Ramsay JA et al, 1995; Soyer HP, 1991*). Soyer (1991) establece un índice pronóstico, obtenido a partir del índice de Breslow y de la actividad proliferativa medida con Ki-67. En este estudio, a los dos años de seguimiento, sólo el 63% de los pacientes con un índice pronóstico superior a 25 (producto del índice de Breslow y de la actividad proliferativa medida con Ki-67) estaban libres de enfermedad, mientras que ninguno de los pacientes con un índice menor de 25 había desarrollado metástasis.

Valoración del contenido de ADN. Según la fase del ciclo en que nos encontremos, las células tendrán una cantidad de ADN determinada. Según avanza el ciclo, durante la fase S, esta cantidad va aumentando progresivamente, hasta llegar a G2 y a M, donde dicha cantidad es el doble de la que tenía en G1. La cantidad de ADN puede ser estudiada mediante citometría y recogida posteriormente en un histograma en el que el eje de ordenadas representa el número de células estudiadas, y en el de abscisa la cantidad de ADN. La gráfica resultante nos permite conocer la proporción de células presentes en cada una de las fases del ciclo celular. Además la interpretación adecuada de los histogramas con las técnicas citométricas permite sacar conclusiones sobre el carácter diploide o aneuploide de las muestras estudiadas (*Diaz-Cano S et al, 1990*).

El valor de la ploidía de ADN, como dato pronóstico en el melanoma maligno, es aceptado por la mayoría de los autores (*Tralongo V et al, 1998*). Sin embargo, parece que se relaciona con el grosor tumoral, de tal forma que a mayor espesor de la lesión se observa un mayor índice de aneuploidía (*Ruiter DJ, 1992*). De cualquier forma, en algunos trabajos como el de Cohen se muestra como factor pronóstico independiente (*Cohen C, 1996*).

La ploidía de ADN se considera un buen factor predictivo del desarrollo de metástasis, de tal forma que el riesgo se incrementa a medida que aumenta el índice de aneuploidía de la lesión primaria (*Reddy VB et al, 1995; Umebayashi Y y Otsuka F, 1997*). La presencia de aneuploidía y "fase S" elevada, en biopsias de la última lesión metastásica, se ha relacionado con mejores respuestas y mayores supervivencias en pacientes con melanomas diseminados tratados con

quimioterapia (*Hahka PA et al, 1997*). No obstante, Karlsson et al (1993) encuentran, en aquellos pacientes con melanomas en estadio clínico III y tumores primarios diploides, un mayor intervalo libre de enfermedad y una mayor supervivencia post-recidiva (*Karlsson M et al, 1993*).

En cuanto a la relación con los distintos tipos celulares constituyentes de melanoma, se han observado índices de ADN mayores en los melanomas constituidos por células epitelioideas que en los constituidos por células fusiformes, encontrándose valores intermedios en los tipos mixtos (*Chi Hi et al, 1993*)

Estudios recientes han comparado mediante microarrays de tejidos la ploidía de ADN (% de células diploides, % de células aneuploides entre 2c-4c, % de células tetraploides...) y han demostrado la posibilidad de evaluar la ploidía de ADN y sus parámetros relativos con microarrays de tejidos y su relevancia práctica en patología tumoral (*Korabiowska M et al, 2004*).

Umebayashi y Otsuka (1995) cuantifican el contenido de ADN nuclear, por citometría de flujo, de 47 melanomas primarios y establecen el *índice de ADN*, en el que encuentran un factor independiente en la predicción de la supervivencia de los pacientes con melanoma (*Umebayashi Y y Otsuka F, 1995*).

Valoración de regiones organizadoras nucleolares. Las llamadas regiones organizadoras del nucleolo (NORs) se corresponden con áreas donde se traducen los bucles de ADN, contenedores de los genes que codifican el ARN ribosómico (*Carbajo E y Carbajo S, 1994*). Estos "genes ribosómicos", y otras proteínas ácidas que se unen a los mismos tienen gran afinidad por la plata (argirofilia). Ello ha sido

utilizado para identificar los agNORs con técnicas argénticas convencionales, que aparecen como manchas negras localizadas en el núcleo (*Goodpasture C y Bloom SE, 1975*). Pich et al (1995) publicaron la asociación entre el recuento de agNORs y el pronóstico de determinadas neoplasias, entre ellas el melanoma maligno (supervivencia a los 5 años: 46% para casos con $\leq 4,62$ agNOR/célula; 7% para casos con $> 4,62$ agNOR/célula). Para estos autores el número de agNOR y su configuración es útil en la detección y pronóstico de algunas neoplasias (*Pich A et al, 1995*). En 1998, Barzilai y colaboradores realizan un estudio con el propósito de evaluar el rol de agNORs en la predicción del comportamiento biológico del melanoma. Estos autores observan que el número de agNOR se relaciona con el grado de malignidad en las lesiones melanocíticas (2,93 en nevus azul común; 2,89 en nevus benignos; 3,69 en nevus azul celular; 7,71 en melanoma maligno; y 8,33 en nevus azul maligno). También encuentran relación entre el recuento de agNOR y el estadio patológico del melanoma (*Barzilai A et al, 1998*).

Ñ. Factores patobiológicos:

Angiogénesis: En 1935, Hertig y colaboradores acuñaron por primera vez el término angiogénesis, para describir la formación de nuevos vasos sanguíneos en la placenta. Existe evidencia experimental suficiente que indica que el crecimiento y diseminación de una neoplasia es dependiente de la angiogénesis. Angiogénesis o neovascularización (formación de nuevos vasos a partir del propio tumor), es un término inicialmente descrito por el Dr. Judah Folkman y demostrado en modelos experimentales en ratones desnudos y posteriormente en pacientes con melanoma metastásico. Así, después

que un tumor ha alcanzado alrededor de 10^6 células, para poder sobrevivir requiere de neovascularización, y cada incremento sucesivo en el volumen del tumor es precedido por una fase de angiogénesis, (fenómeno de inducción), de formación de nuevos capilares sanguíneos a partir del propio tumor, lo que incrementa las posibilidades de incorporación de células neoplásicas a la circulación. La actividad angiogénica se evalúa mediante el Índice de densidad microvascular (DMV), que equivale al número de vasos neoformados, cuantificados mediante microscopia de luz en un campo de 200x (10x ocular y 20x objetivo). La cifra mayor de vasos en este campo, idealmente determinada por dos o tres patólogos, representa el Índice de la densidad microvascular. El índice de la DMV es difícil de determinar en especímenes de tejido mediante la simple visualización con tinciones tradicionales de hematoxilina-eosina (HE), por el diminuto tamaño en estos capilares, requiriéndose de marcadores específicos como factor VIII, CD-31 y CD-34, del endotelio vascular, que permitan identificar la actividad angiogénica.

Factores reguladores de la angiogénesis

La desviación de los tejidos hacia un fenotipo angiogénico, incluye cambios en el equilibrio local entre los factores reguladores positivos y negativos del crecimiento de los vasos, producidos por uno de los mecanismos siguientes:

- Sobreexpresión intracelular de uno o más reguladores positivos de la angiogénesis.
- Movilización de proteínas angiogénicas de la matriz extracelular (producidas por los macrófagos).

- Combinación de estos procesos.

Son muchas las proteínas angiogénicas conocidas en la actualidad. De éstas, las más importantes son:

Factor de transformación β (TGFB)

Es un factor angiogénico indirecto. Inhibe la proliferación de los endotelios *in vitro*, pero, *in vivo*, induce la angiogénesis a través de la estimulación de células inflamatorias que producen factores angiogénicos (Amaya H et al, 1997).

Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)

Existen varios tipos de FGF. El primero en conocerse fue el FGF- β , que se expresa en casi todos los tipos de células modulando la diferenciación, inhibiendo la apoptosis y, además, estimula la quimiotaxis y es un factor mitógeno (Campbell SC et al, 1998). Sobre las células endoteliales aumenta el índice de actividad mitótica, facilitan la proliferación de las células tumorales y endoteliales vasculares en las áreas más vascularizadas del tumor.

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)

El VEGF es una glicoproteína dimérica de 34 Kd, que actúa directa y selectivamente sobre las células endoteliales. Es considerado el factor de crecimiento angiogénico más importante. Es una citoquina que actúa sobre las células endoteliales ejerciendo sobre ellas distintas acciones. El VEGF además de ser un factor angiogénico, aumenta también la permeabilidad vascular. Generalmente actúa de forma coordinada con otros factores como el PD-ECGF. En los tejidos

neoplásicos su síntesis es promovida por las propias células tumorales (Obermair A et al, 1998; Johson DA, 1998).

Factor de crecimiento de las células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF)

Se trata de la enzima timidina fosforilasa que al metabolizar a la timidina produce metabolitos con acción quimiotáctica sobre las células endoteliales. Se sobreexpresa en tumores vasculares que manifiestan poco el VEGF; generalmente actúa en coordinación con este último para estimular la angiogénesis (Amaya H et al, 1997).

Los factores reguladores negativos de la angiogénesis pueden actuar desde la circulación o desde la matriz extracelular, y lo hacen por 2 mecanismos diferentes, la inhibición de la proliferación celular o la inhibición de la quimiotaxis.

Los principales reguladores negativos de la proliferación celular y de la quimiotaxis son:

- Factor plaquetario: inhibe la proliferación y la quimiotaxis desde la circulación.
- Trombospondina-1: inhibe la proliferación y la quimiotaxis tanto desde la circulación como a nivel de la matriz extracelular.
- Inhibidores de las metaloproteinasas: inhiben la proliferación y la quimiotaxis desde la circulación.
- Prolactina

- Angiostatina: inhibe la proliferación y la quimiotaxis desde la circulación.

- Interferón α : inhibe la proliferación y la quimiotaxis desde la circulación.

La actividad angiogénica de cada tumor dependerá del balance entre las señales estimuladoras e inhibitoras.

La angiogénesis no es solo necesaria para la nutrición tumoral sino que también es fundamental para la diseminación metastásica. En la producción de las metástasis es necesario que el tumor esté vascularizado para que las células neoplásicas tengan una vía por donde puedan ser vehiculizadas.

Además, cuando estas células llegan al lugar diana también necesitan de la angiogénesis para su nutrición en su nueva ubicación.

Morfometría nuclear. Baak y Tan ya en 1986 observaron una peor evolución en los melanomas cuyas células presentaban núcleos redondos, y un curso clínico favorable en las lesiones con núcleos elípticos u ovals. (*Baak JP y Tan CJ, 1986*). Diversos estudios posteriores han confirmado esta observación y han demostrado la relación entre los caracteres morfométricos (forma del núcleo, longitud de los ejes nucleares mayor y menor, área nuclear...) y el pronóstico de los pacientes (*Talve LA et al, 1997; Burnier Pereira F et al, 2001*).

Otros factores pronósticos patobiológicos. Durante los últimos años se están identificando toda una serie de moléculas que actúan, a

distintos niveles, en los mecanismos que controlan el crecimiento y la división celular. Diversas alteraciones a nivel de estas moléculas se han implicado en la etiopatogenia de los tumores malignos, entre ellos del melanoma, cobrando algunas una gran importancia como factores pronósticos de la enfermedad.

El **factor transformador del crecimiento beta** (TGF- β) se encuentra presente en la mayoría de las células epiteliales, endoteliales y hematopoyéticas normales, actúa como un potente inhibidor de la proliferación celular y regula los procesos celulares a través de su unión a tres receptores (tipo I, II, III). Moretti y colaboradores encuentran una mayor expresión de TGF- β y de sus receptores, en melanomas mayores de 1 mm y en los metastásicos, correlacionándose con otros marcadores de proliferación celular como el Ki-67 (*Moretti S et al, 1997*). Del mismo modo, los melanomas con presencia de receptores de membrana CD40 y de su ligando correspondiente CD40L (en posiciones cercanas) conllevan un peor pronóstico, con un corto intervalo libre de enfermedad (*Van den Oord JJ et al, 1996*).

La **pérdida de moléculas esenciales para mantener la integridad tisular** (cadherinas), la expresión de otras moléculas relacionadas con la adhesión celular (receptores para el ácido hialurónico, codificados por el gen CD-44) y las integrinas (en especial la avb3 o receptor de la vitronectina y la ICAM-1), se asocian a una mayor agresividad biológica (*Hsu MY et al, 1996; Sandig M et al, 1997*). En un estudio reciente se han combinado el uso de la proteína S100A4 y la cadherina-E demostrando que existe una relación inversa entre ambas. En lesiones primarias y con intervalo libre de enfermedad largo se expresaba cadherina-E y no lo hacía S100A4, mientras que en

lesiones avanzadas y con intervalo libre de enfermedad corta disminuía su expresión y aumentaba la de S100A4 (*Andersen K et al, 2004*).

La **expresión de proteasas** que destruyen la matriz extracelular: catepsinas B, D y enzimas con actividad similar a la catepsina B, o niveles bajos de sus enzimas inhibidoras como la CPI (inhibidoras de la cisteinil-proteasas), han sido relacionados con un peor pronóstico, al igual que en algunos carcinomas como el de mama (*Podhajcer OL et al, 1995*).

A nivel cromosómico, la **pérdida de genes supresores** y sus productos, entre los que se encuentran la proteína p27Kip1, p21WAF1/CIP1 y p16INK4A se han asociado a una peor evolución de la enfermedad (*Böni R et al, 1998; Ghiorzo P et al, 2004*). Igual ocurre con la alteración de las secuencias génicas localizadas en los cromosomas 1p, 6, 9p, (que afectan al gen supresor múltiple de tumores MTS1 o CDKN2 (p16INK4)), 10q y 11q (*Goldstein AM y Toker MA, 1995; Healy E et al, 1998; Poetschhaus M et al, 1998*).

El **gen NM23**, localizado en la posición 17q22, ha sido identificado como un gen supresor de metástasis, siendo sus niveles más bajos en aquellos melanomas con mayor capacidad infiltrante y metastásica. Ya en 1992 Florenes y colaboradores encontraron que pacientes que desarrollaron metástasis durante los dos primeros años tras el diagnóstico tenían niveles de expresión de nm23 significativamente más bajos (56%) comparados con pacientes con enfermedad menos agresiva (16,4%) ($P \leq 0,0004$) (*Florenes VA et al, 1992; Caligo MA et al, 1994; Easty DJ et al, 1996; Saitoh K et al, 1996*). Sarris y colaboradores publican recientemente un artículo en el que relacionan los niveles bajos de expresión de nm23 y el aumento del

riesgo de padecer metástasis cerebrales de melanoma (*Sarris M et al, 2004*).

TP53 es un gen supresor con una doble acción; por un lado detecta las alteraciones del ADN y detiene el ciclo celular en la fase G1 facilitando así su reparación. Cuando estas alteraciones no son reparables TP53 induce a la célula a la apoptosis. La mutación de TP53 es la alteración genética más frecuente en las neoplasias humanas. La expresión de TP53 en el melanoma maligno es recogida en diversos estudios y varía entre 1-5% para lesiones primarias y entre 11-25% para lesiones metastásicas (*Hussein MR et al, 2003*). Mientras que algunos autores han encontrado una expresión baja de p53 (*Saenz MC et al, 1995*), para otros, hasta un 63% de las lesiones estudiadas mostraron positividad para la TP53 (*McGregor JM et al, 1993*), relacionándose con un peor pronóstico y con una mayor probabilidad de desarrollar enfermedad metastásica (*Vogt T et al, 1997*). La mutación del TP53 parece tratarse de un acontecimiento tardío en la etiopatogenia del melanoma (*Lee Cs et al, 1995*). No obstante, en las series de Essner et al (1998), los pacientes con melanomas primarios o metastáticos positivos para TP53 presentaron una supervivencia mayor que los negativos (*Essner R et al, 1998*).

Melastatina es un gen supresor tumoral, que se observa en las células de los nevus pigmentocelulares, decreciendo su expresión con el incremento del grosor tumoral en los melanomas y no detectándose, prácticamente, en las lesiones metastásicas. Por ello, se la ha considerado un indicador de agresividad (*Duncan LM et al, 1998*).

4.1.3. Estadio clínico-patológico: al igual que en la gran mayoría de los tumores sólidos, en el melanoma, el factor pronóstico más

importante es el estadio clínico-patológico. Allen y Spitz, en 1953, fueron los primeros en publicar que los melanomas profundos tenían peor pronóstico que los melanomas superficiales, aunque ellos no propusieron ningún sistema de estadificación en base a esta observación. Unos de los primeros intentos de clasificar la enfermedad en función de la severidad de la misma fue planteada por Ackerman y del Regato en 1954 (*Thompson JF et al, 2004*). Ellos proponían cuatro grupos:

(a). Pacientes con metástasis a distancia.

(b). Pacientes con metástasis en ganglios linfáticos regionales, detectadas clínicamente y confirmadas histológicamente.

(c). Pacientes con ganglio linfático clínicamente negativo pero positivo histológicamente.

(d). Pacientes con enfermedad primaria, sólo, demostrada por la ausencia clínica e histológica de enfermedad en ganglios linfáticos u otras localizaciones a distancia.

En 1962 Petersen y colaboradores sugirieron una clasificación de tres estadios basada en las características de la lesión primaria:

- **Estadio I:** melanoma que no invade la dermis.

- **Estadio II:** invasión de la dermis superficial.

- **Estadio III:** formación tumoral con o sin "erupción pigmentada".

En 1964, Mc Near y Das Gupta establecieron un sistema de estadificación triple que tuvo gran aceptación y fue ampliamente utilizado. Este sistema se basaba en criterios clínicos:

+ **Estadio I:** melanoma localizado sin metástasis a distancia ni afectación de ganglios linfáticos regionales.

Melanoma primario no tratado o extirpado por biopsia incisional antes de un mes

Melanoma localmente metastático o recidivante

Melanoma primario múltiple.

+ **Estadio II:** Metástasis confinadas a los ganglios linfáticos regionales.

Melanoma primario con metástasis simultáneas.

Melanoma primario controlado, con metástasis posteriores.

Recidiva local con metástasis.

Primario desconocido con metástasis.

+ **Estadio III:** melanoma diseminado.

Órganos y/o múltiples metástasis linfáticas y/o múltiples metástasis cutáneas o subcutáneas.

Esta clasificación fue la precursora del sistema de estadificación moderno TNM (tumor-node-metastasis).

En 1969 Clark y colaboradores identificaron las cinco categorías pronósticas hoy conocidas como *niveles de invasión Clark* (Clark WH et al, 1969). En 1970 Breslow demostró la importancia pronóstica del espesor tumoral (Breslow A, 1970).

En 1978 la AJCC junto con la UICC incorporaron al sistema de estadificación un microestadiaje del melanoma primario utilizando el nivel de invasión de Clark y el espesor tumoral de Breslow, pero este no fue bien aceptado y en 1983 el subcomité de melanoma de la AJCC recomendó una modificación de la versión de 1978, estableciéndose los siguientes estadios (Thompson JF et al, 2004):

Estadio IA: melanoma localizado de espesor ≤ 0.75 mm o nivel II de Clark.

Estadio IB: melanoma localizado de espesor 0.76-1.50 mm o nivel III de Clark.

Estadio IIA: melanoma localizado de espesor 1.51-4.00 mm o nivel IV de Clark.

Estadio IIB: melanoma localizado de espesor >4 mm o nivel V de Clark.

Estadio III: metástasis limitadas a ganglios linfáticos afectando sólo a una base linfática regional o <5 metástasis en tránsito pero sin afectación linfática.

Estadio IV: metástasis regionales avanzadas o metástasis a distancia.

Los factores que más van a condicionar el pronóstico de los pacientes con melanoma maligno son la presencia de afectación ganglionar y de enfermedad metastásica a distancia. Sin embargo, un estadiaje que se acerque lo más posible a la realidad pronóstica de estas neoplasias debe recoger tanto datos clínicos como histológicos. Dado que la gran mayoría de las lesiones diagnosticadas se encuentran en estadio localizado, sin afectación ganglionar ni metástasis a distancia, (más del 85% de los pacientes diagnosticados de melanoma en Europa Central, Norte América y Australia) (*Garbe C y Orfanos CE, 1992; Ketcham AS et al, 1992*), cobran especial relevancia aquellos parámetros que van a intentar predecir que pasará con este grupo de pacientes. De esta necesidad surge la clasificación TNM que recoge todos los aspectos antes citados, haciendo referencia al tumor primario (T), afectación de

ganglios linfáticos (N) y metástasis a distancia (M) (Ordóñez A et al, 1998). Esta clasificación ha ido sufriendo modificaciones, la última en el año 2002.

Tumor primario (T)

TX El tumor primario no puede ser valorado.

T0 No evidencia del tumor primario.

Tis Melanoma *in situ* (nivel I de Clark).

T1 Melanoma ≤ 1.0 mm de grosor, con o sin ulceración.

T1a Melanoma ≤ 1.0 mm y nivel II o III de Clark, no ulceración.

T1b Melanoma ≤ 1.0 mm de grosor y nivel IV o V de Clark o con ulceración.

T2 Melanoma 1.01-2.0 mm de grosor, con o sin ulceración.

T2a Melanoma 1.01-2.0 mm de grosor, sin ulceración.

T2b Melanoma 1.01-2.0 mm de grosor, con ulceración.

T3 Melanoma 2.01-4.0 mm de grosor, con o sin ulceración.

T3a Melanoma 2.01-4.0 mm de grosor, sin ulceración.

T3b Melanoma 2.01-4.0 mm de grosor, con ulceración.

T4 Melanoma mayor de 4.0 mm de grosor, con o sin ulceración.

T4a Melanoma mayor de 4.0 mm de grosor, sin ulceración.

T4b Melanoma mayor de 4.0 mm de grosor, con ulceración.

Ganglios linfáticos regionales (N)

NX gánglios linfáticos regionales no pueden ser valorados.

N0 No metástasis en ganglios linfáticos regionales.

N0 (i+) ganglio negativo con H-E en el que se han detectado células tumorales aisladas (grupo celular de tamaño inferior a 0.2 mm, en su diámetro mayor) con inmunohistoquímica.

N1 Metástasis en 1 ganglio linfático.

N1a metástasis clínicamente oculta (micrometástasis)

N1b metástasis clínicamente detectable (macrometástasis)

N2 Metástasis en 2 o 3 ganglios regionales o metástasis intra linfática regional sin afectación ganglionar.

N2a metástasis clínicamente oculta (micrometástasis).

N2b metástasis clínicamente detectable (macro metástasis)

N2c satelitosis o metástasis en tránsito sin afectación ganglionar.

N3 Metástasis en 4 o mas ganglios linfáticos regionales, o ganglios metastáticos fusionados, o metástasis en tránsito o satelitosis con metástasis en ganglios linfáticos regionales.

Metástasis a distancia (M)

MX Presencia de metástasis a distancia no puede ser valorada.

M0 No metástasis a distancia.

M1 Metástasis a distancia.

M1a Metástasis en piel, tejido subcutáneo, o ganglios linfáticos a distancia.

M1b Metástasis pulmonares.

M1c Metástasis en cualquier otro órgano o metástasis a distancia a cualquier otro sitio asociadas niveles elevados de LDH en suero.

Grupos patológicos de estadificación.

Estadio 0	Tis N0 M0
Estadio IA	T1a N0 M0
Estadio IB	T1b N0 M0/T2a N0 M0
Estadio IIA	T2b N0 M0/T3a N0 M0
Estadio IIB	T3b N0 M0/T4a N0 M0
Estadio IIC	T4b N0 M0
Estadio IIIA	T1-4a N1a M0/T1-4a N2a M0
Estadio IIIB	T1-4b N1a M0/T1-4b N2a M0/T1-4a N1b M0/T1-4a N2b M0/ T1-4a/b N2c M0
Estadio IIIC	T1-4b N1b M0/T1-4b N2b M0/Cualquier T N3 M0
Estadio IV	Cualquier T Cualquier N M1

Tabla I.7. Grupos patológicos de estadiaje

4.2. Factores relativos al huésped.

4.2.1. Sexo. La importancia del sexo como valor pronóstico ha sido discutida. En general se acepta que la supervivencia global en el sexo femenino es mejor, sobre todo en los dos primeros años tras el diagnóstico (*Magnus K, 1977*), quizás porque en la mujer predomina la localización en las extremidades inferiores y ello permite el diagnóstico más precoz (*Shaw HN 1980*). Sin embargo, diversos estudios sugieren que las mujeres tienen mejor pronóstico a largo plazo. El pronóstico se iguala en ambos sexos cuando la enfermedad está diseminada (*Karjalainen S y Hakulinen T 1988; O`Doherty CJ et al, 1986*).

4.2.2. Edad. La edad se ha relacionado con un pronóstico desfavorable, aunque según algunos autores, estas diferencias se deben a que los melanomas en pacientes de mayor edad suelen presentar mayores grosores tumorales (*Levine J et al, 1981*).

4.2.3. Factores hormonales. Rampen y Mulder (1980) consideraron que el melanoma era un tumor estrógeno dependiente, ya que se exacerbaba en el embarazo y con los anticonceptivos orales y tenía mejor pronóstico en el sexo femenino (*Rampen FH y Mulder JH 1980*). Sin embargo, los esfuerzos realizados por este autor para controlar la enfermedad con antiestrógenos resultaron infructuosos. MacKie, estudia la relación del embarazo con el pronóstico del melanoma en una serie de 338 mujeres con melanoma en estadio I, durante los años fértiles, y encontró que las mujeres diagnosticadas de melanoma durante el embarazo, tenían tumores más gruesos que el resto. No apreció relación entre el embarazo y la supervivencia (*MacKie RM et al, 1991; Adami HO et al, 1991*). Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que el pronóstico de una mujer con melanoma durante el embarazo, y su supervivencia, tan sólo dependen del espesor tumoral y de la presencia de ulceración. Daryanani y colaboradores realizaron un estudio en el que comparaban la supervivencia a los diez años y el periodo libre de enfermedad entre mujeres embarazadas y mujeres no embarazadas con melanomas en estadio I-II y no encontraron un peor pronóstico en las mujeres embarazadas con melanoma con respecto a las que no lo estaban, ni variaciones en la supervivencia (*Daryanani D et al, 2003*). Los estudios sobre la influencia de estrógeno y progesterona en melanomas son contradictorios. En algunas series, se ha puesto de manifiesto que, en melanomas con receptores de estrógeno positivos el

intervalo libre de enfermedad es más largo (*Water MJ et al, 1991*); en otras, no se ha encontrado influencia de los estrógenos sobre el melanoma (*Kart VL et al, 2002*).

4.2.4. Factores inmunológicos. La historia natural del melanoma, sugiere una intervención inmunitaria por parte del huésped, que puede modificar significativamente la evolución del tumor primario y de las metástasis. Se ha descrito una incidencia cuatro veces mayor de melanomas en pacientes inmunodeprimidos (*Rigel DS et al, 1991*). En pacientes infectados por el VIH se ha observado, gracias a los nuevos tratamientos que prolongan la supervivencia y disminuyen el número de infecciones oportunistas, un aumento significativo del número de neoplasias entre ellos de melanomas cutáneos (*Cooley TP, 2003*). Además, el fallo de la inmunidad de estos pacientes, provoca que el curso clínico de los pacientes con melanomas VIH positivos sea más agresivo (*Rodrigues LK et al, 2002*).

Entre los factores más estudiados cabe destacar el antígeno mayor de histocompatibilidad (HLA). Barger et al (1982) realizaron un estudio con pacientes afectados de melanoma en Alabama y lo compararon con un grupo control. Agruparon a los pacientes en dos categorías, de alto y de bajo riesgo, según la probabilidad de aparición de metástasis. El descenso del HLA-DR3 en el grupo de alto riesgo les sugirió que se tratase de un marcador de larga supervivencia, mientras que el aumento del HLA-DR4 en los pacientes con melanoma frente al grupo control les sugirió que podría ser un factor de riesgo de desarrollar metástasis (*Barrer BO et al, 1982*). En 1991 Rigel et al asociaron la mayor expresión de HLA-DR con tumores de mayor espesor y mayor invasión (*Rigel DS et al, 1991*). En el mismo año Rivers

y colaboradores sugirieron que un aumento de la expresión de HLA-DR y un descenso de la expresión de HLA-A, B y C tiene una influencia desfavorable sobre la supervivencia (*Rivers JK et al, 1991*). En 1992, Colloby et al, niegan la relación entre el HLA-DR y tumores de mayor espesor y, contrariamente a lo publicado hasta el momento, relacionan la expresión del HLA-DR con una reducción en la aparición de metástasis tempranas, especialmente en varones (*Colloby PS et al, 1992*).

Actualmente sabemos que las células tumorales inducen una respuesta por parte del sistema inmunológico. Los linfocitos T CD4 positivos que infiltran el tumor, en la mayor parte de los casos de melanoma estudiados, expresan antígenos HLA clase II- restrictivos antimelanoma. Estos linfocitos T CD4 positivos están siendo utilizados para estudiar posibles vacunas terapéuticas en la nueva inmunoterapia contra el melanoma (*Robbins PF et al, 2002*).

5. GANGLIO LINFÁTICO CENTINELA.

5.1. Sistema linfático.

El sistema vascular linfático es un "sistema de drenaje" cuyos vasos más pequeños, los capilares linfáticos, terminan en extremos ciegos y conducen un líquido llamado linfa, desde los espacios extracelulares periféricos a través de vasos linfáticos cada vez mayores que convergen en grandes conductos linfáticos (conducto

torácico y gran vena linfática derecha), que vienen a desembocar a las grandes venas de la base del cuello (Figura I.14).

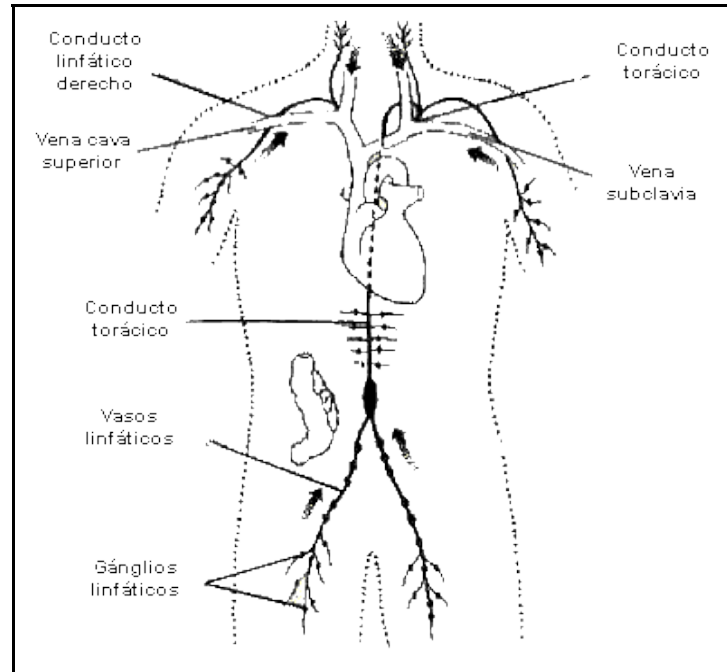


Figura I.14. Sistema linfático

La linfa es en esencia un ultrafiltrado del plasma sanguíneo que se forma por la filtración continua de los componentes líquidos de la sangre a través de las paredes de los capilares hacia los espacios intersticiales. Está compuesta de agua, electrolitos y cantidades variables de proteínas, así como restos celulares. Tiene tres funciones principales: 1.función defensiva, que corre a cargo de los linfocitos; 2.devolver a la corriente sanguínea el fluido tisular intersticial (fundamentalmente sustancias proteicas de elevado peso molecular), y que por su naturaleza es incapaz de penetrar por sí mismo en las redes de venas capilares para su ingreso en el sistema circulatorio. De esta forma, la linfa puede ser evacuada desde los tejidos y vertida en la sangre; 3.transporte de las grasas absorbidas en las vellosidades

intestinales, que de esta manera pasan a la circulación sanguínea a través del sistema linfático.

Los capilares linfáticos están revestidos por un fino endotelio y una lámina basal discontinua. En los vasos linfáticos mayores la pared es algo más gruesa y está revestida por finos haces de colágeno, fibras elásticas y escasas células musculares lisas. Presentan, además, válvulas constituidas por capas de endotelio, que aseguran el movimiento unidireccional de la linfa.

A lo largo de curso de los vasos linfáticos se sitúan los ganglios linfáticos. La linfa entra en ellos por los vasos aferentes, aquí se filtra y posteriormente sale por el vaso eferente, volviendo nuevamente a la circulación linfática.

El drenaje linfático de la piel. La piel es rica en estructuras linfáticas. La epidermis está desprovista de ellos, pero, en contraste, la dermis tiene abundantes vasos linfáticos. 50 μ m por debajo de la epidermis raramente se detectan vasos linfáticos. Pero entre los 50-200 μ m aparecen una gran densidad de vasos linfáticos (*Lubach D et al, 1996*). Los vasos linfáticos comienzan en la dermis papilar, formando una densa red de capilares, de terminaciones ciegas. De esta red interna hay ramas que pasan a una red más profunda, situada en el límite entre la dermis y la hipodermis. De la red profunda, parten grandes vasos linfáticos que comunican con el plexo subcutáneo y el plexo fascial profundo (*Fawcett W, 1989*).

La densidad de vasos linfáticos de la piel varía de una región a otra del cuerpo. La máxima densidad se observa en la cabeza y el cuello

mientras que la mínima ocurre en las extremidades (*Lubach D et al, 1996*).

Sappey en 1874 determinó el curso de los canales linfáticos hacia las distintas regiones ganglionares (Figura I.15.).

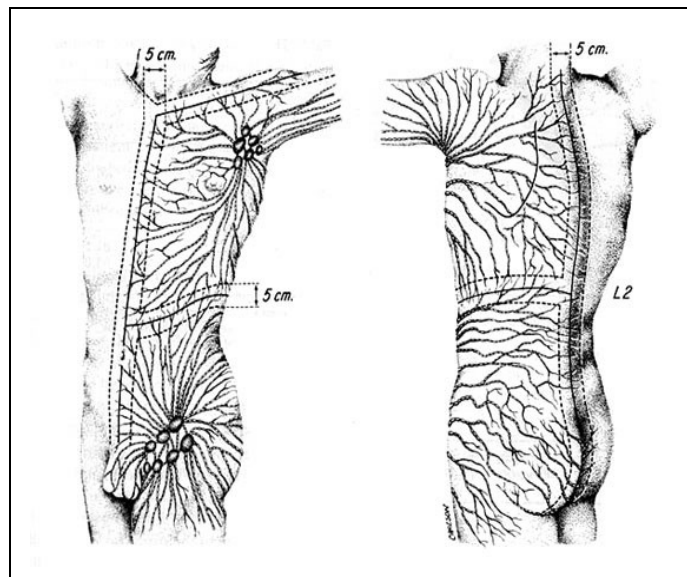


Figura I.15. Curso de los canales linfáticos

El mapeo linfático con radiocoloides ha demostrado rutas insospechadas del drenaje linfático que contradicen los dibujos anatómicos de Sappey, especialmente en cabeza, cuello y tronco (Figura I.16.) (*Mariani G et al, 2004*). La linfogammagrafía permite evaluar el drenaje linfático de estas zonas de difícil predicción.

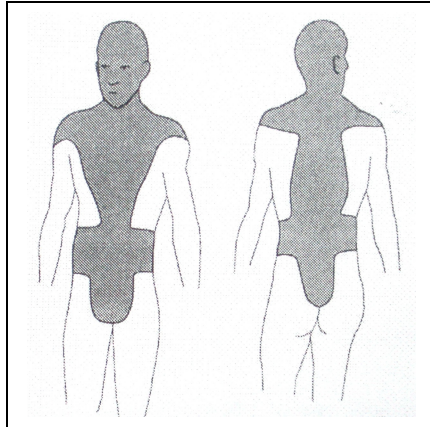


Figura I.16. Zonas de drenaje linfático impredecible

Morfología del ganglio linfático. Los ganglios linfáticos son pequeños órganos que se disponen a lo largo del trayecto de los vasos linfáticos. Su función es, además de filtrar las bacterias de la linfa, destruyéndolas, producir sustancias con capacidad inmunitaria.

Su parénquima está formado por tejido linfoide organizado que reconoce los antígenos de la linfa que se filtran por el ganglio, produciendo una reacción inmune específica contra ellos. En los ganglios linfáticos existen también abundantes macrófagos, que limpian la linfa de células indeseables, de microorganismos invasores y de otras partículas. Se sitúan en grupos de manera relativamente constante, recibiendo la linfa de regiones específicas. Suelen ser ovoides o reniformes; su diámetro oscila entre 1-25 mm y presentan una pequeña depresión por donde entran y salen los vasos, el hilio.

Los ganglios linfáticos están constituidos por una masa de tejido linfoide, atravesada por vasos linfáticos especializados o senos. Su armazón colagénico está formado por una *cápsula*, que reviste al órgano entero y que se engruesa marcadamente en el hilio. Desde la cápsula se extienden hacia el parénquima un número variable de

trabéculas ramificadas de tejido conjuntivo. El tejido linfoide situado entre las trabéculas se apoya en una red de fibras de reticulina con sus células reticulares acompañantes. Los vasos linfáticos aferentes perforan la cápsula y se abren al *seno marginal o subcapsular*, una cavidad que separa la cápsula del parénquima cortical (Figura I.17) (Fawcett W, 1989).

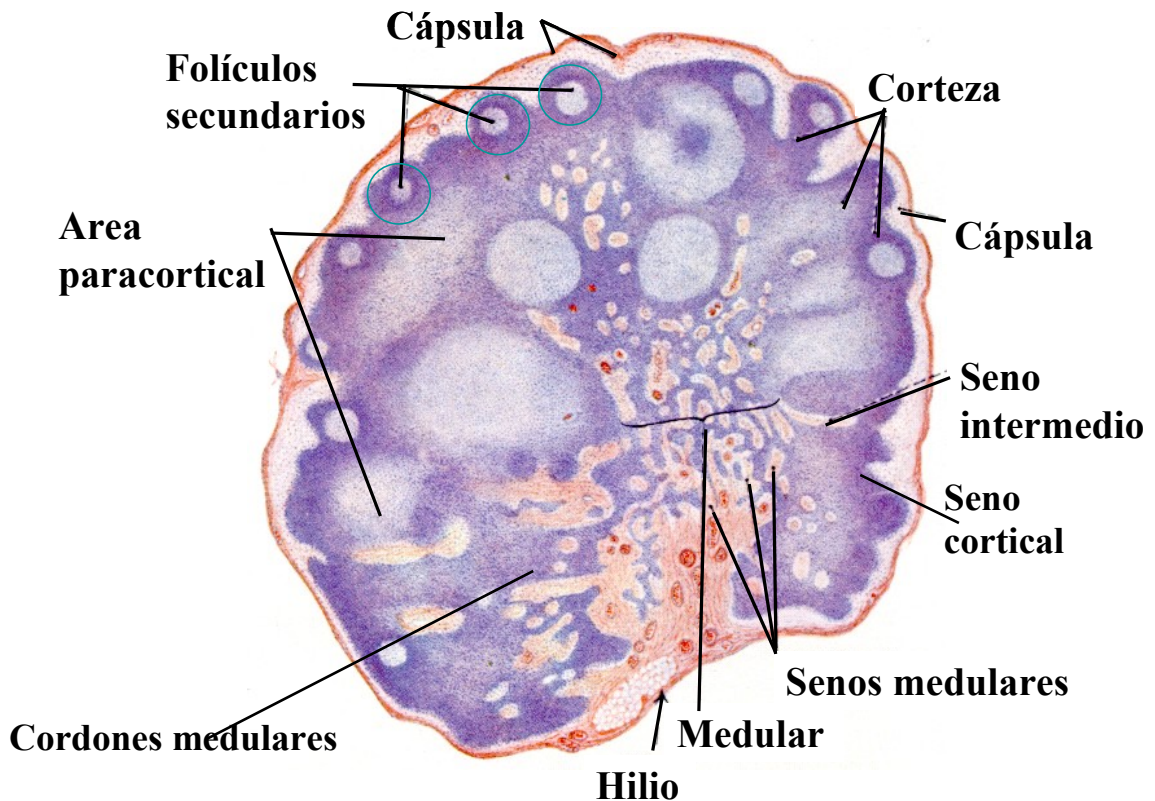


Figura I. 17. Morfología del ganglio linfático

Del seno marginal parten radialmente unos canales linfáticos llamados *senos corticales o intermedios*, que atraviesan el parénquima cortical, siguiendo a las trabéculas de colágeno. Estos continúan por la médula con el nombre de *senos medulares*, que son canales anchos, tortuosos e irregulares, que se ramifican y anastomosan de manera repetida, fragmentando el parénquima linfoide en cordones medulares. Los senos medulares se unen al seno marginal a nivel del hilio formando un plexo

de vasos tortuosos, que atraviesan la cápsula continuándose con los vasos linfáticos eferentes. El parénquima cortical está constituido por una masa densa de células linfoides. En la corteza externa en forma de nódulos linfoides, mientras que en la corteza interna o profunda como tejido linfoide difuso. Los cordones medulares están formados por agregaciones de tejido linfoide organizados en torno a vasos sanguíneos pequeños (*Fawcett W, 1989*).

5.2. Ganglio linfático centinela (GC)

El estado de los ganglios linfáticos a los cuales drena el melanoma primario es el factor pronóstico más importante en melanomas en estadios precoces. Ya en 1907 Halsted, en base a su teoría de la diseminación centrífuga del melanoma, propugna una escisión amplia del tumor primario junto a una linfadenectomía. Así mismo, Meyer y Gumpert (1953) defienden la disección ganglionar linfática pese a la no evidencia de afectación clínica (*Meyer HW y Gumpert SL, 1953*). No obstante, muchos de los pacientes con melanoma en estadios iniciales sin ganglios linfáticos palpables eran sometidos a linfadenectomías innecesarias ya que su estudio posterior revelaba la inexistencia de metástasis.

El concepto del ganglio centinela se basa en tres condiciones:

- la existencia de un patrón ordenado y predecible del flujo linfático desde el tumor primario hacia los ganglios linfáticos regionales.
- la existencia de una progresión secuencial de las células tumorales que atraviesan los ganglios linfáticos hacia el primer ganglio linfático de drenaje.
- el primer ganglio linfático filtra de forma eficaz la linfa que le llega, de tal forma que las células tumorales quedan atrapadas en él.

Efectivamente, el flujo linfático desde las neoplasias sólidas hasta el ganglio linfático eferente, parece seguir un patrón. En el caso del melanoma el orden de progresión linfática de las metástasis puede establecerse localizando individualmente la base ganglionar a la que drena el tumor. La localización y valoración histológica del primer ganglio linfático de la base ganglionar al que drena la linfa (ganglio linfático centinela), nos permitiría predecir el estado del resto de los ganglios linfáticos de la base ganglionar (*Reintgen D et al, 1994*). La evaluación del ganglio linfático centinela distingue pacientes sin metástasis linfáticas que pueden evitarse la disección de la base ganglionar, que se asocia a riesgo de padecer linfedema, de aquellos con metástasis linfáticas que se van a beneficiar de la completa linfadenectomía y terapia adyuvante (*Mariani G et al, 2004*).

Gould, en 1960, publica un artículo sobre el estudio intraoperatorio por congelación del ganglio linfático situado entre las venas faciales anterior y posterior durante una intervención de parotidectomía total, con el fin de evitar la disección cervical ganglionar. Pero fue Cabanas (1977) quien introduce el concepto de ganglio linfático centinela, en carcinoma de pene y recomienda la disección inguino-fémoro-iliaca exclusivamente en los pacientes en que tuviesen afectación del ganglio centinela. No utilizó técnicas específicas de localización intraoperatoria del ganglio centinela y se basó en su experiencia quirúrgica y en estudios linforradiológicos. (*Cabanas RM, 1977*). Morton y colaboradores (1992) fueron los primeros en realizar el estudio del ganglio centinela en pacientes con melanoma.

La técnica del ganglio linfático centinela ha confirmado ser de gran utilidad en el estudio de pacientes con melanoma sin evidencia clínica de metástasis ganglionares, mostrando una alta sensibilidad y especificidad para detectar la presencia de metástasis linfáticas (siempre que el método de localización y el de valoración histológica sea el adecuado).

Identificación del ganglio linfático centinela

Para la correcta identificación del GC se han puesto en marcha diferentes métodos de localización con la finalidad de aumentar la sensibilidad del método, sin perder especificidad, y tratando de minimizar los posibles efectos secundarios para el paciente. En 1953 Sherman utilizó Au198 en gatos para determinar la región linfática de drenaje (*Sherman AI y Ter- Pogossian M, 1953*). Pero fue Holmes et al (1977) el primero que realizó una linfogammagrafía con oro para seleccionar la cadena ganglionar para disección ganglionar electiva (*Holmes EC et al, 1977*).

Morton et al (1992) realizaron por primera vez la localización del ganglio centinela intraoperatoriamente con la ayuda de colorantes vitales y el ganglio obtenido se remitió para estudio intraoperatorio de metástasis clínicamente ocultas (*Morton DL et al, 1992*). Esta técnica fue posteriormente modificada por Alex y Krag (1993) con la introducción de isótopos radiactivos en la localización del ganglio linfático centinela (*Alex JC y Krag DN, 1993; Alex JC et al, 1993*).

Métodos de identificación: consisten en la inyección perilesional o pericicatricial (en el caso de extirpación previa de la lesión) del colorante o del trazador isotópico de tal forma que nos muestre el drenaje linfático del tumor y el primer ganglio linfático al que drena. Se dispone de dos tipos de sustancia:

Colorantes vitales: entre los que se encuentran el azul de isosulfán y el azul vital. Han de ser sustancias hidrosolubles y que presenten buena difusión por vía linfática. El azul de isosulfán es un colorante quirúrgico, y fue el que utilizaron Morton et al en 1992 para los primeros estudios de ganglio centinela de melanoma. La eficacia que se obtiene con los colorantes vitales ronda en torno al 85%, aunque Giuliano et al publican cifras que mejoran tras un largo y difícil periodo de aprendizaje (*Giuliano AE et al, 1994*).

La detección del ganglio centinela se realizará intraoperatoriamente mediante la visualización del ganglio teñido con el colorante. Uno de los inconvenientes de utilizar sólo colorantes es que debe identificarse la vía linfática aferente y llegar al ganglio linfático centinela a través de una amplia disección de los tejidos, lo cual va claramente en contra de una cirugía mínimamente invasiva. Otro inconveniente es que, a veces, requiere la administración repetida del colorante, cada veinte minutos, durante la cirugía ya que no siempre queda el colorante fijado al ganglio.

Trazadores isotópicos: Alex y Krag introdujeron en 1993 la utilización de sulfuro coloidal marcado con Tc99m inyectándolo intradérmicamente alrededor del tumor primario o de la cicatriz de la biopsia escisional, seguida de una linfogammagrafía y de la detección

intraoperatoria del ganglio centinela mediante una sonda detectora de rayos gamma. Esta técnica muestra una mayor sensibilidad en la localización del ganglio centinela que la técnica con colorante vital (*Alex JC y Krag DN, 1993; Alex JC et al, 1993*). Para la biopsia del ganglio centinela pueden utilizarse varios tipos de coloides marcados con Tc99m, cuyas diferencias de comportamiento biológico radican fundamentalmente en el tamaño de la partícula (*Keshtgar MRS y Ell JP, 1999; Wilhelm AJ et al, 1999; Valdés Olmos RA et al, 1999*). Así, se dispone de un grupo de sustancia con diámetros entre 2-20 nanómetros, que incluyen compuestos tecneciados de seroalbúmina humana, dextrano o trisulfuro de antimonio, que muestran *in vivo* gran facilidad de difusión, lo que permite la rápida visualización de los canales linfáticos y de los ganglios linfáticos de drenaje, no sólo del primario (*Bedrosian I et al, 1999; Offodile R et al, 1998; Uren RF et al, 1995*). Un segundo grupo de coloides de tamaño intermedio, entre 5-80 nanómetros, que incluye la albúmina nanocoloidal, sulfuro coloidal de tecnecio filtrado, sulfuro de renio y sulfuro de tecnecio estabilizado con gelatina, que muestran menos penetración sistémica y buena delimitación de ganglios de drenaje (*Wilhelm AJ et al, 1999; Pijpers R et al, 1997*). Un tercer grupo está constituido por partículas por encima de 100 nanómetros, como son el sulfuro coloidal de tecnecio no filtrado o la albúmina microcoloidal de tecnecio. Con estas partículas se observan menos ganglios de drenaje y por tanto es más selectivo a la hora de detectar el ganglio linfático centinela, pero existe el riesgo de que no se produzca migración del trazador y que sea fagocitado en el lugar de la inyección (*Krag D et al, 1998; Linehan DC et al, 1999; Paanelli G et al, 1998*).

Los trazadores coloideos de que disponemos actualmente no han sido diseñados para la detección del ganglio linfático centinela y, por tanto no existe ninguno perfecto.

Habitualmente el día anterior a la intervención se le realiza al paciente una linfogammagrafía para localizar la región linfática de drenaje del tumor así como la existencia de más de un ganglio centinela. Estos pueden ser señalados con tinta sobre la piel para orientar la intervención. Posteriormente y de forma intraoperatoria se localiza el ganglio o ganglios linfáticos centinelas mediante la utilización de una gamma sonda portátil. Deberá medirse la radiación que emite el ganglio antes de ser extirpado (*in vivo*) y posteriormente a su extirpación (*ex vivo*) con el fin de asegurarse de que hemos extraído el ganglio correcto. De igual modo se mide la radiactividad del lecho ganglionar para asegurarse de que no queda otro ganglio que haya captado radiación (Mariani G et al, 2004; Gallegos-Hernández JF et al, 2002).

Actualmente la mayor parte de los autores utilizan ambos métodos de forma combinada con lo que se consigue una alta sensibilidad (cercana al 100%) (Cafiero F et al, 1998; Pijpers R et al, 1997; Marrazzo A et al, 2004). Los melanomas situados a nivel de las extremidades presentan un flujo linfático predecible según los canales linfáticos de Sappey. Pero en los melanomas localizados en la zona media de la cabeza, cuello y tronco hay que tener consideraciones especiales debido a su ambiguo drenaje linfático, que frecuentemente requiere administración intersticial, alrededor de todo el tumor o de su cicatriz en caso de extirpación previa, de la sustancia radiocoloidal

(*Mariani G et al, 2004*). Estas regiones linfáticas difícilmente podrían ser identificadas exclusivamente con colorantes, sin el apoyo de trazadores isotópicos que nos den un mapa previo del drenaje mediante la linfogramagrafía (*Norman J Jr et al, 1989; Berman CG et al, 1992*)

5.3. Estudios inmunopatológicos y moleculares

En 1988 Cochran y colaboradores publican un estudio de 2.227 ganglios linfáticos, correspondientes al vaciamiento de la base ganglionar completa de 100 pacientes con melanoma cutáneo en estadio I. Pretenden detectar, inmunohistoquímicamente, células tumorales ocultas en los ganglios linfáticos con la proteína S-100. En su estudio no observan una mayor incidencia de metástasis ocultas al realizar más cortes histológicos ni tras teñir con S-100, y añaden que el uso de la proteína S-100 provoca errores diagnósticos confundiendo los elementos neoplásicos con células dendríticas interdigitantes, células névicas capsulares, una minoría de macrófagos sinusales y células de Schwann de nervios asociados a ganglios (*Cochran AJ et al, 1988*).

En 1997, Messina y Glass proponen el primer protocolo para el estudio anatomopatológico del ganglio linfático centinela. Los pasos a seguir eran los siguientes: "después de la extracción del GC, cada ganglio se deposita en un recipiente diferente con formol, a temperatura ambiente, y durante 48 horas, para permitir que disminuya el sulfuro coloidal marcado con tecnecio utilizado para la localización intraoperatoria del ganglio. Posteriormente se realiza el estudio macroscópico del GC anotándose la presencia o ausencia de colorante azul vital, pigmento melanina-like, y nódulos tumorales. El

ganglio se secciona cada 2-3 mm y se incluye en su totalidad en bloques de parafina. Dependiendo del tamaño del tejido del bloque se realizan de uno a tres cortes, a diferentes niveles, en el mismo portaobjetos. Se realiza una tinción con hematoxilina-eosina por bloque. Adicionalmente, de cada bloque que haya resultado negativo para metástasis, se realiza un corte y se tiñe con S-100" (*Messina JL y Glass LF, 1997*). Dos años más tarde, los mismos autores publican un trabajo de 357 pacientes utilizando su protocolo de estudio. En el detectan 77 ganglios positivos de 56 pacientes. En 49 de estos ganglios la metástasis se detectó con H-E. La tinción con proteína S-100 reveló 28 ganglios linfáticos positivos que no habían sido detectados con H-E. Se trataba de micrometástasis que no habían sido detectadas inicialmente por alguna de las dos situaciones siguientes. En unos casos el volumen tumoral era tan pequeño que no estaba presente en los cortes iniciales pero se pudieron detectar al realizar secciones más profundas para la inmunohistoquímica. En otros casos, las micrometástasis son identificadas, inicialmente, con inmunohistoquímica, pero en la revisión retrospectiva de la H-E se pueden observar las células tumorales a gran aumento. Por tanto, en 19 de los 357 pacientes el diagnóstico de ausencia de metástasis de melanoma habría sido erróneo con hematoxilina-eosina. Estos autores concluyen que un estudio adecuado del ganglio linfático centinela requiere la inclusión del ganglio completo en parafina y la realización rutinaria de inmunohistoquímica para S-100 en los casos en que el examen macroscópico resulte negativo para tumor (*Messina JL et al, 1999; Goscin C et al, 1999*) (Tabla I.8). Reintgen y Shivers (1999) proponen la introducción de técnicas de inmunohistoquímica más específicas, tales como el HMB-45, MART-1, o NK1C3, en el estudio

del GC para evitar la confusión que produce la proteína S-100 al teñir células névicas, macrófagos e histiocitos (Reintgen D y Shivers S, 1999).

Tabla I.8. Distribución de las células s-100 positivas en el ganglio linfático

CÉLULAS POSITIVAS PARA S-100	DISTRIBUCIÓN
Células reticulares interdigitantes	Alrededor de los centros germinales
Tejido adiposo	Perinodal
Agregados de células névicas	Nidos pequeños de células en la cápsula del ganglio

*Messina JL et al 1999.

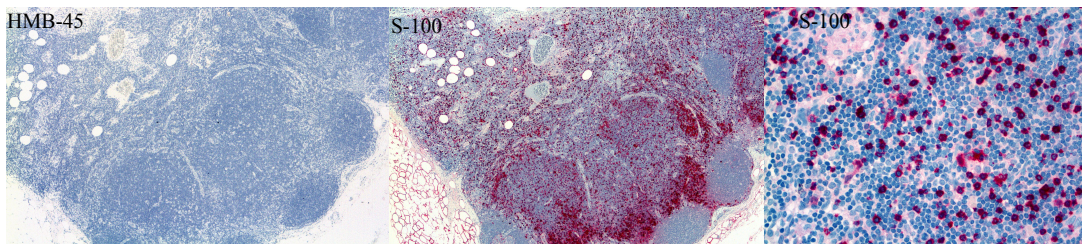


Figura I.18: Estudio comparativo de la tinción inmunohistoquímica en ganglio linfático centinela negativo con HMB-45 y S-100

Yu et al (1999) comparan el estudio convencional del GC y el estudio con IHQ (S-100, HMB-45, NK1C3 y MART-1) revisando 235 ganglios linfáticos centinela negativos para metástasis de melanoma siguiendo el examen histológico rutinario y concluyen que los cortes seriados y las tinciones inmunohistoquímicas detectaron metástasis en un 12% de los casos que habían resultado negativos con el examen anatomopatológico rutinario (Yu LL et al, 1999).

En este mismo año varios grupos comienzan a utilizar RT-PCR de tirosinasa, principalmente, para detectar micrometástasis de melanoma tanto en GC como en la base ganglionar completa. En todos los estudios se demuestra un aumento de la sensibilidad si se compara con el estudio inmunohistoquímico con HMB-45 y proteína S-100. Todos los casos que resulten positivos en el estudio molecular deben ser posteriormente examinados con inmunohistoquímica para detectar los falsos positivos debidos a la presencia de nevus intracapsulares (positivos con RT-PCR de tirosinasa y con inmunohistoquímica de proteína S-100, pero negativos con HMB-45) (*Blaheta HJ et al, 1999; Bostick PJ et al, 1999; Lukowsky A et al, 1999; Hatta N et al, 1999*).

Ya en el año 2000, la WHO Melanoma Program publica el primer trabajo con su experiencia en GC a través de los datos obtenidos durante 5 años, en el que la mayoría de los grupos de trabajo realizan:

1. Cortes en congelación de el/los ganglios centinelas de las dos superficies de corte del ganglio. Tinción con H-E. Estudio microscópico.
2. Fijación del material en formol tamponado al 10%, cortes del ganglio cada 1-2mm, incluyéndolo entero. Inclusión en bloques de parafina del cual se realizan 10 cortes, el corte primero y el quinto se tiñen con proteína S-100 y HMB-45, y el resto con H-E.

En su estudio concluyen que la técnica del GC es, actualmente, la mejor modalidad de tratamiento, estadificación y pronóstico para pacientes con melanoma cutáneo sin evidencia clínica de afectación ganglionar o de metástasis a distancia. Por otra parte, se preguntan si es necesaria la realización de la extirpación de la base ganglionar completa en pacientes con micrometástasis en un solo ganglio linfático

y se comprometen a realizar un nuevo estudio cooperativo concentrándose en este problema específico (*Cascinelli N et al, 2000*).

En este mismo año Van der Velde-Zimmermann y colaboradores publican un estudio en el que inicialmente realizan RT-PCR de tirosinasa a los ganglios centinelas de melanoma de 36 pacientes para preseleccionar a los pacientes que requerirán la realización posterior de estudio inmunopatológico (sólo de los casos positivos), y asimismo eliminar los falsos positivos. Con este método pretenden implantar el uso de la RT-PCR con objeto de disminuir los costes y aumentar la eficacia diagnóstica (*Van der Velde-Zimmermann D et al, 2000*).

Muchos estudios posteriores han apoyado la utilidad de la detección de tirosinasa, melan-A (MART-1) y HMB-45, por RT-PCR, en la identificación de micrometástasis de melanoma; son también diversos los estudios que comparan ambos métodos (*Hochberg M et al, 2002; Gutzmer R et al, 2002; Davids V et al, 2003*). Casi todos los trabajos concluyen que existe buena correlación entre la expresión inmunohistoquímica y la PCR, pero con una mayor sensibilidad de la PCR. Los casos positivos para PCR y negativos para inmunohistoquímica, se corresponden, en la mayoría de los casos, a ganglios donde se observan nevus intracapsulares, presentándose con una frecuencia que varía entre 3 y 15% según la serie. En el estudio de Rimoldi y colaboradores esta cifra alcanza el 11% y se observa que, con RT-PCR, presentan una señal intensa de tirosinasa y melan-A, en concordancia con la inmunohistoquímica y tan sólo en una pequeña fracción de los casos discordantes (2 pacientes de 57 incluidos en el estudio) se corresponde con células tumorales aisladas. (*Rimoldi D et al, 2003*).

Carson et al demostraron que los nevus capsulares son 4 veces más frecuentes en ganglios linfáticos centinelas que en ganglios no centinelas y 10 veces más frecuentes en pacientes con melanoma que en pacientes con otro tipo de cáncer (*Carson KF et al, 1996*) Por otra parte la presencia de fibras nerviosas en el GC también puede explicar las discordancias entre PCR e IHQ en los casos en que no se observen nevus intracapsulares. Las células de Schwann presentes en los nervios son positivas para la transcripción de tirosinasa pero aún no se conoce si lo son para Melan A. Por tanto, aunque la RT-PCR de tirosinasa es altamente sensible, parece más apropiada la utilización de RT-PCR de melan-A por ser altamente sensible y más específica. Estos dos parámetros aumentan significativamente cuando se utilizan dos marcadores simultáneamente (*Rimoldi D et al, 2003*). Se han utilizado cocktails que incluyen diferentes anticuerpos monoclonales detectados con RT-PCR (MART-1/ melan-A, tirosinasa) para facilitar la detección e interpretación de las micrometástasis de melanoma y se ha observado, en algunos trabajos, un incremento en la tasa de detección de micrometástasis si se compara con el estudio realizado con los diferentes anticuerpos de manera aislada (*Shidham VB et al, 2003*).

En la actualidad se está tratando de cuantificar la cantidad de células tumorales que aparecen en el ganglio centinela para correlacionarlo con las tasas de recidiva en la base ganglionar, establecer la enfermedad (melanoma) mínima residual en ganglio linfático centinela y mejorar la predicción de supervivencia libre de enfermedad. Giese y colaboradores, en un estudio de 139 pacientes, utilizando RT-PCR a tiempo real para cuantificar las micrometástasis

de melanoma en GC, han encontrado diferencias estadísticamente significativas al comparar las tasas de recidivas entre los pacientes con ganglio centinela histológicamente positivo y negativo pero con RT-PCR a tiempo real positivo (*Giese T et al, 2005*)

6. LINFANGIOGÉNESIS

Se conoce como angiogénesis al "proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir del lecho vascular preexistente". Partiendo de esta definición, podemos considerar la linfangiogénesis como la formación de nuevos vasos linfáticos a partir de vasos linfáticos preexistentes (*Quesada AR et al, 2004*).

Los vasos linfáticos están constituidos por un endotelio vascular fino, rodeados por una membrana basal discontinua. En la sustancia extracelular que los rodea encontramos unos filamentos extracelulares que se unen a la membrana plasmática de las células endoteliales, son lo que se conocen como filamentos de anclaje y tiene la función de mantener los vasos abiertos para permitir así el paso de sustancias hacia la luz (*Fawcett W, 1989*).

Los factores de crecimiento de endotelios vasculares (VEGF) son unos factores claves implicados en los procesos de vasculogénesis. Constituyen una familia de 5 factores (A, B, C, D y E). VEGF-A se encuentra relacionado con la angiogénesis y ha sido ampliamente

estudiado. La acción de VEGF-B no es bien conocida. VEGF-E se sabe que está codificado por el genoma del virus orf. VEGF-C Y VEGF-D están implicados en la linfangiogénesis y son dos factores muy parecidos estructuralmente. VEGF-C se expresa, en el embrión, en áreas donde vasos linfáticos emergen a partir de venas del embrión, como en el metanefros, áreas axilar y yugular y en el mesenterio. En el adulto, se expresa en el corazón, intestino delgado, placenta, ovario y glándula tiroides. No se estimula por la hipoxia (como lo hace VEGF-A, principal responsable de la angiogénesis), por lo que se sugiere que su función está limitada al mantenimiento y crecimiento del sistema linfático. Al parecer estimula la división y la migración de células endoteliales y favorece la permeabilidad vascular. También se ha demostrado la capacidad de estimular la quimiotaxis de macrófagos, *in vitro* (Skobe M et al, 2001). Se ha observado recientemente que tumores que sobreexpresan VEGF-C presentan linfáticos peritumorales agrandados, y se ha sugerido que este aumento de tamaño es suficiente para incrementar las metástasis por vía linfática. VEGF-D se encuentra muy relacionado con VEGF-C y es un mitógeno de las células endoteliales (Figura I.18). Se expresa con particular intensidad en el pulmón en desarrollo. En el adulto, se expresa en el endotelio vascular, corazón, músculo esquelético, pulmón, e intestinos delgado y grueso.

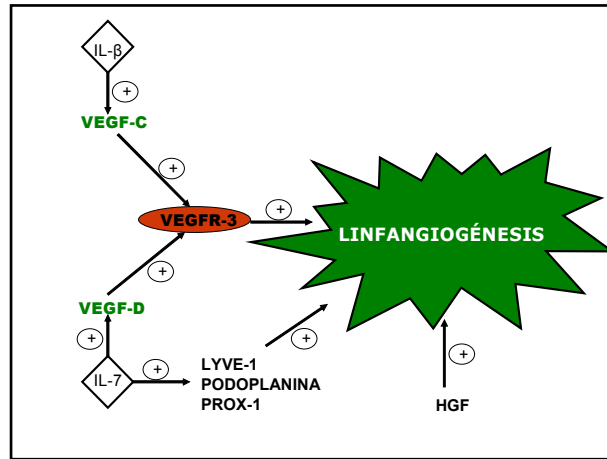


Figura I.18. Factores reguladores de la linfangiogénesis

Ambos factores son muy importantes en el proceso de linfangiogénesis tumoral, y se ha comprobado que su sobreexpresión promueve la metástasis tumoral por vía linfática (He Y et al, 2004).

Los endotelios sanguíneos y linfáticos expresan receptores para estos factores (VEGFR). Los VEGFR están dotados de tres dominios, uno intracelular, tirosin-quinasa, otro transmembrana y uno extracelular, formados por inmunoglobulinas. Es en este dominio extracelular donde se unen los diferentes VEGF. Así, los endotelios sanguíneos presentan los receptores VEGFR-1 y 2. Al receptor **VEGFR-1** se une VEGF, VEGF-B y PlGF (factor de crecimiento placentario) y al receptor **VEGFR-2**, los ligandos VEGF, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. Existe un tercer receptor, el **VEGFR-3**, que es activado sólo por VEGF-C y VEGF-D (Figura I.19).

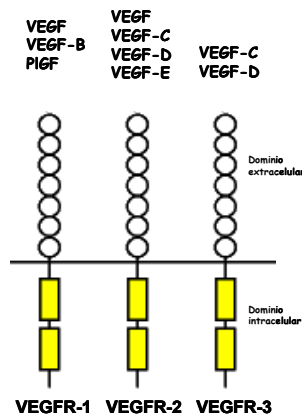


Figura I.19. Receptores de los factores de crecimiento del endotelio vascular

VEGFR-3 se expresa durante la vida embrionaria tanto en endotelio venoso como linfático, pero, en la vida adulta su expresión está restringida a los vasos linfáticos. Presenta un papel importante en la remodelación y maduración del plexo capilar primario en la embriogénesis temprana y mutaciones de VEGFR-3 se asocian a linfedema hereditario (*Staker SA et al, 2002*). Por tanto, se ha demostrado que VEGFR-3 es esencial para un correcto desarrollo y crecimiento del sistema linfáticos. En humanos, existen dos isoformas de VEGFR-3, VEGFR-3S (corta) y VEGFR-3L (larga). La isoforma L es la predominante en tejido. VEGFR-3 produce aumento de la movilidad celular, reorganización de actina, y de la proliferación de células endoteliales. Es un marcador de vasos linfáticos en tejido normal y patológico y se ha utilizado para demostrar el aparente origen linfático de las células del sarcoma de Kaposi. En tejido neoplásico, se expresa tanto en vasos linfáticos como sanguíneos neoformados (*Clarijs R et al, 2002; Al-Rawi MMA et al, 2005*)

Estudios recientes han correlacionado la expresión de VEGF-C con la localización de las metástasis en ganglios linfáticos y, comparando ésta con la expresión de VEGF-C en el tumor primario,

sugiriéndose que puede ser utilizado como factor predictivo de la presencia de metástasis por vía linfática y seleccionar a los pacientes en los que la terapia antiangiogénica pueda resultar más efectiva (*Schietroma C et al, 2003; Goydos JS y Gorski DH, 2003*). Por otra parte, se ha demostrado que VEGF-C es capaz de inducir la angiogénesis in vitro, y en melanomas que lo sobreexpresan, VEGF-C colabora con VEGF en el aumento de la permeabilidad capilar y la angiogénesis. Al mismo tiempo, parece tener un efecto inmunomodulador ya que ha sido detectada la presencia de VEGFR-3 en macrófagos de ratón y se ha observado un efecto quimiotáctico de macrófagos por parte de VEGF-C (*Skobe M et al, 2001*).

Numerosos estudios han tratado de cuantificar los vasos linfáticos presentes en los tumores primarios, para establecer su relación con la supervivencia y su potencial de producir metástasis (*Staker SA et al, 2002; Dadras SS et al, 2003*). La diferenciación histológica entre los canales linfáticos y las vénulas o capilares, es muy difícil debido a su semejanza. La cuantificación de los vasos linfáticos se ha podido realizar gracias a la aparición de nuevos marcadores que se expresan selectivamente en vasos linfáticos de tejidos normales y tumorales. Estos marcadores son anticuerpos tales como anti-LYVE-1 (receptor hialurónico endotelial linfático-1), anti-podoplanina, anti-PROX-1 (lymphatic homeobox protein) y anti-VEGFR-3.

LYVE-1 es un polipéptido integral de membrana tipo I, que se expresa en la superficie celular como una proteína de 60 KDa. Es abundante en el bazo, ganglio linfático, corazón, pulmón e hígado fetal, y menos abundante en apéndice, médula ósea, placenta, músculo e

hígado adulto, y ausente en linfocitos en sangre periférica, timo, cerebro, riñón y páncreas. Se expresa en células endoteliales de vasos linfáticos y de sinusoides esplénicos. Algunos Estudios comprueban que el uso de Lyve-1 como marcador linfático ayuda a detectar vasos linfáticos en tumores primarios. Además, la presencia de Lyve-1 en tumores puede promover la metástasis en ganglio linfático.

Podoplanina es una glicoproteína de superficie celular, de 43KDa que se expresa en los podocitos del riñón de la rata. En el adulto, el órgano donde más se expresa es el pulmón, también se expresa en células del plexo coroideo y en células endoteliales linfáticas, pero no en endotelio vascular sanguíneo, de la piel. Hasta la fecha, la función exacta de la podoplanina es desconocida. De cualquier forma, la podoplanina parece estar relacionada con la regulación de la permeabilidad de los vasos linfáticos, o quizás, en el mantenimiento de su integridad. D2-40 es un nuevo anticuerpo monoclonal que identifica, específicamente, a la proteína de fusión de la podoplanina-Fc humana, a través de una sialoglicoproteína "O-linked", de 40 KDa que está presente en el endotelio linfático (*Schacht V et al, 2005*). Además está presente en el testículo fetal y en la superficie de los tumores germinales de testículo. Recientes estudios han demostrado que se expresa en endotelios linfáticos en linfangiomas, linfangiosarcomas y en sarcomas de Kaposi y no se observa tinción en tumores vasculares sanguíneos tales como hemangiomas, tumor glómico, angioliomas, hemangiopericitomas o hemangioendoteliomas, demostrándose así, su capacidad para discriminar entre endotelios linfáticos y endotelios sanguíneos.

Prox-1 es un marcador de una subpoblación de células endoteliales que brotan de los vasos sanguíneos para dar origen al sistema linfático, durante el desarrollo embrionario precoz (*Wigle JT y Oliver G, 1999*). Se trata de una proteína de 8 KDa, cuyo gen se encuentra localizado en el Cr 1q32.2-q32.3 humano. En el pollo, Prox-1 se expresa intensamente en el desarrollo del cristalino, retina y páncreas. En el ratón se detecta expresión de Prox-1 en neuronas jóvenes de la región subventricular del SNC, así como en el desarrollo del cristalino y del páncreas (*Al-Ravi MAA et al, 2005*). En ratones que no expresan Prox-1 la angiogénesis y vasculogénesis no se ve afectada mientras que la "salida de brotes", que darán lugar al sistema linfático, se detiene. Por ello se piensa que Prox-1 juega un papel crucial en el desarrollo del sistema linfático (*Wigle JT y Oliver G, 1999*).

VEGFR-3 es un receptor tirosín-Kinasa, que ha demostrado controlar el desarrollo del sistema linfático. La importancia de VEGFR-3 en el desarrollo del sistema linfático ha cobrado fuerza tras el conocimiento de que el desarrollo de linfedema precoz está unido a alteraciones en el locus del VEGFR-3 en el cr 5q. Como ya se ha dicho anteriormente, induce aumento de la movilidad celular, reorganización de actina, y proliferación de células endoteliales y es un marcador de vasos linfáticos en tejido normal y patológico.

Trabajos recientes han puesto de manifiesto la relevancia clínica de la linfangiogénesis tumoral (*Schacht V et al, 2005*). Así, Kitadai et al, en un estudio de 39 pacientes con carcinoma gástrico, determinan la expresión de VEGF-C y VEGFR-3, así como la densidad de vasos linfáticos (DVL) y concluyen que la expresión de marcadores linfáticos

puede predecir la existencia de metástasis a nivel de ganglios linfáticos (*Kitadai Y et al, 2005*). Ishikawa M et al, determinan la expresión de VEGF-C en 97 muestras de biopsias endoscópicas de 46 pacientes con carcinoma gástrico. De los datos obtenidos en su estudio deducen que la determinación de VEGF-C en biopsias endoscópicas no permite predecir el estado de los ganglios linfáticos (*Ishikawa M et al, 2005*). Hachisuka T et al investigan, mediante técnicas de inmunohistoquímica, la expresión de VEGF-C en 79 casos de carcinoma gástrico, y la DVL, con el anticuerpo LYVE-1, en 59 casos, concluyendo que VEGF-C juega un papel importante en la linfangiogénesis y en el crecimiento tumoral en el carcinoma gástrico (*Hachisuka T et al, 2005*).

Estudios similares se han realizado en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Franchi A et al, determinan la linfangiogénesis intra y peritumoral de 52 muestras, por inmunohistoquímica, con D2-40. El análisis multivariante de los resultados demostró relación entre el riesgo de desarrollar metástasis en ganglios linfáticos y el aumento de la DVL peritumoral, en el carcinoma escamosos (*Franchi A et al, 2004*). Kyzas PA et al estudian 81 muestras de carcinoma escamoso de cabeza y cuello con el fin de demostrar la presencia de linfangiogénesis tumoral y la relación de la DVL intra y peritumorales con la existencia de metástasis en ganglios linfáticos. Para poner de manifiesto la linfangiogénesis tumoral realizan una doble tinción inmunohistoquímica con un marcador antipodoplanina y Ki 67, encontrándose vasos linfáticos intratumorales proliferantes, y confirmándose, así, la linfangiogénesis tumoral. Además, observan relación estadísticamente significativa entre el aumento de la DVL

intratumoral y la disminución de la supervivencia, así como con el aumento de las metástasis en ganglios linfáticos con el aumento de la DVL peri e intratumorales (Kyzas PA et al, 2005).

En el caso del carcinoma de mama, Choi W et al determinan la densidad de microvasos sanguíneos y linfáticos en 29 carcinomas invasivos de mama, utilizando CD31 y D2-40, y concluyen su trabajo afirmando que la cuantificación de la angiogénesis y la linfangiogénesis pueden ser de utilidad en el carcinoma de mama para estimar el riesgo de metástasis (Choi WWL et al, 2005). Nakamura Y et al estudian la DVL (podoplanina), en asociación con las metástasis en ganglios linfáticos, la expresión de VEGF-C y con el pronóstico, en 113 casos de carcinoma de mama. Los resultados de su estudio ponen de manifiesto que, el aumento de la DVL se correlaciona con las metástasis en ganglios linfáticos y con la expresión de VEGF-C, y que un aumento en la DVL puede ser un factor pronóstico desfavorable para la supervivencia a largo plazo en el carcinoma de mama (Nakamura Y et al, 2005).

En cuanto al carcinoma de próstata, Jennbacken K et al estudia la expresión de VEGF-C y su receptor (VEGFR-3) en 22 muestras de cáncer de próstata, por inmunohistoquímica. Los resultados de su estudio indican que el aumento de la expresión de VEGF-C y VEGFR-3 juega un importante papel en la progresión y capacidad metastásica, en ganglios linfáticos regionales, del carcinoma de próstata (Jennbacken K et al, 2005). Por su parte, Zeng Y et al realizan un estudio, con el propósito de determinar la distribución de los vasos linfáticos en la próstata no carcinomatosa e investigar la relación entre la DVL y el

estado de los ganglios linfáticos en el carcinoma de próstata. Para ello identifican inmunohistoquímicamente, con D2-40, la DVL en 7 muestras de próstata no carcinomatosa y en 37 muestras con carcinoma de próstata. Su estudio concluye con la presunción de que los vasos linfáticos peritumorales, probablemente, sirvan como una vía para el desarrollo de metástasis en ganglios linfáticos, en el carcinoma de próstata, y que el aumento de la DVL peritumoral predice las metástasis en ganglios linfáticos (*Zeng Y et al, 2005*).

Ueda M y colaboradores investigan la correlación biológica entre la expresión de VEGF-C y el fenotipo invasivo, en el carcinoma de ovario de 73 pacientes comparando la expresión inmunohistoquímica de VEGF-C con respecto a las características clínico-patológicas y la evolución del paciente. En su estudio encuentran una estrecha relación entre la expresión de VEGF-C y el fenotipo invasivo y que esta afecta a la supervivencia de los pacientes con cáncer de ovario (*Ueda M et al, 2005*).

Respecto al cáncer de vejiga, Suzuki K et al determinan, con inmunohistoquímica, la expresión de VEGF-C en 87 casos de carcinoma de células transicionales y en 20 ganglios linfáticos pélvicos con metástasis y sugieren que la expresión de VEGF-C es un factor predictivo importante de metástasis en ganglios linfáticos pélvicos en pacientes con carcinoma vesical (*Suzuki K et al, 2005*).

Yasuoka et al estudian los niveles de expresión de VEGF-D en el carcinoma papilar de tiroides y en ganglios linfáticos metastáticos, con inmunohistoquímica y con RT-PCR. La conclusión de su estudio es que el

aumento de expresión de VEGF-D y el aumento de la DVL juegan un papel importante para el desarrollo de las metástasis en ganglio linfático, en el carcinoma papilar de tiroides (*Yasuoka H et al, 2005*).

En relación a la linfangiogénesis del melanoma cutáneo y su valor en la progresión de la enfermedad hay varios artículos publicados. Uno de los primeros es el de *Godoy JS y Gorski DH (2003)* en el cual realizan un estudio para determinar si la expresión de VEGF-C se correlaciona con el estadio de progresión. Para ello cuantifican los niveles de ARNm de VEGF-C en melanomas en diferentes estadios de progresión y en fase de crecimiento horizontal y vertical. Ellos observan que, en los melanomas en fase de crecimiento vertical los niveles de expresión de VEGF-C son más elevados que en los melanomas en fase de crecimiento horizontal. Así mismo, las metástasis ganglionares expresan los niveles más elevados de VEGF-C, seguidos de las metástasis dérmicas regionales. Los melanomas primarios y las recurrencia locales expresan valores relativamente bajos de VEGF-C. Además, encuentran relación entre la expresión de VEGF-C y de LYVE-1. Concluyen su trabajo sugiriendo que los niveles elevados de VEGF-C pueden ser importantes en los melanomas con metástasis linfáticas regionales y que los niveles de VEGF-C y LYVE-1 pueden identificar tumores con alto riesgo de producir metástasis en ganglios linfáticos, en los cuales, la terapia antilinfangiogénica puede ser más efectiva (*Godoy JS y Gorski DH, 2003*). *Schietroma C et al (2003)* evalúan la expresión de VEGF-C, *in vitro*, en líneas celulares de melanoma humano, obtenidas de muestras de metástasis cutáneas y en ganglios linfáticos, por RT-PCR, Northern blot e inmunofluorescencia. Además estudian, por inmunohistoquímica, 42 muestras de metástasis de melanoma y 10

muestras de melanoma primario de piel. Los hallazgos del estudio demuestran, según los autores, que la expresión de VEGF-C se correlaciona con la localización de las metástasis de melanoma en ganglio linfático y sugieren que, la expresión de VEGF-C en melanomas cutáneos primarios puede predecir la diseminación metastásica a ganglios linfáticos (*Schietroma C et al, 2003*). Straume O et al (2003) determinan la DVL en una serie de melanomas nodulares y correlacionan los hallazgos con la expresión de otros factores angiogénicos, incluyendo VEGF-C, bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), con la supervivencia del paciente y con datos clínico-patológicos. Para ello utilizan LYVE-1 y anticuerpo antipodoplanina, para detectar los vasos linfáticos, y la miden la DVL intra y peritumoral. Concluyen su estudio afirmando que, en melanomas con mayor crecimiento vertical y con mayor proliferación tumoral, se observa una reducción en el número de vasos linfáticos LYVE-1 positivos, y que un aumento de la DVL se asocia a un incremento en la supervivencia de los pacientes, en un análisis multivariante (*Straume O et al, 2003*).

Dadras SS et al (2003) investigan la existencia de linfangiogénesis en melanomas de piel y si la extensión de dicha linfangiogénesis se correlaciona con el riesgo de padecer metástasis en ganglios linfáticos y con la supervivencia del paciente. Para ello utilizan una doble tinción inmunohistoquímica con LYVE-1 y CD 31 y miden los puntos calientes ("hot spot") de vasos linfáticos proliferantes intra y peritumorales. En su estudio observan que la incidencia de vasos linfáticos peritumorales era significativamente mayor en los melanomas metastáticos y se correlacionaba con un menor tiempo de

supervivencia libre de enfermedad. Consideran que la linfangiogénesis tumoral puede ser un nuevo indicador pronóstico del riesgo de padecer metástasis en ganglio linfático, en melanoma cutáneo (*Dadras SS et al, 2003*). Por su parte, Shields JD et al (2004) miden la densidad linfática en casos de melanoma para determinar si existe un aumento de vasos linfáticos en el melanoma y si esto tiene relación con la capacidad metastásica. Para ello utilizan LYVE-1, por inmunohistoquímica. Los resultados de su estudio muestran que la densidad linfática está incrementada alrededor de los melanomas y que la densidad de vasos linfáticos y la invasión por parte de las células tumorales, de vasos linfáticos, puede predecir las metástasis (*Shields JD et al, 2004*). Giorgadze TA et al (2004) realizan un estudio con el propósito de determinar la DVL intra y peritumorales y compararla con la densidad de vasos en general (sanguíneos y linfáticos) en lesiones melanocíticas. Para ello utilizan marcadores inmunohistoquímicos, D2-40 y CD31. Sus resultados muestran que la DVL intratumorales está significativamente aumentado en melanomas en comparación con nevus benignos. El aumento de la DVL en melanomas invasivos sugiere que las células de melanoma pueden promover la linfangiogénesis. Además, proponen que la elevación de la DVL puede ser de gran utilidad el diagnóstico diferenciado de las lesiones melanocíticas (*Giorgadze TA et al, 2004*). Dadras SS et al (2005) realizan un estudio con 45 melanomas cutáneos y sus ganglios centinelas donde estudian la extensión de la linfangiogénesis y como ésta puede predecir las metástasis en el ganglio linfático centinela. Para ello cuantifican la linfangiogénesis en el tumor primario y en el ganglio linfático centinela y lo correlaciona con datos histológicos y clínicos, observando que los tumores con metástasis en ganglio centinela contienen puntos calientes

con mayor DVL comparándolos con los melanomas no metastatizantes. De su estudio concluyen que la extensión de la linfangiogénesis tumoral es un marcador pronóstico altamente sensitivo y específico de metástasis en ganglio centinela, y que la valoración de la linfangiogénesis en el melanoma primario puede ser más efectiva que las técnicas convencionales de medición del espesor tumoral (Breslow), para seleccionar pacientes con enfermedad metastásica precoz, para tratamiento agresivo (*Dadras SS et al, 2005*). Sahni D et al (2005) realizan un estudio con 36 pacientes (18 con ganglio centinela positivo y 18 negativo) para intentar establecer si el número o la distribución de los vasos linfáticos en el tumor primario se correlaciona con el estado del ganglio centinela. Para ello realizan una doble tinción inmunohistoquímica con LYVE-1 y S100. Concluyen su estudio con el resultado de que LYVE-1 puede demostrar la distribución de los vasos linfáticos, pero que el conteo de los vasos linfáticos no puede predecir el potencial metastatizante del melanoma y por tanto no puede sustituir a la biopsia de ganglio linfático centinela (*Sahni D et al, 2005*).

II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

El melanoma cutáneo es una enfermedad de distribución mundial, cuya incidencia ha aumentado significativamente durante las dos últimas décadas. Es el tumor cutáneo con mayor tasa de mortalidad debido principalmente a su capacidad metastásica, siendo el factor pronóstico más importante, como en la mayoría de los tumores sólidos, el estadio clínico-patológico.

Por tanto, es fundamental conocer el estado de los ganglios linfáticos a los cuales drena el melanoma primario, por lo que durante mucho tiempo se ha realizado linfadenectomía junto a una amplia resección del tumor primario (*Halsted, 1907; Meyer HW, Gumpert SL, 1953*). No obstante, una parte importante de los pacientes eran sometidos a linfadenectomías innecesarias, ya que su estudio posterior revelaba la inexistencia de metástasis.

Con el objetivo de evitar esta cirugía innecesaria y su morbilidad, surgen numerosos estudios basados en la hipótesis de que la localización y valoración histológica del primer ganglio linfático del grupo ganglionar al que drena la linfa de la región donde se encuentra el tumor (ganglio centinela) (*Cabanas RM, 1977; Morton DL et al, 1992; Alex JC, Krag DN, 1993*) nos permitiría predecir el estado del resto de ganglios linfáticos de esa región ganglionar (*Reintgen D et al, 1994; Cascinelli N et al, 2000; Mariani G et al, 2004*).

En la actualidad, a pesar de haberse descrito múltiples factores clínicos, histológicos y moleculares, relacionados con la evolución del paciente con melanoma, el espesor tumoral sigue siendo el factor predictivo más importante de la aparición de metástasis. Sin embargo,

el valor del grosor tumoral es limitado ya que un considerable número de pacientes con melanomas finos fallecen con enfermedad metastásica, mientras que otros

con tumores gruesos presentan una larga supervivencia (*Dadras et al, 2003*). Es evidente, que son precisos nuevos indicadores que permitan establecer la evolución de los pacientes con melanoma cutáneo.

En este sentido, se han propuesto nuevos factores, entre los que destaca la angiogénesis/linfangiogénesis tumoral, o "proceso de formación de nuevos vasos , hemáticos o linfáticos, a partir de los preexistentes" (*Schacht V et al, 2005*), por su influencia en la capacidad metastásica del tumor.

Basándonos en trabajos recientemente publicados (*Franchi A et al, 2004; Schacht V et al, 2005; Kitadai Y et al, 2005; Ishikawa M et al, 2005; Kyzas PA et al, 2005; Nakamura Y et al, 2005; Jennbacken K et al, 2005; Dadrass et al, 2005; Sahni D et al 2005*), decidimos averiguar la relación entre la angio/linfangiogénesis en el melanoma cutáneo y el estado del ganglio centinela o la aparición de recidiva o metástasis, así como la relevancia de factores angiogénicos en dicho proceso.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos:

- Conocer si existe asociación entre la expresión del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-C (VEGF-C) y la Densidad de Vasos Linfáticos (DVL), y entre la expresión del Factor de Crecimiento

Endotelial Vascular (VEGF-A) y la Densidad de MicroVasos (DMV), en el melanoma primario.

- Averiguar si la progresión local o la recidiva o metástasis del tumor primario se asocian a un mayor grado de angio o linfangiogenesis.
- Establecer si el estado del Ganglio Centinela es predecible mediante la cuantificación de microvasos y/o factores angiogénicos, por si mismos, o asociados a otros parámetros histopatológicos.

III. MATERIAL Y MÉTODO

1. MATERIAL.

Se seleccionaron 50 casos de los registrados en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria de Málaga para estudio de ganglio centinela de melanoma entre los años 2001 al 2004.

Los 50 casos seleccionados para el estudio se distribuyeron en dos grupos, según el estado del GC:

- Un grupo de 40 casos con ganglio centinela negativo (GCn).
- Un grupo de 10 casos con ganglio centinela positivo (GCp).

2. DATOS REGISTRADOS DE CADA CASO.

2.1. Datos clínicos:

- Edad.
- Sexo.
- Localización de la lesión: se separaron tres localizaciones diferentes cabeza y cuello, tronco y extremidades.

2.2. Datos histológicos de la lesión primaria:

2.2.1. Tipo de melanoma: se clasificó en

- Melanoma de extensión superficial (M.E.S.).
- Melanoma nodular (MN).
- Léntigo maligno melanoma (L.M.M.).
- Melanoma lentiginoso acral (M.L.A.).
- Otros (desmoplásico, neurotrofo, de mínima desviación, micronodular, pleomórfico, rabdoide, mixoide, pseudopapilar, de células pequeñas, de células balonizadas, nevoide, hemangiopericitoide, de células en anillo de sello).

2.2.2. Tipo celular: hemos considerado tres tipos celulares

- Células epitelioides: presentan núcleo redondo u oval, con citoplasma amplio, con un diámetro 1,5 veces mayor que el diámetro nuclear.
- Células de tipo común: son células de morfología similar a las epitelioides pero con citoplasma escaso.
- Células fusiformes: con núcleo y citoplasma alargados (sarcomatoides).

2.2.3. Niveles de invasión de Clark: los cinco niveles de invasión son los siguientes

- I. Melanoma intraepidérmico.
- II. Infiltración de la dermis papilar por elementos aislados, o por pequeños grupos de células tumorales, con un tamaño inferior o igual a los nidos neoplásicos observados en la epidermis.
- III. Infiltración de la dermis papilar por, al menos, un nódulo tumoral en expansión, de tamaño mayor que los nidos epidérmicos y que comprime los tejidos vecinos, alcanzando la unión entre la dermis papilar y reticular.
- IV. Infiltración de la dermis reticular.
- V. Infiltración de la grasa subcutánea.

2.2.4. Espesor tumoral (Índice de Breslow): se midió en mm, de forma clásica con un ocular micrométrico, sobre preparaciones de hematoxilina-eosina, eligiendo la zona más gruesa de la tumoración, midiendo desde la capa de células granulosas hasta la célula tumoral más infiltrante. En las lesiones ulceradas se tomó desde la base de la

úlceras hasta la célula tumoral más profunda. En algunos casos, donde el componente profundo era difícil de diferenciar de los restos de células névicas, se realizó la medición en preparaciones teñidas con la técnica inmunohistoquímica de HMB-45, además de con hematoxilina-eosina.

2.2.5. Ulceración: se evaluó la presencia o ausencia de la misma.

2.2.6. Signos de regresión: se consideró como regresión cuando había fibrosis, melanófagos y dilataciones vasculares.

Se valoró de forma negativa o positiva.

2.2.7. Infiltrado inflamatorio: el infiltrado inflamatorio linfocitario se evaluó cuantitativamente en ausente, leve o intenso

2.2.8. Índice de proliferación celular: se realizaron cortes de los bloques seleccionados, sobre portaobjetos silanizados (Dako ChemMate) que se tiñeron con un anticuerpo monoclonal contra el antígeno ki 67 (Dako) en un inmunoteñidor Dako TechMate Horizon. El número de campos visualizados osciló entre 20-30 (dependiendo del tamaño de la lesión). En lesiones de pequeño tamaño se evaluó la lesión completa. Se obtuvo el porcentaje de células tumorales con núcleos teñidos frente al total de células evaluadas, según el cual se consideró al índice de proliferación celular como:

Bajo: menos del 10% de células teñidas.

Intermedio: 10-30% de células teñidas.

Alto: más del 30% de células teñidas.

2.3. Datos relacionados con el ganglio linfático centinela:

- 2.3.1. **Número de ganglios centinelas aislados:** se contabilizó el número de ganglios linfáticos, etiquetados como centinela, recibidos por cada paciente.
- 2.3.2. **Localización del ganglio linfático centinela:** se definieron tres localizaciones, axila, ingle y otras.
- 2.3.3. **Vaciamiento:** se registró la realización o no de vaciamiento de la base ganglionar tras la valoración del ganglio linfático centinela y su afectación o no.

2.4. Presencia de recidiva/metástasis:

Se valoró la presencia de recidiva tumoral o presencia de metástasis a distancia desde el momento de la extirpación hasta el cierre de la fase de recogida de datos del estudio.

3. PROTOCOLO DE GANGLIO LINFÁTICO CENTINELA

Protocolo realizado en el Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria de Málaga:

- El tejido se recibe en formol, tamponado al 10%, desde el quirófano, líquido en el que se deja fijar durante 24h.
- Una vez fijado se procederá al tallado de la pieza que, según el tamaño del ganglio linfático, será de la siguiente forma (figura III.1):
 - Ganglio menor de 5mm: se corta por el eje mayor

- Ganglio mayor de 5mm: se realizan cortes cada 2-3mm, por el eje menor.

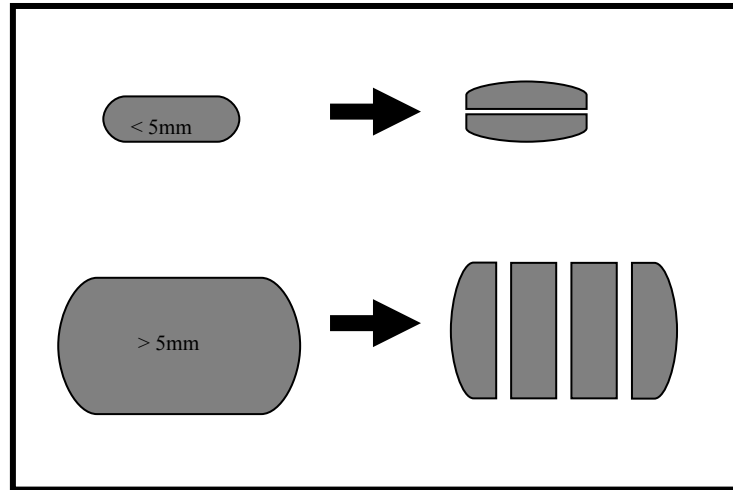


Figura III.1. Talleo del ganglio centinela

Tras el procesado habitual para inclusión en parafina se realizan cortes seriados del bloque tisular con un microtomo, procediéndose de la siguiente forma:

Se realizan tres tandas de tres cortes seriados. Entre cada tanda se profundiza 40micras. Los cortes primero y tercero de cada tanda se tiñen con hematoxilina-eosina, al corte central se le realiza la técnica inmunohistoquímica de HMB-45, de tal manera que por cada bloque obtenemos seis secciones teñidas con hematoxilina-eosina y tres secciones teñidas con HMB-45 (Figura III.2)



Figura III.2. Secciones del ganglio centinela

Se realizan tinciones inmunohistoquímicas adicionales con proteína S-100, melan-A y tirosinasa de todos los GC sobre el material restante del utilizado en el protocolo seguido en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Victoria de Málaga.

Interpretación de los datos obtenidos:

Se evaluará la presencia o no de metástasis. En los casos en que no se observen células tumorales el ganglio centinela se considerará negativo.

En los casos en que se observen células tumorales, se diferenciará entre tres tipos de metástasis:

- metástasis: lesiones metastásicas detectadas clínica o radiológicamente.
- micrometástasis: lesiones metastásicas mayores de 0.2mm pero no detectables clínica o radiológicamente.
- células tumorales aisladas: lesiones metastásicas menores de 0.2mm.

4. ESTUDIO DE LA LINFANGIOGÉNESIS.

Para el estudio de la linfangiogénesis se realizaron cortes histológicos consecutivos del bloque de parafina con tejido tumoral que sea seleccionado como más representativo de la lesión primaria, teniendo en cuenta que presente tanto áreas superficiales como profundas de la misma.

De cada uno de los bloques seleccionados se realizaron cinco cortes, sobre portaobjetos tratados (Dako), de los que el primero se tiñó con hematoxilina-eosina, para que sirva de control del material del que disponemos. Los cortes restantes se tiñeron con CD31 (prediluido, Dako), VEGF (1:1000 overnight, Caiman), D2-40 (1:200, Signet) y VEGF-C (1:300 overnight, Zymed Laboratorios).

Los cortes se desparafinaron con xilol e hidrataron en gradiente de alcoholes. La recuperación del epitopo se realizó por el método de la olla a presión con buffer de citrato de sodio 0.1mol/l (pH 6). La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno y para detectar el anticuerpo se utilizó la técnica de la estreptavidina-biotina inmunoperoxidasa (LASAB, Dako). Como control negativo se sustituyó el anticuerpo primario por un suero no inmune. Como cromógeno se usó fosfatasa alcalina y las preparaciones se contrastaron con hematoxilina. Las técnicas inmunohistoquímica de estos anticuerpos se realizaron en un teñidor automático (Dako, Techmate™).

Cuantificación de VEGF Y VEGF-C

La expresión de VEGF y VEGF-C (figura III.3) en las células tumorales, macrófagos, infiltrado inflamatorio, células estromales y vasos se valoró, según la intensidad de expresión, de 1 a 3:

1: negativa (ausencia de tinción o baja expresión (+)).

2: moderada expresión (++)

3: alta expresión (+++).

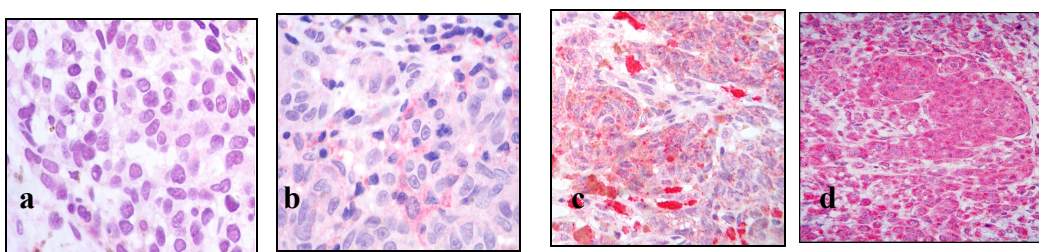


Figura III.3. Expresión de VEGF-C en células tumorales:

a y b: negativas; c: ++; d:+++

Análisis morfométrico de los vasos asistido por ordenador.

Para el estudio de la DMV y la DVL se revisaron los cortes seleccionados y teñidos con anticuerpos específicos (CD 31 y D2-40) a bajo aumento (20x) buscando las áreas de mayor densidad de vasos, los denominados puntos calientes ("hot spots") del tumor. De ellos se seleccionaron, siempre que fue posible, cuatro áreas, dos intratumorales y dos peritumorales (figura III.4).

Para digitalizar las muestras se utilizó una cámara Polaroid I DMC y un objetivo macro. Se tomaron imágenes en color de 800x600 píxeles usando el objetivo 10x de un microscopio Nikon Eclipse E400 y posteriormente se analizaron con el software Visilog 6.3 de Noesis (Francia). La imagen resultante ocupaba un área de 0.68mm². Se

contabilizan los vasos presentes en esa área; este proceso se repite cuatro veces por cada caso (una por cada "hot spot"). Posteriormente se realizó el sumatorio entre las dos áreas intratumorales y las dos áreas peritumorales obteniéndose el número total de vasos en un área de 1,36mm².

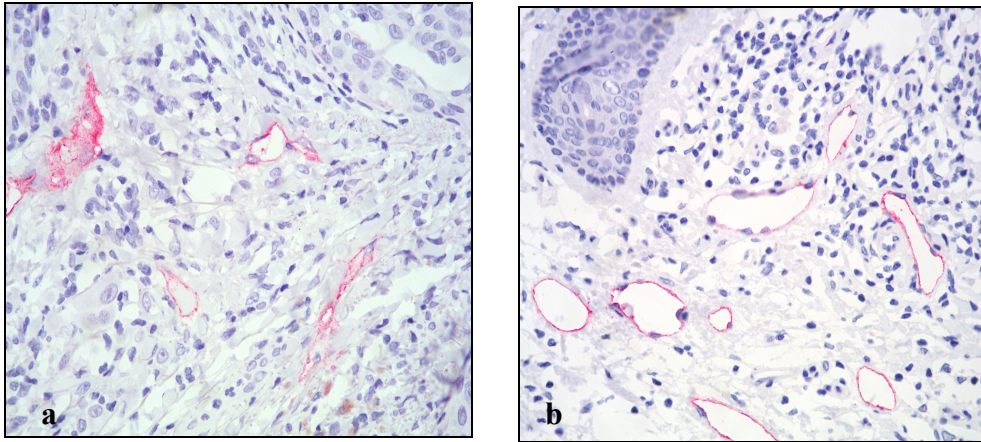


Figura III.4. Expresión D2-40 intratumoral (a) y peritumoral (b)

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con todos los datos obtenidos se constituyó una base de datos utilizando el programa Microsoft Excel. Posteriormente, para el estudio estadístico, se utilizó el programa SPSS (versión 11.5) para Windows.

Las variables consideradas en el trabajo fueron sometidas, en primer lugar, a un estudio estadístico descriptivo básico.

Las variables continuas se evaluaron por su valor numérico real, tomando como valores representativos la media aritmética y la desviación típica.

Las variables nominales cualitativas, distribuidas en dos o más categorías según los casos, se evaluaron mediante el estudio de los recuentos y frecuencias correspondientes.

En un segundo tiempo se realizaron estudios univariantes y multivariantes para determinar cual de todas las variables consideradas tenía mayor significación estadística ($p < 0,05$).

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO DESCRIPTIVO

1.1. Variables clínicas

Edad.- En el grupo de melanomas con GCn predominaron los pacientes con edades comprendidas entre 35-55 años o mayores respecto a los pacientes con menos de 35 años.

La distribución por edades de melanomas con GCp resultó ser prácticamente igual en los tres grupos etarios (Figura IV.1).

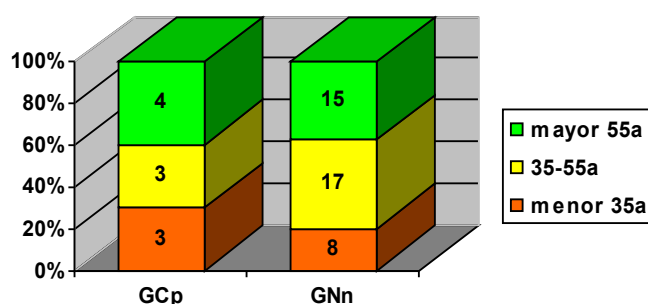


Figura IV.1: Distribución por la edad

Localización.- La localización de las lesiones fue predominante en tronco y extremidades, tanto en GCn como en GCp, y mucho menor en cabeza y cuello (7,5% en GCn y 10% en GCp) (Figura IV.2).

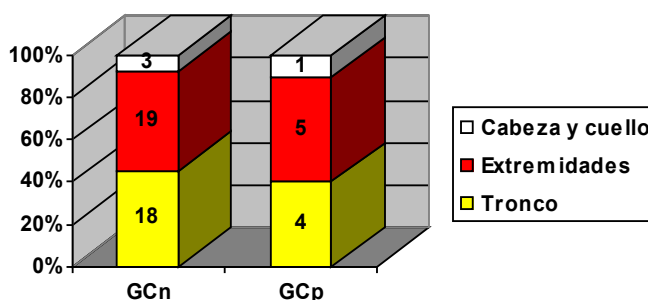


Figura IV.2: Localización de las lesiones

Sexo.- Se observó una mayor frecuencia del sexo femenino tanto en los casos con GCn (mujeres: 25casos (62,5%); hombres: 15casos (37,5%)) como positivos (mujeres: 7casos (70%); hombres: 3casos (30%)) (Figura IV.3).

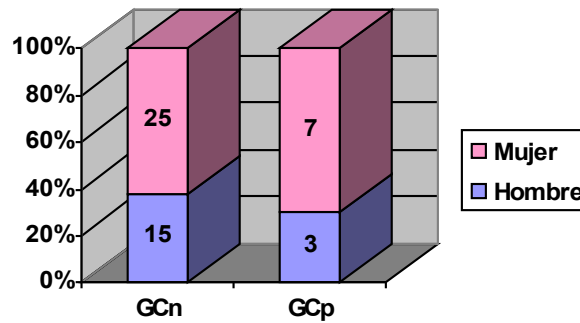


Figura IV.3: Distribución según el sexo

1.2. Variables histopatológicas

Tipos clínico-patológicos de melanomas.- El tipo más frecuente de melanoma en los casos con GCn fue el de extensión superficial (77,5%), mientras que en los casos con GCp fue el melanoma nodular, constituyendo el 60% de los casos (Figura IV.4).

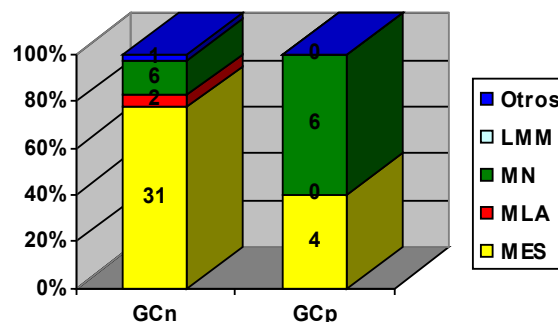


Figura IV.4: Tipo de melanoma

Niveles de Clark.- Tanto en melanomas con GC negativo como positivo, los niveles de invasión más frecuentes fueron el III (42,5% en GCn y 40% en GCp) y el IV (37,5% en GCn y 40% en GCp). En los 50 casos de la serie no se observó ningún caso con Clark I. En los melanomas con GCp, el nivel V de Clark alcanzó una frecuencia del 20%, a diferencia de los melanomas con GCn en los que dicho nivel fue raro (5%) (Figura IV.5).

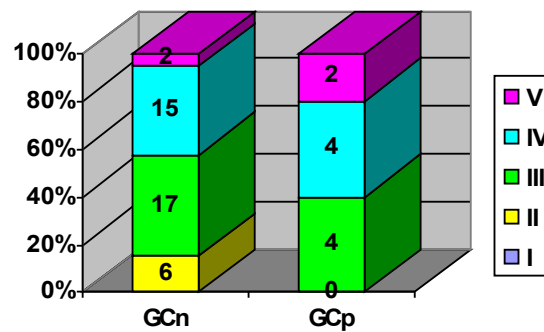


Figura IV.5: Niveles de Clark

Índice de Breslow.- El espesor tumoral, en los melanomas con GCn fue, en la mayoría de los casos (55%), inferior a 1,5mm, mientras que en los casos positivos predominaron las lesiones con espesores superiores a 1,5mm (70%) (Figura IV.6).

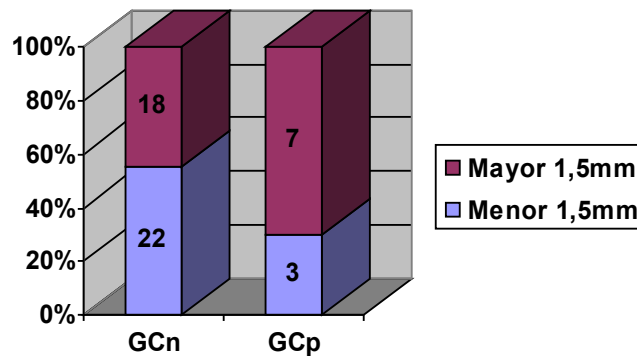


Figura IV.6: Índice de Breslow

Tipo de celularidad.- La celularidad de tipo común fue la más observada tanto en los melanomas con GC positivo como negativo, con unas frecuencias muy similares (60 y 57,5 %, respectivamente). El tipo celular epiteliode se observó ligeramente más en los casos con GCp (30%) que en los negativos (20%). Por el contrario, el tipo fusocelular, fue algo más frecuente en los casos con ganglio negativo (22,5% en GCn frente al 10% en GCp) (Figura IV.7).

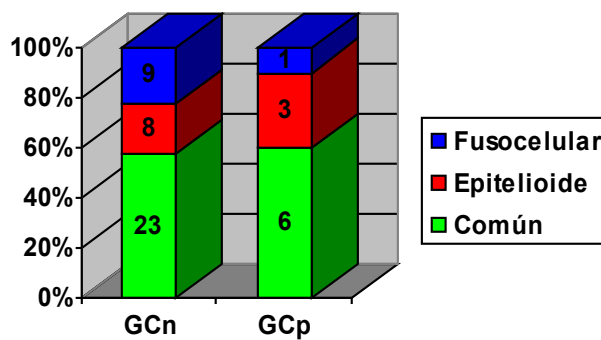


Figura IV.7: Tipo de celularidad

Ulceración.- La ausencia de ulceración fue la característica más común en los casos con GCn (82,5%). El grupo de GCp presentó un 60% de lesiones no ulceradas, por un 40% de lesiones con ulceración. (Figura IV.8).

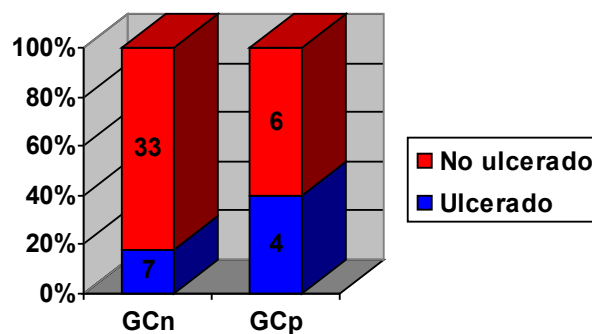


Figura IV.8: Presencia de ulceración

Regresión.- La presencia de regresión se observó tan solo en 5 casos de los 50 estudiados y todos ellos fueron casos con GCn (Figura IV.9).

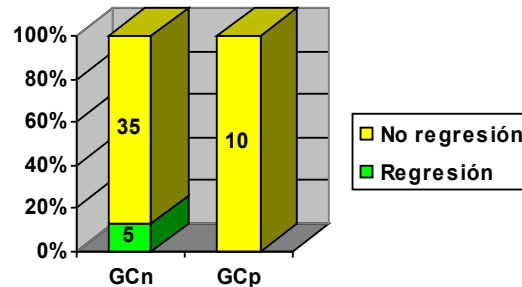


Figura IV.9: Presencia de regresión

Infiltrado inflamatorio dérmico.- Se pudo constatar presencia de infiltrado inflamatorio en casi el 90% de los casos. No obstante, en las lesiones con GCn el infiltrado fue preferentemente intenso, mientras que en GCp fue leve en la mayoría de los casos (Figura IV.10).

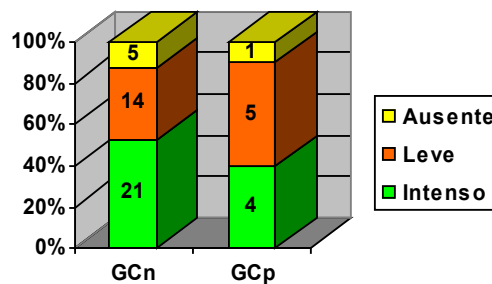


Figura IV.10: Infiltrado inflamatorio

Índice de proliferación celular.- Se observó un alto nivel de proliferación en el 60% de los casos GCp. Dicho nivel sólo se encontró en un 28,2% de los melanomas con GCn, en los que predominó un índice de proliferación moderada (43% de los casos) (Figura IV.11).

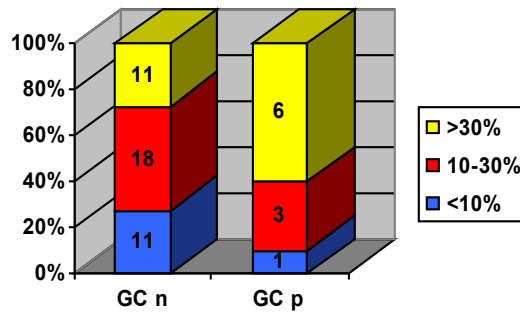


Figura IV.11: Expresión de Ki67

1.3. Variables relacionadas con la linfangiogenesis

Estudio de la DMV.- En el contaje del número de microvasos totales en el tumor primario, se obtuvo una media de 56,20 microvasos *intratumorales* (con una desviación típica de 35,15) para los casos con GCp, frente a 42,43 microvasos (desviación típica de 39,27) para los casos con GCn.

La media de microvasos totales *peritumorales* fue de 69,30 (desviación típica de 26,58), para los casos con GCp, y de 66,69 (desviación típica de 34,38) para los casos con GCn (Figura IV.12).

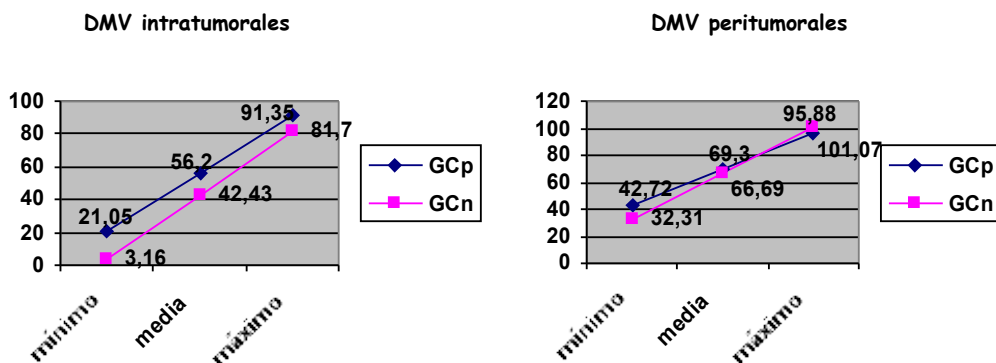


Figura IV.12: Densidad de microvasos (DMV)

Estudio de la DVL.- La media de vasos linfáticos *intratumorales*, en el tumor primario, fue 56,20 (desviación típica de 35,15) para los casos con GCp, frente a 42,43 (desviación típica de 39,27) para los casos con GCn.

En localización *peritumoral* la media de vasos linfáticos fue de 69,30 (desviación típica de 26,58), para los casos con GCp, y de 66,69 (desviación típica de 34,38) para los casos con GCn (Figura IV.13).

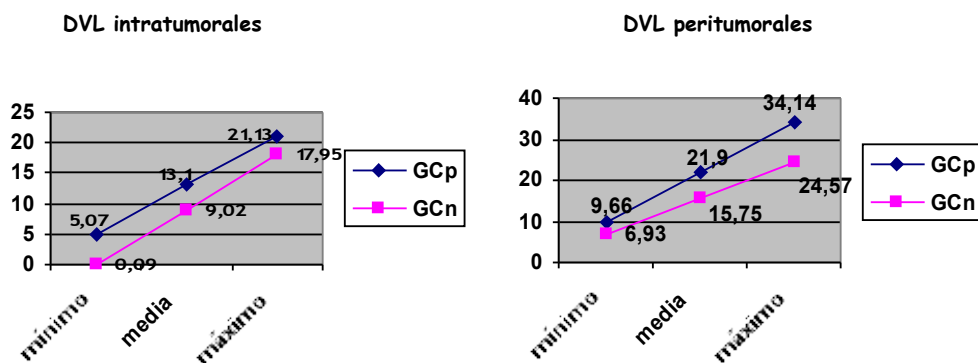


Figura IV.13: Densidad de vasos linfáticos (DVL)

Estudio de la expresión de VEGF.- Como característica más reseñable, la expresión de VEGF en todos los casos fue preferentemente baja (valor 1), tanto en las células tumorales, como en macrófagos, infiltrado inflamatorio, estroma y vasos. Únicamente se apreció un mayor porcentaje de casos con intensidad moderada (valor 2) en la valoración de la expresión vascular en GCp (Figura IV.14).

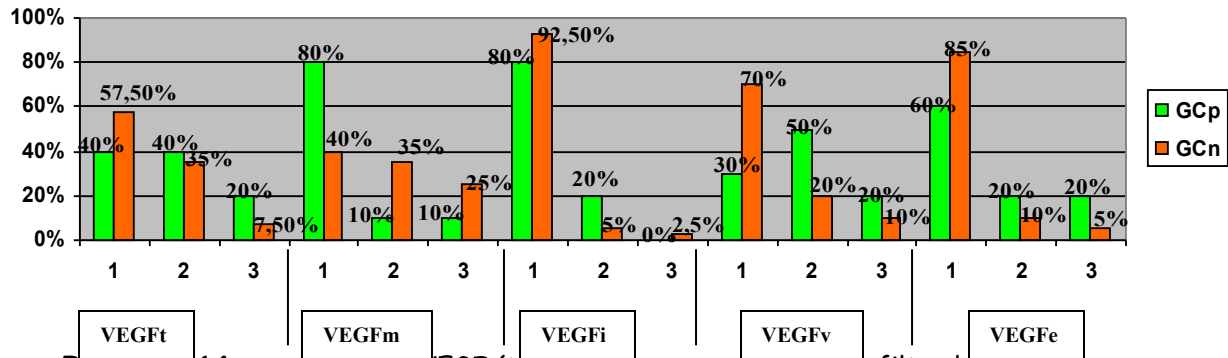


Figura IV.14: expresión de VEGF (t=tumoral, m=macrófagos, i=infiltrado inflamatorio, v=vascular, e=estromal)

Estudio de la expresión de VEGF-C.- En GCp se observaron frecuencias más elevadas de expresión inmunohistoquímica valor 2 y 3 en el infiltrado inflamatorio, vasos sanguíneos y estroma, en los que sin embargo predominó el valor 1 en GCn. La expresión de VEGF-C en células tumorales y macrófagos, tanto en los casos con GCn como en los GCp fue mayoritariamente baja (Figura IV.15).

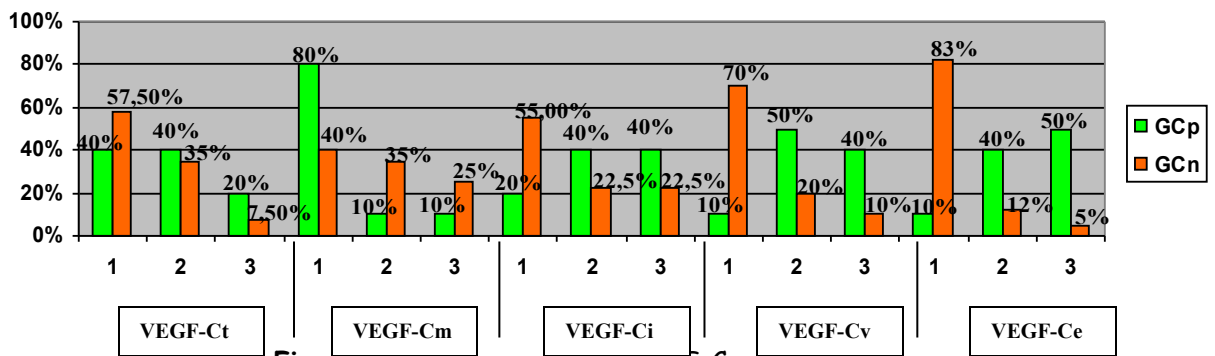


Figura IV.15: expresión de VEGF-C

2. ESTADÍSTICA ANALÍTICA.

2.1. Estudio de la DMV y de la DVL.

El conteo, en el tumor primario, del número de vasos sanguíneos, tanto intratumorales como peritumorales, mostró resultados similares en los melanomas con GCp y GCn (tabla IV.1). El número de vasos linfáticos encontrados dentro del tumor y en el área peritumoral tampoco demostró relación significativa con el estado del ganglio centinela (tabla IV.2).

Tabla IV.1: Densidad de microvasos totales (DMV).

DMV	GCP			GCn			Sig
	Nº casos	Media	Desv. tip	Nº casos	Media	Desv. tip	
intratumorales	10	56,20	35,15	40	42,43	39,27	0,319
peritumorales	10	69,30	26,58	40	66,69	34,38	0,825

Tabla IV.2: Densidad de vasos linfáticos (DVL).

DVL	GCP			GCn			sig
	Nº casos	Media	Desv. tip	Nº casos	Media	Desv. tip	
intratumorales	10	13,10	8,03	40	9,02	8,93	0,195
peritumorales	10	21,90	12,24	40	15,75	8,82	0,075

El tipo de melanoma no fue un factor determinante del número de microvasos ni del número de vasos linfáticos, así como tampoco el tipo de celularidad, ni la intensidad del infiltrado inflamatorio.

En relación con el índice de Breslow se observaron diferencias significativas tanto en DMV intratumorales ($p=0,004$) como en DVL intratumorales ($p=0,003$) entre los casos con Breslow menor de 1,5cm y mayor de 1,5cm (tabla IV.3) (Figura IV.16). No se observaron diferencias significativas en la DMV y DVL peritumorales.

Tabla IV.3: Relación del índice de Breslow con la DMV y la DVL intratumorales

w	Breslo	Nº casos	Media	Desv. típ	Sig
DMV intratumorales	<1,5cm	25	29,41	35,14	0,004
	>1,5cm	25	60,44	35,96	
DVL intratumorales	<1,5cm	25	6,28	7,09	0,003
	>1,5cm	25	13,40	9,09	

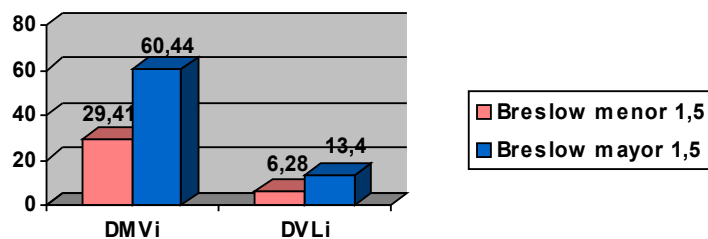


Figura IV.16: Relación del índice de Breslow con la DMV y la DVL intratumorales

Se observó relación significativa entre el nivel de invasión de Clark y la DMV intratumorales ($p= 0,001$), encontrándose un número creciente de vasos intratumorales (tanto de vasos totales como de vasos linfáticos) (tabla IV.4) (Figura IV.17) conforme aumentaba el grado de invasión de Clark hasta el nivel IV, produciéndose un descenso de la densidad cuando se alcanzaba el nivel V.

Tabla IV.4: Relación del nivel de Clark con la DMV y la DVL intratumorales

ark	CI	Nº casos	Media	Desv. típ	sig
DMV	intratumorales	6	9,00	9,20	0,001
II		22	34,90	31,83	
		18	71,41	41,22	
III		4	51,00	10,86	
IV					
V					
DVL	intratumorales	6	4,33	8,73	0,274
II		22	10,47	7,61	
		18	11,27	10,39	
III		4	10,00	7,52	
IV					
V					

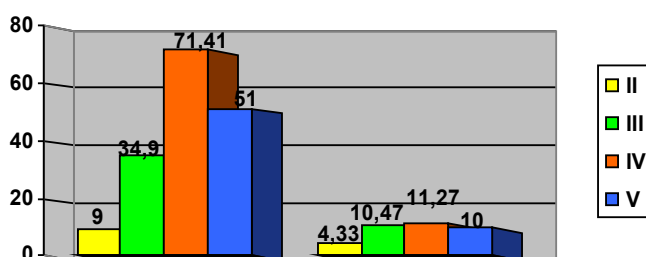


Figura IV.17: Relación del nivel de Clark con la DMV y la DVL intratumorales

La densidad de vasos peritumorales presentó valores similares, sin ninguna relación con el nivel de Clark.

El número de vasos linfáticos intratumorales se encontró incrementado de forma significativa ($p= 0,019$) en los casos que presentaban ulceración (tabla IV.5), no siendo significativo el resto de los parámetros. No obstante, la media de valores de DMV y DVL, tanto intratumorales como peritumorales, fue mayor siempre en las lesiones ulceradas.

Tabla IV.5: Ulceración y DMV o DVL intratumorales y peritumorales

Ulceración		Nº casos	Media	Desv. típ	sig
DMV intratumorales	si	11	62,18	30,57	0,098
	no	39	40,34	39,53	
DVL intratumorales	si	11	15,27	10,02	0,019
	no	39	8,30	7,95	
DMV peritumorales	si	11	82,09	31,78	0,087
	no	39	62,92	32,09	
DVL peritumorales	si	11	18,36	7,10	0,600
	no	39	16,58	10,45	

En relación con la regresión, no se observaron diferencias significativas entre la DMV y la DVL ni intra ni peritumorales, salvo en el caso de la DVL intratumorales en la que se advirtió un significativo descenso del número de vasos linfáticos en relación con la presencia de regresión ($p=0,026$) (tabla IV.6).

Tabla IV.6: Relación de la regresión con la DMV y la DVL

Regresión		Nº casos	Media	Desv. típ	sig
DMV intratumorales	si	5	22,25	28,80	0,216
	no	45	47,28	38,86	

DVL intratumorales	si	5	1,6	2,07	0,026
	no	45	10,75	8,82	
DMV peritumorales	si	5	89,00	15,16	0,167
	no	45	65,28	33,23	
DVL peritumorales	si	5	9,80	7,15	0,083
	no	45	17,77	9,76	

Se observó un discreto aumento del número de microvasos (DMV), que no alcanzó valores significativos, en relación con la presencia de recidiva. Ese aumento si fue estadísticamente significativo ($p=0,001$) cuando se consideró la densidad de vasos linfáticos peritumorales (tabla IV.7).

Tabla IV.7: Relación de la DMV con la existencia de recidiva/metástasis.

Recidiva/metástasis		Nº casos	Media	Desv. típ	sig
DMV intratumorales	si	9	59,11	40,77	0,785
	no	41	42,12	37,83	
DVL intratumorales	si	9	81,00	34,11	0,945
	no	41	64,12	32,00	
DMV peritumorales	si	9	7,66	7,92	0,539
	no	41	10,31	9,04	
DVL peritumorales	si	9	22,88	15,34	0,001
	no	41	15,68	7,76	

2.2. Estudio de la expresión de VEGF y VEGF-C.

La expresión de VEGF en las células tumorales, macrófagos, infiltrado inflamatorio, estroma y vasos no demostró diferencias significativas en relación con el estado del ganglio centinela.

Se encontró una expresión claramente mayor de VEGF-C a nivel estromal en los casos con ganglio centinela positivo con respecto a los negativos, diferencia que fue estadísticamente significativa ($p<0,000$),

y que también se observó con la expresión de VEGF-C a nivel de los vasos peritumorales ($p=0,002$) (Figura IV.18).

La expresión de VEGF-C en las células tumorales, macrófagos, infiltrado inflamatorio no demostró diferencias significativas (tabla IV.8).

Tabla IV.8: expresión de VEGF-C en relación con el SLN

Variables		GCp Nº casos (%)	GCn Nº casos (%)	Sig
VEGF-C cel. tumorales	1	4 (40%)	17 (42,5%)	0,655
	2	3 (30%)	16 (40%)	
	3	3 (30%)	7 (17,5%)	
VEGF-C macrófagos	1	5 (50%)	12 (30%)	0,301
	2	4 (40%)	15 (37,5%)	
	3	1 (10%)	13 (32,5%)	
VEGF-C infiltrado inflamatorio	1	2 (20%)	22 (55%)	0,140
	2	4 (40%)	9 (22,5%)	
	3	4 (40%)	9 (22,5%)	
VEGF-C estromal	1	1 (10%)	33 (82,5%)	0,000
	2	4 (40%)	5 (12,5%)	
	3	5 (50%)	2 (5%)	
VEGF-C vascular	1	1 (10%)	28 (70%)	0,002
	2	5 (50%)	8 (20%)	
	3	4 (40%)	4 (10%)	

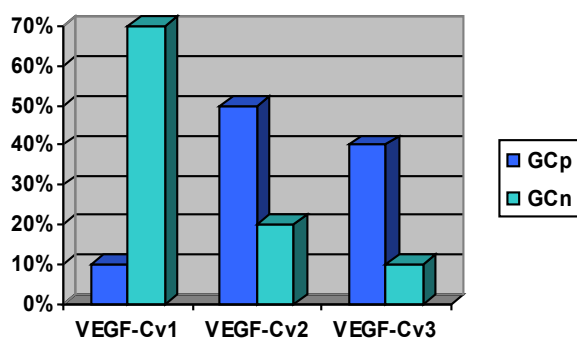
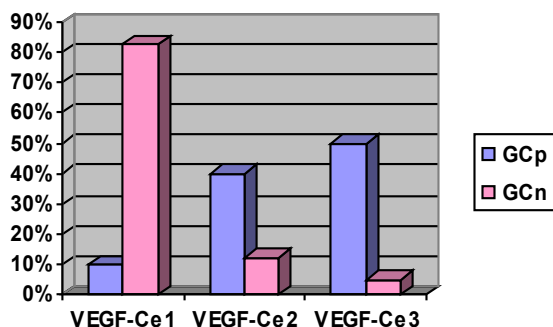


Figura IV.18: Relación de VEGF-C estromal y vascular con el estado del GC

Tanto la expresión de VEGF como de VEGF-C no mostraron diferencias significativas en relación con el tipo histológico, tipo de celularidad o espesor de Breslow. Sin embargo, cuando relacionamos la expresión de VEGF vascular con la existencia de recidiva de la enfermedad o presencia de metástasis a distancia, se observó que los casos que no habían sufrido recidiva presentaban valores significativamente más bajos de VEGF vascular que los que sí la tuvieron ($p=0,004$) (tabla IV.9). No se observaron otras diferencias en la expresión de VEGF ni de VEGF-C.

Tabla IV.9: expresión de VEGF en los vasos en relación con la presencia de recidiva/metástasis.

Recidiva	VEGF			Sig
	1 N°casos (%)	2 N°casos (%)	3 N°casos (%)	
Si	3 (33,3%)	2 (22,2%)	4 (44,4%)	0,004
No	28 (68,3%)	11 (26,8%)	2 (4,9%)	

Cuando comparamos el nivel de invasión de Clark con la expresión de VEGF (tabla IV.10) y VEGF-C se encontraron diferencias significativas, observándose valores mayores de expresión de VEGF en células tumorales ($p=0,022$), en el estroma ($p=0,000$) y a nivel vascular ($p=0,002$) cuanto mayor era el nivel de invasión del tumor (Imagen IV.19). Igualmente, VEGF-C estromal se relacionó con éste parámetro ($p=0,05$) (tabla IV.11).

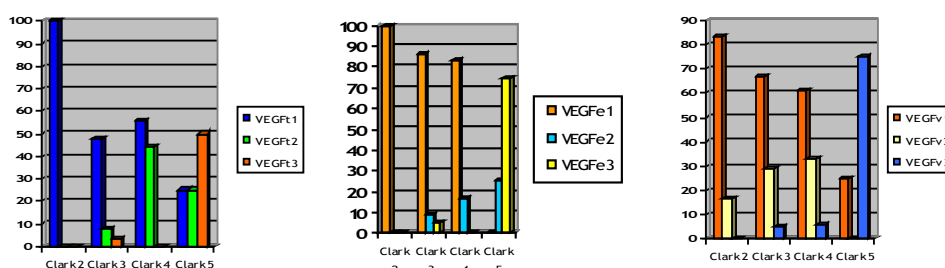


Figura IV.19: Relación del índice de Clark con el VEGF tumoral, estromal y vascular

Tabla IV.10: expresión de VEGF en relación con el nivel de invasión de Clark

Variables		Clark				Sig
		2 N°casos (%)	3 N°casos (%)	4 N°casos (%)	5 N°casos (%)	
VEGF tumoral	1	6 (100%)	10 (47,6%)	10 (55,6%)	1 (25%)	0,022
	2	0 (0%)	8 (38,1%)	8 (44,4%)	1(25%)	
	3	0 (0%)	3 (14,3%)	0 (0%)	2 (50%)	
VEGF estromal	1	6 (100%)	18 (85,7%)	15 (83,3%)	0 (0%)	0,000
	2	0 (0%)	2 (9,5%)	3 (16,7%)	1 (25%)	
	3	0 (0%)	1 (4,8%)	0 (0%)	3 (75%)	
VEGF vascular	1	5 (83,3%)	14 (66,7%)	11 (61,1%)	1 (25%)	0,002
	2	1 (16,7%)	6 (28,6%)	6 (33,3%)	0 (0%)	
	3	0 (0%)	1 (4,8%)	1 (5,6%)	3 (75%)	

Tabla IV.11: expresión de VEGF-C estromal en relación con el nivel de Clark

Clark	VEGF-C estromal			Sig
	1 N°casos (%)	2 N°casos (%)	3 N°casos (%)	
2	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0,054
3	15 (71,5%)	2 (9,5%)	4 (19%)	
4	11 (61,1%)	6 (33,3%)	1 (5,6%)	
5	2 (50%)	0 (0%)	2 (50%)	

Así mismo, se observó una mayor expresión de VEGF a nivel estromal ($p=0,028$) y vascular ($p=0,019$) cuando la lesión se encontraba ulcerada (tabla IV.12).

Tabla IV.12: expresión de VEGF estromal en relación con la presencia de ulceración.

Variables		Ulceración		Sig
		Si N°casos (%)	No N°casos (%)	
VEGF estromal	1	7 (63,6%)	3 (84,6%)	0,028
	2	1 (9,1%)	5 (12,8%)	
	3	3 (27,3%)	1 (2,6%)	
VEGF vascular	1	5 (45,5%)	26 (66,7%)	0,019
	2	2 (18,2%)	11 (28,2%)	
	3	4 (36,4%)	2 (5,1%)	

El índice de proliferación celular no mostró relación con el nivel de expresión de VEGF ni VEGF-C en ninguna de sus localizaciones.

2.3. Estudio de la expresión de VEGF y VEGF-C en relación con la DMV y la DVL.

Se observó un discreto aumento del número de microvasos intratumorales en relación con la intensidad de expresión de VEGF en las células tumorales, que no alcanzó niveles significativos. El número de microvasos peritumorales no mostró ninguna relación con la expresión tumoral de VEGF.

El número de vasos linfáticos intratumorales y peritumorales también presentó unos valores similares en los distintos niveles de expresión de VEGF por parte de las células tumorales.

La expresión de VEGF en los macrófagos encontrados no se correlacionó con la DVL ni la DMV intratumorales ni peritumorales.

La DMV intratumoral, al igual que la DVL intratumoral y peritumoral (tabla IV. 13) mostraron una tendencia creciente en consonancia con el incremento de los niveles de expresión de VEGF en las células inflamatorias. Este aumento sólo alcanzó niveles significativos con la DVL peritumorales ($p=0,008$). La densidad de microvasos peritumorales no mostró ninguna relación con la expresión de VEGF a nivel de células inflamatorias.

Tabla IV.13: DVL y expresión de VEGF en infiltrado inflamatorio

VEG F	Nº casos	DVL intratumorales			DVL peritumorales		
		Media	Desv típ	Sig	Media	Desv típ	Sig
1	45	9,26	8,66	0,324	15,60	8,70	0,008
2	4	13,75	10,71		29,00	12,72	
3	1	20,00	-		31,00	-	

Los niveles de expresión de VEGF estromal, no se correlacionaron con la DMV ni con la DVL, si bien se observaron valores superiores en el recuento de microvasos intratumorales cuando los niveles de VEGF estromales eran mayores, pero sin alcanzar valores significativos.

Del mismo modo, los valores de expresión de VEGF en los vasos no se relacionaron con el número de microvasos ni con la densidad de vasos linfáticos. Tan sólo se observó un discreto aumento de la DMV peritumoral al incrementarse la expresión de VEGF en células endoteliales.

La expresión de VEGF-C en las células de melanoma no mostró relación con el número de microvasos ni con el número de vasos linfáticos intratumorales, pero se observó un descenso de VEGF-C cuando aumentaban tanto la DMV como la DVL peritumorales. Esa diferencia alcanzó valores próximos a la significación estadística en el caso de la DMV ($p=0,05$) (tabla IV. 14).

Tabla IV.14: DMV y expresión de VEGF-C en células tumorales

VEGF -C	Nº caso s	DMV intratumorales			DMV peritumorales		
		Media	Desv típ	Sig	Media	Desv típ	Sig
1	21	52,09	44,35	0,426	76,09	32,23	0,053
2	19	35,94	33,57		68,61	31,92	
3	10	47,60	33,57		46,10	28,05	

Por otro lado, la expresión de VEGF-C en los macrófagos no correlacionó con la DMV, ni con la DVL.

En cuanto a la expresión de VEGF-C en el infiltrado inflamatorio, tampoco se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupo.

La expresión de VEGF-C estromal no mostró relación significativa, con el número de vasos, tanto sanguíneos como linfáticos, encontrados dentro del tumor y en las áreas peritumorales.

No se observaron diferencias significativas en la expresión de VEGF-C respecto a la DMV y DVL intratumorales.

V. DISCUSIÓN

1. Aspectos metodológicos

En este estudio retrospectivo se han recogido todos los casos de melanoma cutáneo con estudio de ganglio centinela registrados en nuestro hospital entre los años 2001-2004 (50 casos). La muestra es homogénea ya que los criterios de inclusión son rigurosos:

- espesor tumoral de Breslow mayor de 1mm
- no evidencia clínica ni radiológica de afectación de ganglios linfáticos
- no metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

Determinación de la microvasculatura linfática

Ya en el año 1986 Witte, MH y Witte, CL comienzan a hablar de la linfangiogénesis en relación con diferentes desórdenes del sistema linfático (*Witte MH y Witte CL, 1986*). En el año 1990, Fallowfield y Cook estudiaron 21 melanomas cutáneos tratando de demostrar la existencia de linfangiogénesis tumoral, pero concluyen en su trabajo que no existía linfangiogénesis en el melanoma cutáneo y que los escasos vasos linfáticos que se podían observar eran restos de vasos dérmicos atrapados por el crecimiento tumoral (*Fallowfield ME y Cook MG, 1990*). De Waal et al llegan a la misma conclusión en el año 1997 tras estudiar 27 melanomas cutáneos y 18 muestras de piel normal (*De Waal RM et al, 1997*).

En estos trabajos se utilizan diferentes métodos para marcar los vasos linfáticos. Fallowfield y Cook utilizan una doble tinción con

UEA1 y un anticuerpo monoclonal anti colágeno tipo IV. De Waal y colaboradores utilizan un doble marcaje con CD31⁺ y PAL-E⁻. En ambos casos se trata de marcadores linfáticos no específicos, aunque ya desde 1999 se conocía el anti-LYVE-1 como anticuerpo específico de vasos linfáticos (*Banerji et al, 1999*).

Hasta el año 2001 no se empieza a trabajar con modelos animales, tratando de demostrar los mecanismos moleculares que actúan en la linfangiogénesis tumoral así como aquellos que pueden afectar a la diseminación y formación de metástasis en tumores sólidos. Swartz MA y Skobe M, 2001; Stacker S et al, 2002; He Y et al, 2004; *Harrell MI, Iritani BM y Ruddell A, 2007*). Son numerosos los autores que han estudiado la expresión de VEGF-C, VEGF-D, VEGFR-3, así como la densidad de vasos linfáticos intratumorales y peritumorales presentes en tumores primarios de diferentes localizaciones, para establecer su relación con la supervivencia y su potencial de producir metástasis (*Schacht V et al 2005; Kitadai Y et al 2005; Franchi A et al 2004; Kyzas PA et al 2005; Choi1 WWL et al 2005; Nakamura Y et al 2005; Jennbacken K et al 2005; Zeng Y et al 2005; Ueda M et al 2005; Suzuki K et al 2005; Yasuoka H et al 2005*). Dicha relación, que parece estar clara en tumores como el carcinoma de mama y el carcinoma gástrico, entre otros, muestra discrepancias, en el caso del melanoma, en la bibliografía existente.

En la actualidad se conocen varios anticuerpos monoclonales específicos para el marcaje, mediante inmunohistoquímica, de los vasos linfáticos.

- La proteína Prox-1 es una proteína necesaria para la regulación del desarrollo de los vasos linfáticos a partir de las venas embrionarias. Posee localización nuclear por lo que no es el marcador más adecuado para la cuantificación de vasos sanguíneos.
- Aunque LYVE-1 ha demostrado ser válido para diferenciar vasos linfáticos de vasos sanguíneos en secciones histológicas, se ha publicado que la expresión de LYVE-1 en vasos linfáticos puede presentar un nivel bajo de expresión, por ejemplo, en respuesta a inflamación y está ausente en algunos linfáticos asociados a tumor. Además LYVE-1 se expresa también en células de tipo macrofágico presentes en tejidos inflamatorios y en infiltrados tumorales.
- VEGFR-3 se expresa predominantemente en células endoteliales linfáticas en tejidos adultos. Pero no es un marcador fiable para diferenciar entre endotelio vascular sanguíneo y linfático en la vascularización proliferante de los carcinomas.
- Podoplanina es una glicoproteína de la superficie celular específica del endotelio vascular linfático. D2-40 es un nuevo anticuerpo monoclonal que identifica específicamente la proteína de fusión de la podoplanina Fc (320). Hasta el momento, es el marcador linfático más fidedigno con una alta especificidad y sensibilidad.

En un estudio reciente, Van der Auwera y cols (2005) han comparado la cuantificación de vasos linfáticos en el carcinoma de mama por inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales frente a LYVE-1, D2-40, podoplanina y Prox-1. Los resultados de su estudio

ponen de manifiesto que D2-40 es el anticuerpo monoclonal más adecuado para teñir los vasos linfáticos peri e intratumorales. Hecho que queda recogido en el Primer Consenso Internacional de la metodología para la cuantificación de la linfangiogénesis en tumores sólidos humanos (2006).

De acuerdo con la literatura estudiada hemos determinado la linfangiogénesis en las zonas calientes o "hot spot" y separadamente en el centro del tumor (2 hot spot intratumorales) y en el tejido sano adyacente

(2 hot spot peritumorales) (*Straume O et al 2003; Shields JD et al 2004; Giorgadze TA et al 2004; Dadras SS et al 2005; Sahni D et al 2005*).

Hemos utilizado el análisis por digitalización de imagen con la finalidad de realizar una cuantificación de la densidad microvascular que supere los métodos tradicionales basados en el recuento de vasos a través de la microscopía óptica, tratando de disminuir de esta forma el error humano y aumentando especificidad.

2. Factores pronósticos convencionales.

Al realizar el análisis de los factores pronósticos convencionales observamos en nuestra serie, al igual que en la literatura (*Armstrong BK y English DR 1992*), un predominio de estos tumores en mujeres, tanto en los casos con GCp (25 y 15 casos respectivamente) como en los casos con GCn (7 y 3 respectivamente).

La edad de presentación de melanomas con GCn, en nuestra serie, correspondió, fundamentalmente, a pacientes mayores de 35 años (80%), diferencia que no se puso de manifiesto en los casos con GCp. Estos resultados son contradictorios con los de *Sondak K et al (2004)* que encuentran mayor frecuencia de tumores con GCn en pacientes mayores. No obstante, para algunos autores como *Levine J et al (1981)* los pacientes de mayor edad suelen presentar peor pronóstico lo que atribuyen a espesores tumorales mayores y por tanto un pronóstico desfavorable.

Los melanomas de nuestra serie, en concordancia con los resultados obtenidos por otros autores (*Franceschi S y Cristofolini M 1992*), están localizados habitualmente en las extremidades y el tronco, independientemente del estado del GC.

El tipo histológico más frecuente fue el MES, constituyendo el 70% del total de las lesiones, dato que coincide con la literatura (*Clark WH et al 1986; Mendiola M 1994; Garbe C et al 1995; Milo Y et al 1995; Ordóñez A et al 1994*). Pero si separamos los casos estudiados según el estado del ganglio centinela, podemos observar que en los

casos con GCp el tipo histológico más frecuente fue el MN (60% de los casos), lo cual se corresponde con el peor pronóstico de estas lesiones frente al resto de los tipos, como introdujo Clark en 1969 (*Clark WH et al 1969*). Dadras SS et al (2005) también recogen en su trabajo un mayor número de melanomas nodulares con GCp frente a los de extensión superficial y lentiginoso acral.

En nuestra serie existía una mayor frecuencia de los niveles de invasión III y IV, que resultó independiente del estado del GC. No obstante, se observó un mayor porcentaje de lesiones con nivel V de Clark en las lesiones con GCp (20%, frente al 5% de lesiones con GCn). Dadras SS et al (2005), en un estudio de 45 pacientes, han encontrado igualmente influencia del nivel de Clark sobre la positividad del GC: del total de melanomas con niveles de invasión de Clark I-III (19), el 84% presentaban GCn y el 16% GCp.

Por otra parte, la mayoría de los autores están de acuerdo en que el significado pronóstico del nivel de Clark deriva de su correlación secundaria con el espesor tumoral (*Maitte JC, 1983; Blois MS, 1983; Vilmer C et al, 1996*).

El espesor tumoral es el único factor pronóstico que se considera, de manera independiente, predictor del estado de los ganglios linfáticos a los que drena el tumor. Varios autores han estudiado su relación con el ganglio centinela. Sondak VK et al (2004), en un análisis multivariante encuentran asociación entre el estado del ganglio centinela y el espesor tumoral, la tasa de mitosis y la edad de los pacientes. Concluyen su trabajo recomendando el estudio del

ganglio centinela a todos los pacientes con espesor tumoral menor o igual a 1mm, elevada tasa mitótica y edad joven (inferior a 35 años). Un trabajo de similares características realizan Thompson JF y Shaw HM (2004) corroborando el modelo de Sondak. Sin embargo, en el año 2008, Niakosari F et al publican un estudio de 96 casos en el que no encuentran relación significativa entre el Breslow y el estado del ganglio centinela, de manera independiente, en el análisis multivariante. Otros autores (Paek SC et al, 2007; Dadras SS et al, 2005) también advierten relación entre el espesor tumoral y el estado del ganglio centinela en sus estudios.

En nuestro trabajo se observó que en el 30% de las lesiones que presentaban GCp, el índice de Breslow era inferior a 1,5mm, frente al 70% de las lesiones con espesores tumorales superiores a 1,5mm. En los casos con GCn no se ponía de manifiesto dicha diferencia, teniendo el 55% lesiones con espesores inferiores a 1,5mm y el 45% lesiones con Breslow superior a 1,5mm.

Al estudiar el tipo celular se observó que el *tipo común* era el más frecuente (60% de los casos). En relación con el estado del GC, el tipo celular epitelioides alcanzó el 30% en los casos con GCp, mientras que en el tipo fusocelular sólo 1 de 9 casos fue GCp. Este hecho podría estar relacionado con el mejor pronóstico asociado al tipo fusocelular observado por otros autores (Márquez AJ, 1999).

La ulceración es considerada para muchos autores como un factor de mal pronóstico (Mc Mover VF et al 1983), con un importante descenso de la supervivencia evidente a los 5 años (Balch CM et al

1980). En nuestra serie se observó un mayor número de lesiones ulceradas entre los casos con ganglio centinela positivo (40%) que en los negativos (18,5%), pero no se obtuvo una relación significativa entre la presencia de ulceración y el estado del ganglio centinela.

Para algunos autores la ausencia de regresión se asocia de manera significativa con la positividad del GC (*Paek SC et al, 2007*). Otros advierten las mismas diferencias pero sin alcanzar niveles de significación estadística (*Sondak VK et al, 2004*). La presencia de regresión, en nuestro trabajo, tan sólo se observó en cinco de los cincuenta casos estudiados y todos ellos correspondían a casos con GCn. Ninguno de los casos con GCp presentaron este tipo de alteración.

Clark et al consideran un factor pronóstico independiente, de buen pronóstico, la presencia de un infiltrado inflamatorio linfocitario de características infiltrantes (*Clark WR et al 1989*) entre las células tumorales. La presencia de infiltrado inflamatorio linfocitario fue una constante en casi todos los casos de nuestra serie (90%), pero fue preferentemente intenso en los casos con GCn y leve en los casos con GCp. Taylor RC et al (2007) comprobaron en su trabajo que la ausencia de infiltrado linfocitario se relacionaba con ganglios centinelas positivos, mientras que, cuando el infiltrado era intenso aumentaba la probabilidad de encontrar un GCp.

La cuantificación de ki67 en el melanoma es reconocida como factor pronóstico en numerosos trabajos, encontrándose, en algunas series, niveles de ki67 elevados en pacientes con mayor número de metástasis e incluso con mayores índices de mortalidad (*Soyer HP 1991; Gerdes J 1990; Ramsay JA et al 1995*). Este dato también se puso de manifiesto

en nuestra serie, en la que observamos un elevado índice de proliferación celular en el 60% de los casos con GCp frente al 28,2% de los casos con GCn.

3. Angiogénesis y linfangiogénesis en el melanoma primario.

Estudios recientes han correlacionado la expresión de VEGF-C con la localización de las metástasis de melanoma en ganglios linfáticos y, comparando ésta con la expresión de VEGF-C en el tumor primario, sugiriéndose que puede ser utilizado como factor predictivo de la presencia de metástasis por vía linfática y seleccionar a los pacientes en los que la terapia antiangiogénica pueda resultar más efectiva.

Schietroma C et al (2003) en un estudio inmunohistoquímico de 21 melanomas primarios y sus metástasis observan que la expresión de VEGF-C se correlaciona con la localización de las metástasis de melanoma en los ganglios linfáticos y que la expresión de VEGF-C en el tumor primario de la piel puede ser predictivo de la diseminación metastásica a ganglios linfáticos.

Dadras SS et al (2005) estudian un grupo de 45 pacientes con melanoma, de los que 27 presentan el ganglio centinela libre de enfermedad y 18 presentan metástasis. Estos autores concluyen que las células tumorales contribuyen a la producción de VEGF-C y por tanto a la linfangiogénesis tumoral, además de que dicha linfangiogénesis tumoral se correlaciona con el estado del ganglio centinela. La relación entre VEGF-C y el estado del GC también se ha puesto de manifiesto en nuestro trabajo cuando estudiamos la

expresión de VEGF-C en el estroma y células endoteliales, con un aumento de expresión en los casos que presentaban metástasis en el ganglio centinela. Sin embargo, dicha relación no se observó con las células tumorales. Massi D et al tampoco encontraron relación entre la expresión de VEGF-C en las células tumorales y el estado del ganglio centinela (*Massi D et al 2006*).

Del mismo modo no se observaron diferencias con la expresión de VEGF y el estado del ganglio centinela, pero, cuando relacionamos la expresión de VEGF con la presencia de recidiva/metástasis a distancia, constatamos que los casos que no las presentaban tenían valores significativamente más bajos de VEGF en vasos que los casos que si mostraban recidiva/metástasis a distancia.

Se observó un aumento tanto del número de microvasos como de vasos linfáticos intratumorales en consonancia con el aumento de los niveles de expresión de VEGF, que no alcanzó niveles de significación estadística. Paradójicamente, se advirtió un claro descenso de la expresión de VEGF-C en las células tumorales cuando se alcanzaban los mayores valores de densidad de microvasos y de vasos linfáticos.

En relación a la densidad de vasos linfáticos, la literatura muestra datos contradictorios. Mientras que algunos autores afirman que la linfangiogénesis en el melanoma primario, y fundamentalmente el área vascular linfática, puede predecir el estado del ganglio centinela (*Dadras 2005; Massi 2006*), otros aseguran que el aumento de la densidad de vasos linfáticos se relaciona con menor número de metástasis en ganglios linfático y un mejor pronóstico (*Straume O et*

al 2003; Wobser M et al 2006). Este mismo hallazgo fue descrito por Birner P et al en relación al carcinoma cervical en estadios precoces (Birne P et al 2001).

En nuestro estudio hemos observado un aumento tanto de la DVL como de la DMV intratumorales en los melanomas con mayor espesor de Breslow y mayor nivel de invasión de Clark, lo cual confirma la necesidad por parte del tumor de producir vasos sanguíneos y linfáticos para poder crecer. No obstante, en su relación con el estado del GC, hemos encontrado un discreto aumento en el número de vasos linfáticos tanto intra como peritumorales en los casos con GCp respecto a los negativos (DVL intratumorales: 9,02 en GCn y 13,10 en GCp; DVL peritumorales: 15,75 en GCn y 21,90 en GCp), pero estas diferencias no alcanzaron valores estadísticamente significativos. Sin embargo, el aumento de vasos linfáticos peritumorales sí mostró niveles de significación estadística cuando estudiamos la relación de esta con la existencia de recidiva/metástasis a distancia. Dadrás SS et al (2005) realizan un estudio con 45 melanomas cutáneos y sus ganglios centinelas donde estudian la extensión de la linfangiogénesis y como ésta puede predecir las metástasis en el ganglio linfático centinela. De él concluyen que la extensión de la linfangiogénesis tumoral es un marcador pronóstico altamente sensitivo y específico de metástasis en ganglio centinela, y que la valoración de la linfangiogénesis en el melanoma primario puede ser más efectiva que las técnicas convencionales de medición del espesor tumoral (Breslow), para seleccionar pacientes con enfermedad metastásica precoz, para tratamiento agresivo (Dadrás SS et al, 2005). Sin embargo, Sahni D et al (2005) realizan un estudio con 36 pacientes (18 con ganglio centinela

positivo y 18 negativo) para intentar establecer si el número o la distribución de los vasos linfáticos en el tumor primario se correlaciona con el estado del ganglio centinela, y observan que el conteo de los vasos linfáticos no puede predecir el potencial metastatizante del melanoma y por tanto no puede sustituir a la biopsia de ganglio linfático centinela (*Sahni D et al, 2005*).

VI. CONCLUSIONES

La afectación neoplásica del GC es más frecuente entre los melanomas con tipo histológico nodular, ulceración, espesor tumoral mayor de 1,5mm, leve infiltrado inflamatorio y elevado índice de proliferación, mientras que la ausencia de metástasis en el GC se asocia, preferentemente, al tipo celular fusiforme, ausencia de ulceración, presencia de regresión, intenso infiltrado linfocitario y bajo índice de proliferación celular. No obstante, ninguno de estos parámetros, por si mismo o en combinación con otros, son suficientes para predecir con fiabilidad el estado del GC.

- Tanto la expresión de VEGF en las células tumorales del melanoma, como la linfangiogénesis inducida por el mismo, aunque no se relacionan con la afectación del GC, pueden servir como factores predictivos de la aparición de recidiva (local) o metástasis.
- A medida que aumenta el espesor tumoral en el melanoma se incrementa la densidad de microvasos y de vasos linfáticos, acorde con las necesidades crecientes de aporte de nutrientes y de recogida de desechos imprescindible para el crecimiento tumoral.
- En el melanoma, el estroma y las células endoteliales juegan un papel importante en el crecimiento y diseminación tumoral mediante la liberación de factores de crecimiento vascular, como VEGF-C, lo que favorece la diseminación linfática y la afectación del ganglio centinela.

VI. BIBLIOGRAFÍA

Ackerman AB, Godomski J. neurotropic malignant melanoma and other neurotropic neoplasms in the skin. *Am J Dermatopathol* 1984; 1: 63-80.

Adami HO, Thorn M, Bergstrom R. Melanoma in pregnancy. *Lancet* 1991; 337: 1164-1165.

Alex JC, Krag DN. Gamma probe guided lymph node localization of lymph node. *Surg Oncol* 1993; 2: 137-143.

Alex JC, Weaver DL, Fairbank JT et al. Gamma-probe guided lymph node localization in malignant melanoma. *Surg Oncol* 1993; 2: 303-308.

Aloi FG, Corvelizza S, Pippione M. Balloon cell melanoma: a report of two cases. *J Cutan Pathol* 1988; 15: 230-233.

Al-Ravi MAA, Mansel RE and Jiang WG. Lymphangiogenesis and its role in cancer. *Histol Histopathol* 2005; 20: 283-298.

Al-Rawi MMA, Mansel RE, Jiang WG. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. *EJSO* 2005; 31, 117-121.

Amaya H, Tanigawa N, Luc C, et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis, survival and thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression in human colorectal cancer. *Cancer Lett* 1997;119: 227-35.

Amer MH, Al-Sarraf M, Baker LH et al. Malignant melanoma and central nervous system metastases. Incidence, diagnosis, treatment and survival. *Cancer* 1978; 42: 660-668.

Andersen K, Nesland JM, Holm R et al. Expresión of S100A4 combined with reduced E-cadherin expresión predicts patient outcome in malignant melanoma. *Modern Pathol* 2004; 17:990-997.

Anstey A, Cerio R, Ramnarain N et al. Desmoplastic malignant melanoma. An immunocytochemical study of 25 cases. *Am J Dermatopathol* 1994; 16: 14-22.

Armstrong BK, English DR. Epidemiologic studies. En: Balch CM, Milton GW, Soong S et al (Eds). *Cutaneous melanoma*. Philadelphia: JB Lippincott; 1992.

Armstrong BK, Kricger A. Cutaneous melanoma. *Cancer Surv* 1994; 19:219-240.

Armstrong BK. Epidemiology of malignant melanoma: intermittent or total accumulated exposure to the sun?. *J Dermatol Surg Oncol* 1988; 14:835-849.

Auter P, Dore GF, Gefeller O. Melanoma risk and residence in sunny areas. EORTC Melanoma Co-operative Group. EORTC. *Br J Cancer* 1997; 76:1521-1524.

Azzola MF, Shaw HM, Thompson Jf et al. Tumor mitotic rate is a more powerful prognostic indicator than ulceration in patients with primary cutaneous melanoma: an analysis of 3661 patients from a single center. *Cancer*. 2003; 97: 1488-1498.

Baak JP y Tan CJ. The adjuvant prognostic value of nuclear morphometry in stage I malignant melanoma of the skin: A multivariate analysis. *Anal Quant Cytol Histol* 1986;8: 241-244.

Balch CM, Murad TM, Soong SJ et al. Tumor thickness as a guide to surgical management of clinical stage I melanoma patient. *Cancer* 1979;43: 883-888.

Balch CM, Wilkerson JA et al. The prognostic significance of ulceration of Cutaneous melanoma. *Cancer* 1980; 45:3012-3017.

Banerji et al. LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-specific Receptor for Hyaluronan. *JCB* 1999; 144(4): 789-801.

Barnhill RL. Tumor of melanocytes. En: Raymond L Barnhill (Eds). *Textbook of Dermatopathology*. USA: The Mc Graw-Hill Companies; 2004.

Barnhill RL, Mihm MC. The histopathology of Cutaneous malignant melanoma. *Seminars in Diagnostic Pathology* 1993; 10: 47-75.

Barrer BO, Acton RT, Soong SJ et al. Increase of HLA-DR4 in melanoma patients from Alabama. *Cancer Res* 1982; 42: 4276-4279.

Barzilai A, Goldberg I, Yulash M et al. Silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as a prognostic value in malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 1998;20: 473-477.

Bataille V. Genetic epidemiology of melanoma. *Eur J Cancer* 2003 Jul; 39: 1341-1347.

Bedrosian I, Scheff AM, Mick R et al. ^{99m}Tc-human serum albumin: an effective radiotracer for identifying sentinel lymph nodes in melanoma. *J Nucl Med* 1999; 40: 1143-1148.

Benda JA. Neurotropic desmoplastic melanoma of the vulva. *Gynecol Oncol* 1997; 64: 180.

Ben-Izhak O, Stark P, Levy R, Bergman R, Lichtig C. Epithelial markers in malignant melanoma. A study of primary lesions and their metastases. *Am J Dermatopathol*. 1994;16: 241-246.

Beral V, Evans S, Shaw H et al. Cutaneous factor related to the risk of melanoma. *Br J Dermatol* 1983; 109: 165-172.

Berman CG, Norman J, Cruse W Reintgen DS, Clark RA. Lymphoscintigraphy in malignant melanoma. *Ann Plast Surg* 1992; 28: 29-32.

Bhuta S. Electrón microscopy in the evaluation melanocytic tumors. *Semin Diagn Pathol* 1993; 10: 92-101.

Birne P, Schindl M, Obermair A et al. Lymphatic microvessel density as a novel prognostic factor in early-stage invasive cervical cancer. *Int. J. Cancer.* 2001; 95:29-33.

Bisceglia M, Carosi I, Lelli G, et al. Clear cell sarcoma of soft tissues. Clinico-pathological and ultrastructural analysis of a case in a neck region and a literature review. *Pathologica* 1998; 90: 391-396.

Blaheta HJ, Schitteck B, Breuninger H et al. Detection of melanoma micrometastasis in sentinel node by reverse transcription-polymerase chain reaction correlates with tumor thickness and is predictive of micrometastatic disease in lymph node basin Recent. *Am J Surg Pathol.* 1999; 23: 822-828.

Blois MS, Sagebiel RW et al. Judging prognosis in malignant melanoma of the skin. A problem of inference over small data set. *Ann Surg* 1983;198: 200-206.

Böni R, Matt D, Voetmeyer A et al. Chromosomal allele loss in primary cutaneous melanoma is heterogeneous and correlates with proliferation. *J Investig Dermatol* 1998; 3: 215-217.

Bostick PJ, Morton DI, Tuner RR et al. Prognostic significance of occult metastases detected by sentinel lymphadenectomy and reverse transcriptase-polymerase chain reaction in early-stage melanoma patient. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3238-3244.

Breslow A. Thickness, cross-sectioned area and depth of invasión in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; 172:902-908.

Briollais L, Chompret A, Guilloud-Bataille M et al. Genetics and epidemiological risk factors for a malignant melanoma-predisposing

phenotype: the great number of nevi. *Genet Epidemiol* 1996; 13:385-402.

Burnier Pereira F, Burnier MN Jr, Shibata H et al. Cytomorphometric parameters and the metastatic potencial of cutaneous and uveal melanoma: a comparison with prognostic factors. *Am J Dermatopathol* 2001; 23: 304-307.

Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 1977; 39: 456-466.

Cabra B, Herrera E, Marquez AJ, et al. Myxoid malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 1998; 6: 17.

Cafiero F, Peressini A, Gipponi M et al. Sentinel node biopsy in patients with cutaneous melanoma. *Seminars in Surgical Oncology* 1998; 15: 284-286.

Caligo MA, Grammatico P, Cipollini G et al. A low NM23.H1 gene expression identifying high malignancy human melanomas. *Melanoma Res* 1994; 4: 179-184.

Camacho F y Castells A. Aspectos anatomofisiológicos cutáneos. Inmunología y dermatología. Mecanismos inmunológicos en dermatología. En: Tratado de dermatología. Armijo M, Camacho F. grupo Aula Médica, S.A. 1998; 1: 10-11.

Campbell SC, Volpert OV, Ivanovich M, Bouck NP. Molecular mediators of angiogenesis in bladder cancer. *Cancer Res* 1998;58: 1298-304.

Caputy G, Donohue JH, Goellner JR et al. Metastatic melanoma of the gastrointestinal tract. *Arch Surg* 1991; 126: 1353-1358.

Carbajo E, Carbajo S. AgNORs y proliferación celular. En: Sanpedro A, Carbajo E (Eds.). Bases de la proliferación celular y su aplicación en la práctica clínica. Oviedo: Universidad de Oviedo, 1994.

Carson KF, Wen DR, LI PX et al. Nodal nevi and cutaneous melanoma. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 834-840.

Cascinelli N, Belli F, Santimani M et al. Sentinel Lymph node biopsy in cutaneous melanoma: the WHO melanoma program experience. *An Surg Oncol* 2000; 7: 469-474.

Cassarino DS, Fullen DR, Sondak VK et al. Metastatic nevoid melanoma in a 4 $\frac{1}{2}$ -year-old child. *J Cutan Pathol* 2003; 30: 647-651.

Castel T, Baradad M et al. Epidemiología, etiología y biología del melanoma maligno. *JANO* 1991; 94:246-249.

Chalkley H. Method for the quantitative morphological analysis of tissues. *J Natl Cancer Inst* 1943; 3: 47-53.

Chi Hi, Uyeda Y, Umebayashi Y et al. Epitelioid cell melanomas have greater DNA ploidy abnormalities than spindle cell melanomas: cytological evidence for a higher malignant potential of the former. *Arch Dermatol Res* 1993; 285: 410-414.

Choi1 WWL, Lewis1 MM, Lawson1 D, et al. Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol* 2005; 18: 143-152.

Clarijs R, Schalkwijk L, Hofmann UB, Ruiter DJ and De Waal RMW. Induction of vascular endothelial growth factor receptor-3 expression on tumor microvasculature as a new progression marker in human cutaneous melanoma. *Cancer Research* 2002; 62; 7059-7065.

Clark WH, Elder DE, Van Horh M. The biologic forms of malignant melanoma. *Human Pathol* 1986; 17:443-450.

Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary malignant melanoma of the skin. *Cancer Res* 1969; 29: 705-726.

Clark WH, Reimer RR, Greene M. Origin of familial malignant melanoma from hereditary melanocytic lesions. *Arch Dermatol.* 1978; 114:732-733.

Clark WR Jr, Elder De et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81:1893-1904.

Clarkson KS, Sturdjess IC, Molyneux AJ. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). *J Clin Pathol.* 2001 ;54:196-200.

Cochran AJ, Lu HF, Li PX et al. S-100 protein remains a practical marker for melanocytic and other tumours. *Melanoma Res* 1993; 3: 325-330.

Cochran AJ, Wen DR, Morton DL. Occult tumor cells in the lymph nodes of patients with pathologic stage I malignant melanoma. An immunohistological study. *Am J Surg Pathol* 1988; 12:612-618.

Cohen C. Image cytometric analysis in Pathology. *Human Pathol* 1996; 27: 482-493.

Cohen LM. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33: 923-936.

Collins RJ. Melanoma in the Chinese of Hong-Kong. Emphasis on volar and subungueal sites. *Cancer* 1984; 54:1482-1484.

Colloby PS, West KP, Fletcher A. Is poor prognosis really related to HLA-DR expression by malignant melanoma cells?. *Histopathology* 1992; 20: 411-416.

Coloman WP, Loria PR, Red RJ, Krementz ET. Acral Lentiginous melanoma. *Arch Dermatol* 1980; 116: 773-776.

Cooley TP. Non-AIDS-defining cancer in HIV-infected people. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003;17: 889-899.

Cunnick GH, Jiang WG, Douglas-Jones T et al. Lymphangiogenesis and lymph node metastasis in breast cancer. *Mol Cancer* 2008;6:7-23.

Dadras SS, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P et al. Tumor lymphangiogenesis predicts melanoma metastasis to sentinel lymph node. *Mod Pathol* 2005;18:1232-1242

Dadras SS, Paul T, Bertoncini J et al. Tumor lymphangiogenesis. A novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003; 162: 1951-1960.

Daryanani D, Plukker JT, De Hulla JA et al. Pregnancy and early-stage melanoma. *Cancer* 2003; 97: 2248-2253.

Dauids V, Kidson SH and Hanekom GS. Melanoma patient staging: histopathological versus molecular evaluation of de ssentinel node. *Melanoma Res* 2003; 13: 313-324.

Day CL Jr, Harrist TJ, Lew RA et al. Classification of malignant melanoma according to the histologic morphology of melanoma nodules. *J Dermatol Surg Oncol* 1982; 8:874-875.

Day CL Jr, Lew RA et al. A multivariant análisis of prognostic factor for melanoma patients with lesion 3,65mm in thickness: the importante of revailing alternative cox models. *Ann Surg* 1982; 195: 44-49.

Day CL, Harrist TJ ,Gorstin F et al. Malignant melanoma pronostic significance of microscopic satellitesin the reticular dermis and subcutaneous fat. *Ann Surg* 1981; 194:108.

De Waal, RM et al. Lack of Lumphangiogenesisi in Human Primary Cutaneous Melanoma. *AJP.* 1997;150:1951-7.

Dhillon AP, Rode J. Patterns of staining for neurone specific enolase in benign and malignant melanocytic lesions of the skin. *Diagn Histopathol.* 1982;5:169-74.

Diaz-Cano S, Vicioso L, Alvarez M et al. Bases citométricas para el conocimiento biológico del crecimiento neoplásico. *Rev Esp Patol* 1990; 23: 95-97.

Drzewiecki KT, Christensen HE, Ladefoged C et al. Clinical course of cutaneous malignant melanoma related to histopathological criteria of primary tumour. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1980; 14:229-234.

Duncan LM, Deeds J, Hunter J et al. Down-regulation of the novel gene melastatin correlatos with potencial for melanoma metastasis. *Cancer Res* 1998; 58: 1515-1520.

Easty DJ, Maung K, Lascu et al. Expression of NM23 in human melanoma progression and metastasis. *Br J Cancer* 1996; 74: 109-114.

Egbert B, Kempson R, Sagebiel R. Desmoplastic malignant melanoma. A clinico-histopathologic study of 25 cases. *Cancer* 1988; 62: 2033-2041.

Elder DE, Elenitsas R, Janovsky C et al. Melanocytic tumors. En: Elder DE, Elenitsas R, Janovsky C (Eds.). *Lever`s Histopathology of the skin.* 8ª ed. Lippincott Raven, Philadelphia 1997.

Elder DE, Guerry D, Epstein MN et al. Invasive malignant melanoma lacking competente for metastasis. *Am J Dermatopathol* 1984; 6: 55-61

Elder DE, Murphy GF. Malignant tumors: Melanoma and related lesion. En: Elder DE, Murphy GF (Eds.). *Melanocytic tumor of the skin.* AFIP, Washington 1991.

Espinosa J, Bravo P, Sánchez J et al. Epidemiología y factores de riesgo. En: González Barón, Ordóñez Gallego A (Eds.). Melanoma. Masson, Barcelona 1998.

Essner R, Kuo CT, Wang H et al. Prognostic implications of p53 overexpression in Cutaneous melanoma from sun-exposed and nonexposed sites. *Cancer* 1998; 82: 309-316.

Fallowfield, ME, Cook, MG. Lymphatics in primary cutaneous melanoma. *Am J Surg Pathol.* 1990;14:370-4.

Fawcett, W. Ganglios linfáticos. En: Bloom-Fawcett (Eds.). Tratado de histología. Interamericana Mc Graw-Hill, México 1989.

Fernando SS, Johnson S, Bate J. Immunohistochemical analysis of cutaneous malignant melanoma: comparison of S-100 protein, HMB-45 monoclonal antibody and NKI/C3 monoclonal antibody. *Pathology.* 1994;26:16-9.

Florenes VA, Aamdal S, Myklebost O et al. Levels of nm23 messenger RNA in metastatic malignant melanomas: inverse correlation to disease progresión. *Cancer Res* 1992; 52: 6088-6091.

Franceschi S, Cristofolini M. Cutaneous malignant melanoma: epidemiological considerations. *Semen Surg Oncol* 1992; 8: 345-352.

Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor Lymphangiogenesis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. A Morphometric Study with Clinical Correlations. *Cancer* 2004; 5: 973-978.

Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Favorable prognosis for malignant melanomas Associated with acquired melanocytic nevi. *Arch Dermatol* 1983; 119:455-462.

Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Volume of malignant melanoma is superior to thickness as a prognostic indicator. *Dermatologic Clinics* 1991; 9:643-648.

Gallegos-Hernández JF, Aranda-Soto M, García R et al. linfadenectomía radioguiada del ganglio centinela en cáncer de mama. *Cir Ciruj* 2002; 70:339-345.

Gan BS, Colcleugh RG, Scilley CG et al. Melanoma arising in a chronic (Majolin's) ulcer. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32:1058-1059.

Garbe C, Bütter P et al. Primary Cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer* 1995; 75:2484-2491.

Garbe C, Orfanos CE. Epidemiology of malignant melanoma in Central Europe: risk factor and prognostic predictors. Result of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *Pigmented Cell Res* 1992; 2: 285-294.

Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol* 1990; 1: 199-206.

Ghiorzo p, Mantelli M, Gargiulo S et al. Inverse correlation between p16INK4A expression and NF-KappaB activation in melanoma progression. *Hum Pathol* 2004; 35: 1029-1037.

Giese T, Engstner M, Mansmann U et al. Quantification of melanoma micrometastasis in sentinel lymph nodes using Real-time RT-PCR. *J Invest Dermatol* 2005; 124: 633-637.

Giorgadze TA, Zhang PJ, Pasha T et al. Lymphatic vessel density is significantly increased in melanoma. *J Cutan Pathol* 2004; 31: 672-677.

Giuliano AE, Kirgan DM, Guenther JM, Morton DL. Lymphatic mapping and sentinel Lymphadenectomy for breast cancer. *Ann Surg* 1994, 220: 391-401.

Godoy JS and Gorski DH. Vascular endothelial growth factor-C mRNA expresión correlatos with stage of progresión in patients with melanoma. *Clin Cancer Research* 2003; 9: 5962-5967.

Goldstein AM, Toker MA. Genetic epidemiology of familial melanoma. *Dermatol Clin* 1995; 13: 605-612.

González C, García J, Márquez AJ, Rubio J, Matilla A. Melanoma de células claras. A propósito de un caso. *Rev Esp Patol* 1997; 1: 22.

Goodpasture C, Bloom SE. Visualisation of nucleolar organiser regions in mammalian chromosome using silver staining. *Chromosoma* 1975; 53: 37-50.

Goscin C, Glass LF, Messina JL. Pathologic examination of sentinel lymph node in melanoma. *Surg Oncol Clin N Am* 1999; 8: 427-434.

Goydos JS y Gorski DH. Vascular endothelial growth factor-C mRNA expresión correlatos with stage of progresión in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 5962-5967.

Guidi Aj, Fischer L, Harris JR, Schnitt SJ. Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86: 614-619.

Guillem V, Burriel C. Factores pronósticos en el melanoma maligno. *Rev Cancer* 1997; 11:100-104.

Hachisuka T, Narikiyo M, Yamada Y, et al. High lymphatic vessel density correlates with overexpression of VEGF-C in gastric cancer. *Oncol Rep* 2005; 13: 733-737.

Hahka PA, Muhonen T, Nordling S et al. DNA flow cytometry and the outcome of chemoinmunotherapy in metastatic melanoma. *Melanoma Res* 1997; 7: 329-334.

Halpern AC, Guerra D, Elder DE et al. Dysplastic nevi as risk markers of sporadic (non familial) melanoma. *Arch Dermatol* 1991; 127:995-999.

Harrell MI, Iritani BM and Ruddell, A. Tumor-Induced Sentinel Lymph Node Lymphangiogenesis and Increased Lymph Flow Precede Melanoma Metastasis. *AJP* 2007;170:774-786.

Hatta N, Fujimoto A, Takehara K, Takata M. Mapping of occult melanoma micrometastases in the inguina lymph node basin by immunohistochemistry and RT-PCR. *Melanoma Res* 1999; 9: 401-406.

He Y, Karpanen T, Alitalo K. Role of lymphangiogenic factors in tumor metástasis. *Biochimica et Biophysica acta* 2004; 1654: 3-12.

Healy E, Belgaid C, Takata M et al. Prognostic significance of allelic losses in primary melanomas. *Oncogene* 1998; 16: 2213-2218.

Hochberg M, Lotem M, gimon Z, Shilonis E, Enk CD. Expression of tyrosinase, MIA and MART-1 in sentinel lymph nodes of patients with malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2002; 146: 244-249.

Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R, Boni R, Dummer R. Tyrosinase immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *J Cutan Pathol.* 1998 ;25:204-209.

Holmes EC, Moseley HS, Morton DL et al. A racional approach to the surgical management of melanoma. *Ann Surg* 1977; 186: 481-490.

Hsu MY, Wheelock MJ, Jonson KR et al. Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1996; 1:188-194.

Hussein MR, Haemel AK, Word GS. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms. *J Pathol* 2003; 199: 275-288.

Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in preoperative biopsy specimens and metastatic foci of regional lymph nodes in submucosal gastric carcinoma. *World J Surg Oncol* 2005; 3:2-9.

Jennbacken K, Vallbo C, Wang W, Damber JE. Expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis. *Prostate* 2005; 9999: 1-7.

Johson DA, Yannuzzi IA, Shakin JL, Lightman DA. Lacquer cracks following laser treatment of choroidal neovascularization in pathological myopia. *Retina* 1998;18:118-24.

Jones RE Jr, Cash ME, Ackerman AB. In: Ackerman AB (Eds.). *Pathology of malignant melanoma.* New Cork: Masson Publishing Inc 1981: 93-106.

Kadota K, Huang CL, Liu D et al. The clinical significance of lymphangiogenesis and angiogenesis in non-small cell lung cancer patients. *Eur J Cancer* 2008;44:1057-1067.

Kamino H, Tam ST, Alvarez L. Malignant melanoma with Pseudocarcinomatous hyperplasia- an entity that can simulate squamous cell carcinoma. *Am J Dermatopathol* 1990; 12: 446-451.

Kang S, Barnhill RL et al. Histopatologic regresión in malignant melanoma: an interobserver concordance study. *J Cutan Pathol* 1993; 20:126-129.

Kao GF, Helwig EB, Graham JH. Balloon cell malignant melanoma of the skin. Aclinicopathologic study of 34 cases with histochemical,

inmunohistochemical, and ultrastructural observations. *Cancer* 1992; 15: 2942-2952.

Karjalainen S, Hakulinen T. Survival and prognostic factors of patients with skin melanoma. *Cancer* 1988; 62: 2274.

Karlsson M, Boeryd B, Carstensen J et al. DNA ploidy and S-phase in primary malignant melanoma as prognostic factors for stage III disease. *Br J Cancer* 1993; 67: 134-138.

Kart VL, Farmer RM, Dotters D. Focus on primary care: From nevus to neoplasm: myths of melanoma in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv.* 2002; 57: 112-119.

Keshtgar MRS, Eil JP. Sentinel lymph node detection and imaging. *Eur J Nucl Med* 1999; 26: 57-67.

Ketcham AS, Moffat FL, Balch CM. Classification and staging. En: Balch CM, Houghton AN, Milton GW, Sober AJ, Soong SJ (Eds.). *Cutaneous melanoma: clinical management and treatment results worldwide.* JB Lippincott, Philadelphia 1992.

Kiene P, Petres-Dunsche C, Fölster-Holst R. Pigmented pediculated malignant melanoma. A rare variant of nodular melanoma. *Br J Dermatol* 1995; 133: 300-302.

Kitadai Y, Kodama M, Cho S, Kuroda T, et al. Quantitative analysis of lymphangiogenic markers for predicting metastasis of human gastric carcinoma to lymph nodes. *Int J Cancer* 2005; 115: 388-392.

Korabiowska M, Cordon-Cardo C, Buschmann N et al. Comparison of DNA ploidy status and DNA ploidy-related parameters in malignant melanoma tissue microarrays and full sections. *Hum Pathol* 2004; 35: 887-891.

Krag D, Weaver D, Ashikaga T et al. The sentinel node in breast cancer. A multicenter validation study. *N Engl J Med* 1998; 339: 941-946.

Kroon BB, Bergman W, Coebergh JW et al. Second revised consensus skin melanoma. De Nederlandse Melanoom Werkgroep. *Ned Tijdschr Geneeskd* 1997; 7:2015-2019.

Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2005;206:170-177.

Langley RG, Sober AJ. A Clinical review of the evidence for the role of ultraviolet radiation in the etiology of cutaneous melanoma. *Cancer Invest* 1997; 15:561-567.

Lee Cs, Pirdas A, Lee MW. P53 in cutaneous melanoma: immunoreactivity and correlation with prognosis. *Australas J Dermatol* 1995; 12: 192-195.

Lee JY-Y, Kapadia SB, Muograre RH et al. Neurotropic malignant melanoma occurring in a stable burn scar. *J Cutan Pathol* 1992; 19:145-150.

Leiter U, Meier F, Schittek B et al. The Natural Course of Cutaneous Melanoma *Journal of Surgical Oncology* 2004;86:172-178.

Lemish WH, Herman PJ et al. Survival from preinvasive and invasive malignant melanoma in Western Australia. *Cancer* 1983; 52:580-585.

Lever WF, Schaumburg-Lever G. Melanoma maligno. En: Lever WF, Schaumburg-Lever G. *Lever`s Histopathology of the skin*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott company, 1990:729-750.

Levine J, Kopf AW, Rigel DS et al. Correlation of thickness of superficial spreading malignant melanoma and ages of patients. *J Dermatol Surg Oncol* 1981; 7: 311-316.

Lew RA, Sober AJ, Cook N et al. Sun exposure habits in patients with cutaneous melanoma: a case-control study. *J Dermatol Surg Oncol* 1983; 9:981-986.

Licatasa AG, Wilson LD, Braverman IM et al. Malignant melanoma and other second Cutaneous malignancies in Cutaneous T-cell lymphomas. *Arch Dermatol* 1995; 131:432-435.

Linehan DC, Hill ADK, Tran KN et al. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: unfiltered radioisotope is superior to filtered. *J Am Coll Surg* 1999; 188: 377-381.

López-Abente G, Pollán M, Aragonés N et al. Situación del Cáncer en España: incidencia. *An Sis Sanit Navar* 2004; 27: 165-173.

Lubach D, Lüdemann W, Berens D, et al. Recent findings on the angioarchitecture of the lymph vessel system of human skin. *Br J Dermatol* 1996; 135: 511-514.

Lukowsky A, Bellmann B Ringk A et al. Detection of melanoma micrometastases in the sentinel lymph node and in nonsentinel nodes by tyrosinase polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 1999; 113: 554-559.

Mac Lennan R, Green AC et al. Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1427-1432.

Mackie RM, Bufalino R, Morabito A et al. For the World Health Organisation Melanoma Programme. Lack of effect of pregnancy on outcome of melanoma. *Lancet* 1991; 337: 653-655.

Mackie RM. Clinical recognition of early invasive malignant melanoma. *BMJ* 1990; 301: 1005-1006.

Magnus K. Prognosis in malignant melanoma of the skin. Significance of the stage of disease, anatomical site, sex, age and period of diagnosis. *Cancer* 1977; 40: 389-397.

Maite JC. Primary cutaneous malignant melanoma. An análisis of the pronostic value of histologic characteristic. *J Am Acad Dermatol* 1983;8:857-863.

Marghoob AA, Slade J, Kopf AW et al. Risk of developing multiple primari cutaneous melanomas in patients with the classic atypical mole syndrome: a case control study. *Br J Dermatol* 1996; 78: 704-711.

Mariani G, Erba P, Manca G et al. Radioguided sentinel lymph node biopsy in patients with malignant cutaneous melanoma: a nuclear medicine contribution. *J Surg Oncol* 2004; 85: 141-151.

Márquez AJ. Analisis topográfico de la cinética y ploidía de ADn en el melanoma cutáneo y su relación con la supervivencia. Tesis doctoral. Málaga 1999.

Marrazzo A, Taormina P, Noto A, et al. Localization of the sentinel lymph node in breast cancer: prospective comparison of vital staining and radioactive tracing methods. *Chir Ital.* 2004; 56:621-627.

Massi D, Puig S, Franchi A et al. Tumour lymphangiogenesis ias a possible predictor of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: a case-control study. *J. Clin. Pathol.* 2006;59:166-173.

Mc Govern VJ, Shaw HM et al. Pronostic significance of the histological features of malignant melanoma. *Histopathology* 1979;3:385-393.

Mc Govern VJ. The classification of melanoma and its relationship with prognosis. *Pathology* 1970; 2:85-98.

Mc Mover VF, Shaw HM et al. Ulceration and prognosis in Cutaneous malignant melanoma. *Histopathology* 1983; 119:816-819.

McGover VJ. The classification of melanoma and its relationship with prognosis. *Pathology* 1970; 2: 85-98.

McGregor JM, Yu C, Dublin EA et al. P53 immunoreactivity in human malignant melanoma and dysplastic naevi. *Br J Dermatol* 1993; 128: 606-611.

Mckee PH, Marsden RA, Headington JT, MacKie RM. Malignant melanoma. En: Mckee PH, Marsden RA, Headington JT, MacKie RM (Eds.). *Pathology of the skin. Clinical correlations.* Lippincott, Philadelphia 1989.

McNutt NS, Urmacher C, Hakimain J et al. Nevoid malignant melanoma: morphologic patterns and immunohistochemical reactivity. *J Cutan Pathol* 1995; 22: 502-517.

Mendiola M. Melanoma maligno. Valoración pronóstica de factores clínicos y patobiológicos. Tesis doctoral. Málaga 1994.

Menzies SW, Mc Carthy WH. Complete regresión of primary Cutaneous malignant melanoma. *Arch Surg* 1997; 67:553-6.

Merkle T, Landthaler M, Eckert F, Braun-Falco O. Acral verrucous malignant melanoma in an immunosuppressed patient after Kidney transplantation. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 505-506.

Messina JL, Glass LF, Cruse CW et al. Pathologic examination of sentinel lymph node in malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:686-690.

Messina JL, Glass LF. Pathologic examination of sentinel lymph node. *J Fla Med Assoc* 1997; 84: 153-156.

Meyer HW, Gumpert SL. Malignant melanoma; appraisal of the disease and análisis of 105 cases. *Ann Surg* 1953; 138: 643-660.

Meyer LJ, Zone JH. Genetics of Cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 1994; 103:112s-116s.

Milo Y, Tamir G, Robinpour M, et al. Epidemiology and prognostic factors in Cutaneous malignant melanoma. *Harefuah* 1995; 76: 745-751.

Mooi WJ, Deenik W, Petersen JL, et al. Keratin immunoreactivity in melanoma of soft parts (clear cell sarcoma). *Histopathology* 1995; 27: 61-65.

Moretti S, Pinza C, Berti E et al. In situ expresión of transforming growth factor beta is Associated with melanoma progresión and correlatos with Ki-67, HLA-DR, and beta 3 integrin expresión. *Melanoma Res* 1997; 7: 313-321.

Morton DL, Wen DR, Wong JH et al. Technical detail of intraoperative mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992; 127: 392-399.

Murer K, Urosevic M, Willers J et al. Expression of Melan-A/MART-1 in primary melanoma cell cultures has prognostic implication in metastatic melanoma patients. *Melanoma Res.* 2004; 14: 257-62.

Nakamura Y, Yasuoka H, Tsujimoto M, et al. Lymph vessel density correlates with nodal status, VEGF-C expression, and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 91: 125-32.

Nakhleh RE, Wick MR, Rocamora A, Swanson PE, et al. Morphologic diversity in malignant melanomas. *Am J Clin Pathol* 1990; 12: 731-740.

Newton JA, Balaille V, Griffiths K et al. How common is the atypical mole syndrome phenotype in apparently esporadic melanoma? *J AM Acad Dermatol* 1993; 29:989-996.

NiaKosari F, Kahn HJ, McCready D et al. Lymphatic invasion identified by monoclonal antibody D2-40, younger age, and ulceration:

predictors of sentinel lymph node involvement in primary cutaneous melanoma. *Arch Dermatol* 2008; 144: 462-7.

Norman J Jr, Cruse W, Ruas E et al. The expanding role of lymphoscintigraphy in the management of cutaneous melanoma. First place winner: Conrad Jobst award. *Am Surg* 1989; 55: 689-694.

O`Doherty CJ, Prescott RJ, White H et al. Sex differences in presentation of cutaneous malignant melanoma and in survival from stage I disease. *Cancer* 1986; 58: 788-792.

Obermair A, Wanner C, Bilgi S et al. Tumor angiogenesis in stage IB cervical cancer: correlation of microvessel density with survival *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:314-9.

Offodile R, Hoh C, Barsky Sh et al. Minimally invasive breast carcinoma staging using lymphatic mapping with radiolabeled dextran. *Cancer* 1998; 82: 1704-1708.

Orchard GE. Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies melan-A, tyrosinase and HMB-45 with NKI-C3 and S-100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *Histochem J* 2000;32:475-481.

Ordóñez A, Feliu J, Espinosa E. Factores pronósticos en melanoma cutáneo maligno. En: González Barón M (Eds). *Oncología clínica*. Interamericana- Mc Graw Hill, Madrid 1994.

Ordóñez A, González Barón M, Espinosa E. Melanoma. En: González Barón M, Ordóñez A, Feliu J et al (Eds.). *Oncología clínica*. Interamericana-Mc Graw hill, Madrid 1998.

Paanelli G, Chicco C, Cremonesi M et al. Optimised sentinel node scintigraphy in breast cancer. *Q J Nucl Med* 1998; 42: 49-53.

Paek SC, Griffith KA, Johnson TM et al. The impact of factors beyond Breslow depth on predicting sentinel lymph node positivity in melanoma. *Cancer* 2007; 109: 100-108.

Patterson RH, Helwig Eb. Subungual malignant melanoma: a clinical-pathologic study. *Cancer* 1980; 46: 2074-2087.

Pich A, Chiusa L, Margaria E. Role of the argyrophilic nucleolar organizer regions in tumor detection and prognosis *Cancer Detect Prev.* 1995; 19: 282-291.

Pijpers R, Borgstein P, Meijer S et al. Sentinel node biopsy in melanoma patients: dynamic lymphoscintigraphy followed by intraoperative gamma probe and vital dye guidance. *World J Surg* 1997; 21: 788-793.

Pijpers R, Meijer S, Hoekstra OS et al. Impact of lymphoscintigraphy on sentinel node identification with technetium-99m-colloidal albumin in breast cancer. *J Nucl Med* 1997; 38: 366-368.

Pizarro A, Lázaro MT, Hernandez N, Casado M. Historia natural y aspectos clínicos. En: *González Barón M, Ordóñez Gallego A (Eds.). Melanoma.* Masson, Barcelona 1998.

Plotnick H, Rachmaninoff N, Van Den Berg HJ. Polypoid melanoma: A virulent variant of nodular melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23: 880-884.

Podhajcer OL, Bover L, Bravo AL et al. Expresión of cathepsin D in primary and metastatic human melanoma and dysplastic nevi. *J Invest Dermatol.* 1995; 104: 340-344.

Poetschhaus M, Woenckhaus C, Dittberner T et al. Differences in chromosomal aberrations between nodular and superficial spreading

malignant melanoma detected by interfase cytogenetics. *Lab Invest* 1998; 78: 883-888.

Popescu NA, Beard CM et al. Cutaneous malignant melanoma in Rochester, Minesota: trends in incidence and survival; 1950 through 1985. *Mayo Clin Proc* 1990; 65:1293-1302.

Puches R, Smolle J, Rieger E, Soyer HP, Kerl H. Expression of cytoskeletal components in melanocytic skin lesions. An immunohistochemical study. *Am J Dermatopathol.* 1991 ;13:137-44.

Quesada AR, Medina MA, Muñoz-Chápuli R. El proceso angiogénico. En: Quesada AR, Medina MA, Muñoz-Chápuli R (Eds). *Angiogénesis.* Consejo social de la Universidad de Málaga 2004.

Rampen FH, Mulder JH. Malignant melanoma: an androgen-dependent tumor?. *Lancet* 1980; 1: 562-564.

Ramsay JA, From L, Iscoe NA et al. MIB-1 proliferative activity is a significant prognostic factor in primary thick cutaneous melanomas. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 22-26.

Reddy VB, Gattuso P, Aranha G et al. Cell proliferation markers in predicting metastases in malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1995; 22: 248-251.

Reed RJ, Leonard DD. Neurotropic melanoma. A variant of desmoplastic melanoma. *Am J Surg Pathol* 1979; 3: 301-311.

Reed RJ, Martin P. Variants of melanomas. *Semin Cutan Med Surg* 1997; 22: 137-158.

Reed RJ. Minimal deviation melanoma. *Human Pathol* 1990 ;21: 1206-1211

Reintgen D, Cruse CW, Wells K et al. The orderly progression of melanoma nodal metastases. *Ann Surg* 1994; 220: 759-767.

Reintgen D, Shivers S. Sentinel lymph node micrometastasis from melanoma. Proven methodology and evolving significance. *Cancer* 1999; 86: 551-552.

Rigel DS, Friedman RJ et al. The incidence of malignant melanoma in United States: figures as we approach the 21st century. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34:839-847.

Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW et al. Factors influencing survival in melanoma. *Dermatol Clin* 1991; 9: 631-642.

Rigel DS, Sober AJ, Friedman RJ et al. Factores pronósticos que influyen en la supervivencia del melanoma maligno. En: Friedman JR, Kopf AW, Harris MN, Baker D. *Cáncer de piel*. Philadelphia: WB Saunders Company, 1991: 211-218.

Rimoldi D, Lemoine R, Kart A-M et al. Detection of micrometastases in sentinel lymph nodes from melanoma patients: direct comparison of multimarker molecular and immunopathological methods. *Melanoma Res* 2003; 13: 511-520.

Rivers JK, McCarthy SW, Shaw HM. Pacientes con melanomas gruesos con una supervivencia mayor o igual a 10 años: estudio histológico, citométrico y de HLA. *Histopatología* 1991; 18: 339-346.

Robbins PF, El-Gamil M, Li YF et al. Multiple HLA class II-restricted melanocyte differentiation antigens are recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient with melanoma. *J Immunol* 2002;15: 6036-6047.

Rockley PF, Trieff N, Wagner RF et al. Nonsunlight risk factors for malignant melanoma part I: chemical agents, physical conditions, and occupation. *Int J Dermatol* 1994; 33:398-406.

Rodenas JM, Delgado M, Herranz MT et al. Sun exposure, pigmentary traits, and risk of cutaneous malignant melanoma: a case-

control study in a Mediterranean población. *Cancer Causes Control* 1996; 75:275-283.

Rodrigues LK, Klencke BJ, Vin-Christian K et al. Altered clinical course of malignant melanoma in HIV-positive patients. *Arch Dermatol* 2002; 138: 765-770.

Rosai J. Tumor and tumor like conditions. En: Rosai J (Ed). *Ackerman's Surgical Pathology*. 8ª ed. Mosby, Saint Louis 1994.

Rubio J, Jiménez R et al. An epidemiological and clinical estudy of malignant cutaneous melanoma in the cachtmentarea of Leon. *Med Clin* 1991; 97:693-696.

Ruiter DJ. Clinical and pathologic diagnosis, staging and prognostic factors of melanoma and management of primary disease. *Curr Opin Oncol* 1992; 4: 357-367.

Saenz MC, McNutt NS, Bogdany JK et al. P53 expression is rare in cutaneous melanomas. *Am J Dermatol* 1995; 17: 344-349.

Sahni D, Robson A, Orchard G, Szydlo R, Evans AV y Russell-Jones R. The use of LYVE-1 antibody for detecting lymphatic involvement in patients with malignant melanoma of Known sentinel node status. *J Clin Pathol* 2005; 58: 715-721.

Saitoh K, Takahashi H, Yamamoto M et al. Expression of metastasis suppressor gene product, nm23 protein, is not inversely correlated with the tumor progression in human malignant melanomas. *Histopathology* 1996; 57: 497-505.

Sandig M, Voura EB, Kalnins VI et al. Role of cadherin in the transendothelial migration of melanoma cells in culture. *Cell Motil Cytoskeleton* 1997 ; 38 :351-364.

Sara AS, Evans HL, Benjamín RS. Malignant melanoma of the sof  parts (clear cell sarcoma). A study of 17 cases, with emphasis on prognostic factor. *Cancer* 1990; 65: 367-374.

Sarode VE, Joshi K, Ravichachran P, Das R. Mixoid variant of primary cutaneous malignant melanoma. *Histopathology* 1992; 20: 186-187.

Sarris M, Scolyer RA, Konopka M et al. Cytoplasmic expresión of nm23 predicts the potencial for cerebral metástasis in patients with primary cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 2004; 14: 23-27.

Schacht V, Dadras SS, Johnson LA et al. Up-Regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol* 2005; 3:913-921.

Schaumburg-Lever G, Metzler G, Kaiserling E. Ultrastructural localization of HMB-45 binding sites *J Cutan Pathol.* 1991;18:432-435.

Schietroma C, Cianfarani F, Lacal PM et al. Vasculae endothelial growth factor-C correlatos with lymph node localization of human melanoma metastases. *Cancer* 2003; 98: 789-797.

Schmoeckel C, Bockelbrink A, Bockelbrink H et al. Low and hight-risk malignant melanoma-I. Evaluation of clinical and histological prognosticators in 585 cases. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1983; 19:227-235.

Schmoeckel C, Castro CE, Braun-Falco O. Nevoid malignant melanoma. *Arch Dermatol Rres* 1985; 277: 362-369.

Schmoeckel CH, Braun-Falco O. Prognostic index in malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1978; 144:871-873.

Schneider JS, Moore DH, Sagebiel RW. Risk factor for melanoma incidente in prospective folow-up. The importance of atypical (dysplasic) nevi. *Arch Dermatol* 1994; 130:1002-1007.

Scott GA, Trepeta R. Clear cell sarcoma of tendon and aponeuroses and malignant blue nevus arising in prepubescent children: report of two cases and review of the literature. *Am J Dermatopathol* 1993; 15: 139-145.

Shafir R, Hiss J et al. The thin malignant melanoma: changing patterns of epidemiology and treatment. *Cancer* 1982; 50:817-819.

Shaw HN. Malignant melanoma: influence of site of lesion and age of patient in the female superiorita in survival. *Cancer* 1980; 46. 2730-2735.

Sheibani K, Battifora H. Signet-ring cell melanoma. A rare morphologic variant of malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* 1988; 12: 28-34.

Sherman AI, Ter- Pogossian M. Lymph-node concentration of radioactive colloidal gold following interstitial injection. *Cancer* 1953; 6: 1238-1240.

Shidham VB, Qui D, Rao RN et al. Improved immunohistochemical evaluation of micrometastases in sentinel lymph nodes of cutaneous melanoma with "MCW Melanoma Cocktail"-A mitxure of monoclonal antibodies to MART-1, melan-A and tyrosinase. *BMC Cancer* 2003; 7;3:15.

Shields JD, Borsetti M, Rugby H et al. Lymphatic density and metastatic spread in human malignant melanoma. *Br J Cancer* 2004; 90: 693-700.

Skelton HG, Smith, Laskin WB et al. Desmoplastic malignant melanoma. *Jam Acad Dermatol* 1995; 32: 717-725.

Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T et al. Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol* 2001; 159: 893-903.

Smith KJ, Skelton HG, Heimer W et al. Melanocytic activation in HIV-1 disease: HMB-45 staining in common acquired nevi. *Military Medical Consortium for the Advancement of Retroviral Research J Am Acad Dermatol.* 1993;29:539-44.

Smolle J. Biologic significance of tumor thickness. *Am J Dermatopathol* 1995; 17:281-286.

Sober AJ. Solar exposure in the etiology of cutaneous melanoma. *Photodermatol* 1987; 77:23-31.

Sondak VK, Taylor JM, Sabel MS et al. Mitotic rate and younger age are predictors of sentinel lymph node positivity: lessons learned from the generation of a probabilistic model. *Ann Surg Oncol.* 2004; 11: 247-258.

Sondergaard K. Histological type and biological behavior of primary cutaneous malignant melanoma.2. An análisis of 86 cases located on so-called acral region as plantar, palmar and sub/paraungueal areas. *Virchows Arch* 1983;401:333-343.

Soyer HP. Ki-67 immunostaining in melanocytic skin tumors. Correlation with histologic parameters. *J Cutan Pathol* 1991; 18:264-272.

Staker SA; Baldwin ME; Achen MG. The rol of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *FASEB J* 2002; 16: 922-934.

Stas M, van den Oord JJ, Garmyn M, et al. Minimal deviation melanoma and/or naevoid melanoma: is recognition Worthwile?. *A*

clinicopathological study of nine cases. *Melanoma Res* 2000;10:371-380.

Steiner A, Honrad K, Pehamberger H, Wolf K. Verrucous malignant melanoma. *Arch Dermatol* 1988; 124: 1534-1537.

Steiner A. Diffuse melanosis in metastatic malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1991; 24: 625-628.

Stolz W, Schmoeckel C, Landthaler M et al. Association of early malignant melanoma with nevocytic nevi. *Cancer* 1989; 63:550-555.

Straume O, Akslen LA. Independent prognostic importance of vascular invasion in nodular melanomas. *Cancer* 1996; 18:221-227.

Straume O, Jackson DG and Akslen LA. Independent prognostic impact of lymphatic vessel density and presence of low-grade lymphangiogenesis in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Research* 2003; 9: 250-256.

Suzuki K, Morita T, Tokue A. Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) expression predicts lymph node metastasis of transitional cell carcinoma of the bladder. *Int J Urol* 2005; 12: 152-158.

Swartz MA and Skobe M. Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microscopy research and technique* 2001; 55:92-99.

Talve LA, Collan YU, Ekfors TO. Primary malignant melanoma of the skin. Relationships of nuclear DNA content, nuclear morphometric variables, Clark level and tumor thickness. *Anal Quant Cytol Histol* 1997; 19: 62-74.

Taylor RC, Patel A, Panageas Ks et al. Tumor-infiltrating lymphocytes Predict sentinel lymph node positivity in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 869-875.

Thompson JF, Shaw HM, Hersey P, et al. The history and future of melanoma staging. *J Surg Oncol* 2004;86:224-235.

Thompson JF, Shaw HM. Should tumor mitotic rate and patient age, as well as tumor thickness, be used to select melanoma patients for sentinel node biopsy? *Ann Surg Oncol.* 2004; 11: 233-235.

Tralongo V, Daniele E, Leonardo V et al. Prognostic value of clinicopathologic variables and DNA ploidy in stage I Cutaneous malignant melanoma. *Oncol rep* 1998; 5: 1095-1098.

Tran H, Kopf AW et al. Regresión in malignant melanomas. *Am J Dermatopathol* 1996; 18:137-141.

Tsao H, Sober AJ, Barnhill RL. Desmoplastic neurotropic melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 1997; 83: 131-136.

Tuker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: Where are we? *Oncogene.* 2003; 22:3042-3052.

Tuna EB, Lebe B, Yorucoglu K. HMB-45 and melan-A expression in renal angiomyolipoma and their significance for the diagnosis. *Tumori* 2003;89:46-8.

Ueda M, Hung YC, Terai Y et al. Vascular endothelial growth factor-C expression and invasive phenotype in ovarian carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3225-3232.

Umebayashi Y y Otsuka F. DNA-ploidy abnormalities are a reflection of the metastatic potential of malignant melanoma. Microfluorometric DNA analysis. *Acta Derm Venereol* 1997; 77: 118-121.

Umebayashi Y, Otsuka F. Prognostic significance in malignant melanoma of nuclear DNA content measured by a microfluorometric method. *Arc Dermatol Res* 1995; 287: 718-722.

Uren RF, Howman-Giles RB, Shaw HM et al. Mammary lymphoscintigraphy in breast cancer. *J Nucl Med* 1995; 36: 1775-1780.

Valdés Olmos RA, Hoefnagel CA, Niewg OE et al. Lymphoscintigraphy in oncology: a rediscovered challenge. *Eur J Nucl Med* 1999; 26: 52-510.

Van den Oord JJ, Maes A, Stas M et al. CD40 is a prognostic marker in primary Cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 1996; 149: 1953-1961.

Van der Esch EP, Cascinelli N et al. Stage I melanoma of the skin: evaluation of prognosis according to histologic characteristic. *Cancer* 1981; 48:1668-1673.

Van der Velde-Zimmermann D, Schipper ME, de Weger RA, Hennip A, Borel Rindes IH. Sentinel node biopsies in melanoma patients: a protocol for accurate, efficient, and cost-effective analysis by preselección immunohistochemistry on the basis of Tyr-PCR. *Ann Surg Oncol*: 2000; 7:51-54.

Vázquez M, Ramos FA, Sánchez JL. Melanomas of volar and subungual skin in Puerto Ricans. A clinicopathologic study. *J Am Acad Dermatol* 1984; 10: 39-45.

Vilmer C, Bailly C et al. Thin melanomas with unusual aggressive behavior: a report of nine cases. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34:349-444.

Vogt T, Zipperer KH, Vogt A et al. P53 protein and Ki-67 antigen expresión are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin. *Histopathology* 1997; 30: 57-63.

Walter SD, Marret LD, From L et al. The associaton of cutaneous malignant melanoma with the use of sunbeds and sunlamps. *Am J Epidemiol* 1990; 131:232-243.

Walts AE, Said JW, Shintaku IP. Cytodiagnosis of malignant melanoma. Immunoperoxidase staining with HMB-45 antibody as an aid to diagnosis. *Am J Clin Pathol.* 1988; 90:77-80.

Water MJ, Ronan SG, Han MC. Interrrelationship between histopathologic characteristics of melanoma and estrogen receptor status. *Cancer* 1991; 68; 184-188.

Wayte DM, Helwig EB. Melanotic Freckle of Hutchinson. *Cancer* 1986; 21: 893-911.

Weedon D. Léntigos, nevus y melanomas. En: Weedon D (Eds). *Piel. Patología.* Marbán, Madrid 2002.

Weedon D. Melanoma and other melanoytic skin lesions. *Curr Top Pathol* 1985; 74:1-55.

Weidner N, Folkman J, Pozza F et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1875-87.

Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1875.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 1991; 324: 1-8.

Weinstock MA, Sober AJ. The risk of progresion of lentigo maligna to lentigo maligna melanoma. *Br J Dermatol* 1987; 116: 303-310.

Weissman A, Roses DF et al. Prediction of lymph node metastasis from the histologic features of primary Cutaneous malignant melanomas. *Am J Dermatopathol* 1984; 6:35-41.

Whelan SL, Parkin MD et al. Patterns of cancer in five continents. International Agency for Resecarch on Cancer, Lyon 1990.

Wick MR, Swanson PE, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. *J Cutan Pathol.* 1988;15:201-207.

Wigle JT, Oliver G. Prox-1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 1999; 98: 769-778.

Wilhelm AJ, Mijnhout GS, Franssen EJJ. Radiopharmaceuticals in sentinel lymph-node detection. *Eur J Nucl Med* 1999; 26: 536-542.

Witte, MH y Witte, CL. Lymphangiogenesis and lymphologic síndromes. *Lymphology.* 1986; 19:21-8.

Wobser M, Siedel C, Schrama D et al. Expresión pattern of the lymphatic and vascular markers VEGFR-3 and CD31 does not predict regional lymph node metastasis in cutaneous melanoma. *Arch Dermatol Res.* 2006; 297: 352-357.

Wong JH, Wanek L, et al. The importante of anatomic site in prognosis in patients with cutaneous melanoma. *Arch Surg* 1991; 126:486-489.

Wong T-Y, Suster S, Duncan LM et al. Nevoid melanoma: a clinicopathological study of seven cases of malignant melanoma mimicking spindle and epithelioid cell nevus and verrucous dermal nevus. *Human Pathol* 1995; 26: 171-179.

Woods JE, Soule EH et al. Metastasis and death in patients with thin melanomas (less than 0,76mm) *Ann Surg* 1983; 198:63-64.

Yao-Tseng Chen, Elisabeth Stockert, Solam Tsang et al. Inmunophenotyping of melanomas for the tyrosinase: Implications for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 8125-8129.

Yasuoka H, Nakamura Y, Zuo H, et al. VEGF-D expression and lymph vessels play an important role for lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 2005;18:1127-1133

Yu LL, Flotte TJ, Tanabe KK et al. Detection of microscopic melanoma metastases in sentinel lymph node. *Cancer* 1999; 86: 617-627.

Zembowicz A, McCusker M, Chiarelli C et al. Morphological analysis of nevoid melanoma: a study of 20 cases with a review of the literature. *Am J Dermatopathol* 2001; 23: 167-175.

Zeng Y, Opeskin K, Horvath LG, et al. Lymphatic Vessel Density and Lymph Node Metastasis in Prostate Cancer. *Prostate* 2005; 9999:1- 9.