



FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
PROGRAMA: DERMATOLOGÍA Y VENEREOLOGÍA

**“DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS Y
MOLECULARES IMPLICADOS EN LA REGRESIÓN ESPONTÁNEA
DE NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS CUTÁNEAS”.**

Memoria para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia

Presentada por:

JOSÉ MARÍA MARTÍN HERNÁNDEZ

Dirigida por los doctores:

CARLOS MONTEAGUDO CASTRO

ESPERANZA JORDÁ CUEVAS

Valencia, 2014



El trabajo titulado:

“DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS Y MOLECULARES IMPLICADOS EN LA REGRESIÓN ESPONTÁNEA DE NEOPLASIAS MELANOCÍTICAS CUTÁNEAS”,

que se presenta en esta memoria, ha sido realizado por el licenciado en Medicina y Cirugía D. José María Martín Hernández bajo nuestra dirección.

Dicho trabajo reúne todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa como **TESIS DOCTORAL**.

Y para que así conste a los efectos oportunos, realizamos esta declaración en Valencia a 27 de agosto de 2014.

Fdo: Carlos Monteagudo Castro
Catedrático de Anatomía Patológica,
Universitat de Valencia

Fdo: Esperanza Jordá Cuevas
Profesora Titular de Dermatología,
Universitat de Valencia

De razones vive el hombre, de sueños sobrevive.

Miguel de Unamuno

A mi yayo Pepe

A Elisabeth

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo es fruto de muchos años de esfuerzo y en su elaboración han contribuido de forma altruista varias personas, sin cuya colaboración, no hubiera podido ver la luz.

Gracias en primer lugar a mis directores Carlos Monteagudo y Esperanza Jordá.

A Carlos. Por la enorme cantidad de horas que has dedicado a este trabajo, por haberme marcado las directrices y resolver las dudas que me han ido surgiendo en un campo en el que carezco de la confianza que proporciona la soltura del día a día. Gracias por tus críticas, correcciones y consejos, y por contagiarme del entusiasmo, meticulosidad y dedicación con la que vives tu profesión. Tus certeros comentarios siempre han servido para mejorar esta memoria. Sin tu colaboración y ayuda esta tesis no hubiera sido posible.

A Esperanza. Muchas gracias por darme la oportunidad de pertenecer a esta familia, que me ha permitido formarme y desempeñar mi labor profesional como dermatólogo rodeado de personas y profesionales excepcionales, por la confianza ciega que siempre has depositado en mí, de la que a veces dudo si soy merecedor, por tus enseñanzas y consejos, y por tus correcciones, que han enriquecido considerablemente el trabajo. Gracias por la ilusión y motivación que demuestras a diario, y por constituir un ejemplo para los demás. Estaré en eterna deuda contigo por todo lo que me has dado.

A Amparo Ruiz. Gracias por la gran cantidad de tiempo que has dedicado a realizar el estudio de las señales teloméricas, incluso durante tus vacaciones, y por tu paciencia y comprensión. Gracias por alentarme y por el interés que siempre has mostrado por el desarrollo de la tesis.

A Teresa San Miguel. Gracias por el esfuerzo que realizaste durante seis meses, ayudándome a seleccionar los mejores campos y a fotografiar multitud de células para poder realizar el estudio de los telómeros, y por el tiempo que dedicaste a clasificar la gran cantidad de información obtenida. Me siento en deuda contigo.

A Laura Martínez y Richard Sotos por vuestra ayuda en los aspectos técnicos de este trabajo. A Laura por la realización de las matrices tisulares y a Richard por la preparación de las muestras para los estudios de FISH. Gracias a los dos por vuestra

disposición para resolver todas mis dudas, especialmente en la elaboración de la metodología.

A todo el personal del Departamento de Anatomía Patológica, mi gratitud por haberme hecho sentir como en casa en vuestras instalaciones durante todos estos años, a pesar de aparecer en ocasiones a horas intempestivas.

A Iván Arribas y especialmente a José Mateo, gracias por vuestra inestimable ayuda en el análisis estadístico. Gracias José por tu inagotable predisposición y tu constante interés en la evolución de la tesis, por motivarme y alentarme, y por ayudarme a entender cuestiones tan complejas como las que se relacionan con el mundo de la estadística. No has tenido nunca inconveniente en dedicar tu tiempo a realizar los múltiples análisis que te he solicitado. A Reyes, por el tiempo del que te han privado esas consultas.

A José Calvo. Amigo, gracias por solucionar todos los problemas que me han surgido en el manejo del Word y del Excel, por tu ayuda en la recopilación de material bibliográfico y por mostrar siempre interés por la evolución del trabajo. Mis conocimientos de informática se han incrementado notablemente gracias a tus aportaciones.

A Pablo Sabater por aguantarme en los momentos en los que necesitaba desahogarme. No sé cuántas veces habrás oído la palabra tesis...

A mis compañeros de trabajo durante todos estos años en el Servicio de Dermatología del Hospital Clínico. A Lola, Maribel, Inma, Encarna, Ángeles, Carmen, Miguel y Vicent. Sois mi otra familia. De todos he aprendido y sigo aprendiendo. Gracias por generar un ambiente de trabajo agradable a pesar del estrés que provoca la presión asistencial, y por ayudarme siempre que lo he necesitado.

A todos los residentes con los que he coincidido estos últimos años, por vuestra enorme ayuda, por vuestro interés, y por servir de constante estímulo y motivación, además de por generar un ambiente jovial.

A las enfermeras, auxiliares y administrativas/os con las que he compartido mi vida todos estos años, especialmente a Ana, Mila y Amparo, por vuestra acogida y el cariño

que me habéis demostrado desde el primer día que aparecí por el Hospital. Sabéis que es recíproco.

A mis padres Pepe y Sara por su cariño y apoyo incondicional, y por ser tan buenas personas y tan buenos padres, y a mis hermanos Alberto y Sergio.

A Elisabeth, mi mujer, por tu paciencia, apoyo, comprensión y generosidad. Has vivido en primera persona todo el proceso de elaboración de la tesis, que en algunos momentos ha parecido interminable, y espero recompensarte por todo el tiempo del que te he privado estos últimos años. Gracias por aguantarme en los momentos en los que he estado más irascible, por ser mi sostén, y por acompañarme en esta singladura que emprendimos hace ya unos cuantos años.

A todos los que os habéis alegrado de que por fin la haya acabado,

MUCHAS GRACIAS A TODOS.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Regresión en lesiones melanocíticas.....	3
1.2 Significado pronóstico de la regresión.....	6
1.2.1 Revisión de los principales estudios que relacionan la regresión con el pronóstico en el melanoma.....	10
1.3 Definición de la regresión.....	16
1.3.1 Regresión desde un punto de vista clínico.....	16
1.3.2 Regresión desde un punto de vista histológico.....	19
1.4 Mecanismos de regresión de las neoplasias cutáneas melanocíticas y epiteliales.....	22
1.4.1 Respuesta inmune.....	22
1.4.1.1 Biología de la célula tumoral y sus interacciones con el sistema inmunitario.....	24
1.4.1.2 Antígenos de melanoma identificados por linfocitos T citotóxicos.....	26
1.4.1.3 Mecanismos de escape tumoral.....	30
1.4.1.4 Perspectivas actuales sobre la respuesta inmunitaria en el melanoma.....	32
1.4.2 Apoptosis.....	34
1.4.2.1 Regulación de la apoptosis.....	36
1.4.2.2 Defectos en la regulación de la apoptosis.....	38
1.4.2.3 Consideraciones finales sobre la apoptosis en el melanoma.....	41
1.4.3 Inhibición de la angiogénesis.....	42
1.4.4 Diferenciación terminal.....	43
1.4.5 Inestabilidad genómica debida al acortamiento de los telómeros.....	44

1.5	Epídemología del melanoma.....	48
1.6	Aspectos moleculares del melanoma.....	51
1.7	Justificación de la tesis.....	53
1.7.1	Hipótesis.....	53
1.7.2	Objetivos.....	54
2	MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
2.1	Material.....	59
2.1.1	Estudio clínico-patológico.....	59
2.1.2	Estudio molecular.....	60
2.2	Métodos.....	60
2.2.1	Estudio clínico-patológico.....	60
2.2.1.1	Variables clínicas.....	60
2.2.1.2	Variables histológicas.....	61
2.2.1.2.1	Definición de los diferentes tipos de lesiones melanocíticas estudiadas.....	64
2.2.1.2.2	Definición de los parámetros histológicos evaluados.....	73
2.2.1.3	Variables inmunohistoquímicas.....	81
2.2.1.3.1	Introducción a la técnica inmunohistoquímica.....	81
2.2.1.3.2	Técnica empleada.....	82
2.2.1.3.3	Construcción de las matrices tisulares.....	83
2.2.1.3.4	Protocolos empleados en las técnicas de inmunotinción.....	86
2.2.1.3.5	Evaluación de la inmunoreactividad.....	92
2.2.1.3.6	Marcadores inmunohistoquímicos empleados.....	93
2.2.2	Estudio molecular.....	98
2.2.2.1	Introducción a la técnica de FISH.....	98
2.2.2.2	Técnica empleada.....	101
2.2.2.3	Metodología utilizada para cuantificar la longitud de los telómeros.....	102

2.2.2.4	Variables evaluadas en el estudio molecular.....	104
2.2.2.5	Visualización de los resultados con el microscopio.....	105
2.2.3	Evaluación del pronóstico.....	106
2.3	Limitaciones.....	107
2.4	Evaluación de los aspectos éticos.....	108
2.5	Descripción de las pruebas y modelos estadísticos.....	109
3	RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL.....	115
3.1	Estudio clínico-patológico.....	117
3.1.1	Resultados de las variables clínicas.....	119
3.1.1.1	Asociación de los parámetros clínicos con el resto de variables estudiadas.....	119
3.1.1.1.1	Edad.....	119
3.1.1.1.2	Sexo.....	125
3.1.1.1.3	Localización.....	130
3.1.2	Discusión de los resultados de las variables clínicas.....	137
3.1.3	Resultados de las variables histológicas.....	140
3.1.3.1	Diagnóstico histológico de las lesiones melanocíticas.....	142
3.1.3.2	Asociaciones entre el tipo de lesión melanocítica y el resto de parámetros histológicos.....	143
3.1.3.3	Asociaciones entre los diferentes tipos de lesiones melanocíticas.....	156
3.1.3.4	Asociaciones entre el índice de Breslow y la fase de crecimiento de los melanomas con regresión y el resto de variables.....	166
3.1.4	Discusión de los resultados de las variables histológicas.....	180
3.1.4.1	Melanomas.....	180
3.1.4.2	Nevos melanocíticos.....	182
3.1.4.2.1	Regresión en los halo nevos.....	183

3.1.4.2.2 Patrones de regresión en nevos melanocíticos distintos del halo nevo.....	187
3.1.4.3 Diferentes parámetros histológicos evaluados.....	192
3.1.4.3.1 Fibrosis.....	192
3.1.4.3.2 Infiltrado inflamatorio.....	202
3.1.4.3.3 Melanofagia.....	206
3.1.4.3.4 Proliferación vascular.....	207
3.1.4.3.5 Pérdida de melanocitos.....	210
3.1.4.3.6 Apoptosis.....	211
3.1.4.3.7 Atrofia.....	212
3.1.4.4 Diagnóstico diferencial histológico de las lesiones con regresión.....	215
3.1.5 Resultados de las variables inmunohistoquímicas.....	217
3.1.5.1 Asociación de los marcadores inmunohistoquímicos con los parámetros clínicos.....	217
3.1.5.2 Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y el tipo de lesión melanocítica.....	219
3.1.5.3 Asociaciones de los marcadores inmunohistoquímicos con los parámetros histológicos.....	228
3.1.5.4 Resumen de los resultados inmunohistoquímicos.....	244
3.1.6 Discusión de los parámetros inmunohistoquímicos.....	248
3.1.6.1 Caracterización de los infiltrados linfocitarios en las lesiones melanocíticas.....	248
3.1.6.1.1 Linfocitos T reguladores.....	251
3.1.6.1.2 Marcadores de activación linfocitaria (CD 25).....	260
3.1.6.1.3 Marcadores de apoptosis estudiados.....	261

3.1.7 Análisis multivariante.....	268
3.2 Estudio molecular.....	271
3.2.1 Introducción.....	273
3.2.2 Resultados del estudio molecular.....	275
3.2.2.1 Comparaciones entre las células tumorales y las epidérmicas en todas las lesiones.....	275
3.2.2.2 Comparaciones entre los melanomas con y sin regresión.....	279
3.2.2.3 Comparaciones exclusivamente entre las distintas lesiones melanocíticas con regresión.....	281
3.2.3 Discusión.....	283
3.3 Pronóstico.....	295
3.3.1 Asociación entre la presencia o ausencia de regresión en los melanomas y el pronóstico.....	299
3.3.2 Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y el pronóstico.....	300
3.3.3 Asociación entre la longitud de los telómeros y el pronóstico.....	304
4 CONCLUSIONES.....	307
5 BIBLIOGRAFÍA.....	311
6 ANEXO.....	347

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

Apaf-1: *apoptotic protease activating factor 1*

Bax: *Bcl-2-associated X protein*

Bad: *Bcl-2-associated death protein*

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

bFGF: factor de crecimiento básico de los fibroblastos

BIRC5: survivina

BRUCE/Apollon: gen BIRC6

CCND1: ciclina D1

CD: *cluster of differentiation*

CDK4: quinasa dependiente de ciclina 4

CDKN2A: inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina

CIAP: *cellular inhibitor of apoptosis*

FADD: *factor associated death domain*

FDA: *Food and Drug Administration*

FISH: hibridación *in situ* con fluorescencia o *fluorescence in situ hybridization*

FLIPs: proteína inhibidora FLice

FoxP3: *Forkhead box P3*

GITR: receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides

Gp100: glicoproteína 100

HEV: vénulas de células endoteliales altas

HLA: antígeno leucocitario humano o *human leukocyte antigen*

HRP: *horseradish peroxidase*

IAPs: proteínas celulares inhibidoras de la apoptosis o *inhibitor of apoptosis proteins*

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1

IFN: interferón

IL: interleucina

ILP-2: *inhibitor of apoptosis-like protein-2*

iNOS: óxido nítrico sintetasa inducible

KIAP: *kidney inhibitor of apoptosis protein*

L-Fas: ligando de Fas

LFA-1: antígeno-1 asociado a función de linfocito

LMM: léntigo maligno melanoma

MAGE: antígenos asociados a melanoma

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos o *mitogen activated protein kinase*

Mart-1/Melan A: antígeno de melanoma reconocido por células T 1

MC1R: receptor de melanocortina 1

MES: melanoma de extension superficial

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

MLA: melanoma lentiginoso acral

ML-IAP: *melanoma inhibitor of apoptosis protein*

MN: melanoma nodular

NA: no aplicable

NAIP: proteína inhibidora apoptosis neuronal o *neuronal apoptosis inhibitory protein*

NECP: nevo esclerosante con cambios tipo pseudomelanoma

NFAT: factor nuclear de linfocitos T activados

NF-κβ: factor nuclear Kappa Beta

NK: asesina natural o *natural killer*

NS: no significativo

PBS: tampón fosfato salino o *phosphate buffered saline*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PI3K: fosfatidil-inositol 3-quinasa

PNA: péptido de ácido nucleico

PTEN: fosfatidil-inositol-3,4,5-trifosfato 3 fosfatasa

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

Rb: retinoblastoma

TGF: factor transformador de crecimiento

Th: T colaborador o *T helper*

TMA: matrices tisulares o *tissue microarrays*

TNF: factor de necrosis tumoral

TRAIL: *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

Treg: células T reguladoras

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

XIAP: proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X

I-INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. REGRESIÓN EN LESIONES MELANOCÍTICAS.

La regresión espontánea de tumores es uno de los fenómenos más fascinantes y a la vez intrigantes que se pueden observar en medicina. Este raro suceso ha sido descrito en prácticamente todos los tipos de cánceres, y frecuentemente en neoplasias melanocíticas cutáneas, tanto benignas como malignas, en las que el fenómeno es más evidente por la pérdida de pigmento ¹⁻³. En la inducción de la regresión están potencialmente implicados múltiples mecanismos, complejos e interrelacionados, entre los que destacan la respuesta inmune, la apoptosis, la inhibición de la angiogénesis, la diferenciación terminal celular, y la crisis genómica que resulta del agotamiento de los telómeros ⁴⁻⁶.

En el caso de los tumores melanocíticos, parece que el mecanismo inmune es el que se ha relacionado de una forma más consistente, y se ha demostrado que la regresión en el melanoma es 6 veces más frecuente que en otras neoplasias malignas ⁷. El melanoma comprende sólo un 1,8% de todos los cánceres, pero representa un 11% de los casos descritos de regresión espontánea de tumores ⁸. La mayoría de estudios muestran que la regresión es mucho más frecuente en melanomas delgados y en fase de crecimiento radial, lo que sugiere que se produciría una activación precoz de la respuesta del huésped frente al tumor ^{9,10}.

Aunque la regresión parcial en el melanoma ocurre entre un 10 y un 35% de los casos, la documentación histológica de regresión completa de melanomas es muy rara. Desde un punto de vista exclusivamente histológico, cuando la regresión es completa, es muy difícil determinar la naturaleza biológica de la lesión previa, y en la mayoría de ocasiones, tan sólo el desarrollo de metástasis en el seguimiento posterior del paciente permite establecer dicha distinción (**figura 1.1**).

Las series más largas de melanomas cifran en aproximadamente un 2,5-4% los casos de melanomas metastásicos en los que el tumor primario es de origen desconocido, lo que hace intuir que muchos de esos casos puedan corresponder a melanomas que han sufrido un proceso de regresión completa con posterioridad a su diseminación ¹¹⁻²². Por otro lado, la incidencia estimada de regresión completa de metástasis de melanoma es de un 0,22-0,27% ^{11,14,23}. Además, también hay que contemplar la posibilidad de que, en algunos casos, haya melanomas que puedan experimentar una regresión completa y no metastatizar, como se ha descrito en la literatura ^{7,24,25}.

La regresión completa de nevos melanocíticos es mucho más frecuente. Desde un punto de vista clínico, la pérdida de pigmentación de las lesiones melanocíticas se ha asociado clásicamente a la presencia de un halo blanquecino perilesional. En los últimos años se han documentado mecanismos de despigmentación diferentes al halo nevo, y la introducción de la dermatoscopia digitalizada, técnica cuyo uso se está generalizando en la práctica clínica dermatológica, ha permitido realizar un seguimiento más estrecho de los pacientes con múltiples nevos melanocíticos y mejorar los conocimientos morfológicos de las lesiones pigmentadas, sobre todo desde un punto de vista dinámico. Gracias a este tipo de aparatos es posible disponer de un control evolutivo de las mismas, y se pueden apreciar cambios morfológicos en los nevos, tanto transitorios como permanentes, y ha sido posible identificar mecanismos de regresión diferentes al halo nevo clásico.

De este modo, en un trabajo preliminar hemos podido observar mecanismos de despigmentación sin halo clínico muy dispares, tanto en lo referente al tiempo que tardaban las lesiones en perder la pigmentación, como en las características morfológicas de los nevos melanocíticos durante el proceso de involución ²⁶. En algunos casos se ha apreciado una despigmentación homogénea, lenta, con características similares a las que se aprecia en los halo nevos, pero sin halo clínico. Por otro lado, también ha destacado la existencia de una variedad de nevos en los que la despigmentación se produjo de forma muy rápida, en muy pocos meses, en los que la principal característica dermatoscópica fue la presencia de una intensa melanofagia. Finalmente, también se ha evidenciado otro grupo de lesiones melanocíticas en las que tan sólo existió una regresión parcial de la lesión, homogénea u heterogénea.

La identificación de estos variados patrones de despigmentación de nevos melanocíticos, junto a la gran variabilidad en el tiempo con que se producen esas despigmentaciones, apoyaría la implicación de diferentes mecanismos en la regresión de estas lesiones. Un mejor conocimiento de los mismos puede esclarecer los motivos por los cuales algunos tumores regresan por completo mientras otros, como el melanoma, muestran regresión en el tumor primario de forma simultánea al desarrollo de metástasis a distancia.

Histológicamente, el fenómeno de regresión en un melanoma representa un proceso con una evolución continua que se inicia con la aparición de un infiltrado inflamatorio y que culmina con la presencia de fibrosis (**figura 1.2**). Los criterios para definir la regresión

histológica varían según los autores ⁹. Por otro lado, algunos dermatólogos proponen dividir este proceso continuo en varias fases.

La regresión suele empezar como un evento focal y puede englobar con posterioridad a toda la lesión melanocítica o sólo a segmentos de la misma, resultando en una variedad de manifestaciones clínicas. Por tanto, la regresión debería considerarse como un proceso dinámico en el que se produciría una interacción entre las células tumorales y el huésped, en la que influirían las características intrínsecas de las células neoplásicas, y la respuesta ante las mismas del sistema inmunológico y del estroma del paciente.

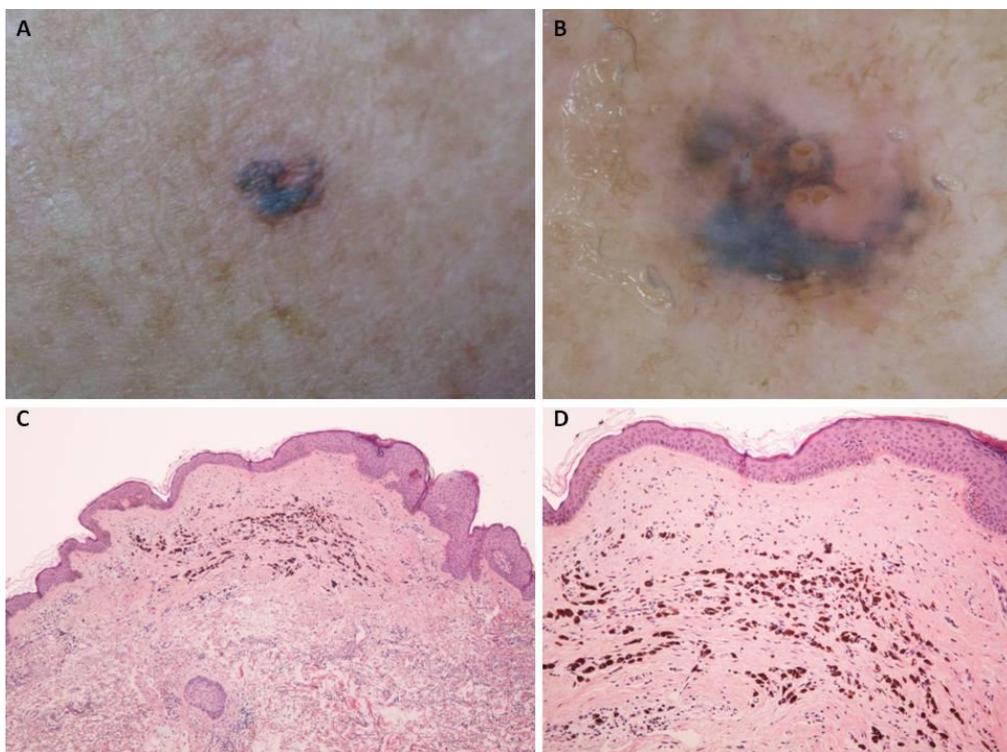


Figura 1.1. Ejemplo de regresión completa histológica en la que la imagen clínica y dermatoscópica no permite establecer con garantía el diagnóstico de la lesión involucionada. A: Imagen clínica de una lesión pigmentada irregular. B: Imagen dermatoscópica en la que se aprecia una lesión asimétrica y heterogénea, en la que predomina un área con velo azul blanquecino, junto a otra zona blanquecina sin estructuras visibles en su interior. C: Imagen panorámica histológica y; D: imagen a mayor aumento que muestra una ausencia completa de lesión melanocítica, con abundantes melanófagos y fibrosis dérmica. Hematoxilina-eosina, C x 25, y D x 200.

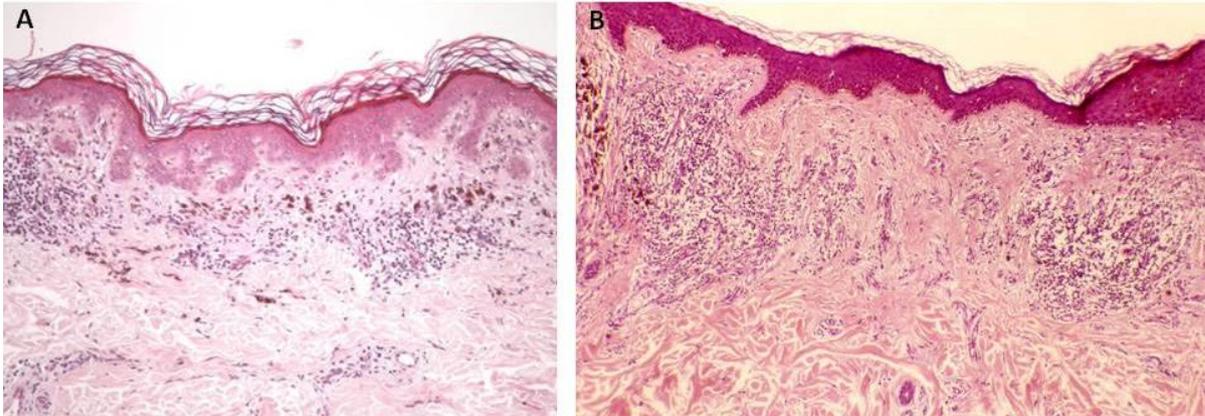


Figura 1.2. Elementos histopatológicos característicos de la regresión de una lesión melanocítica: presencia de infiltrado inflamatorio linfocitario, melanófagos, proliferación vascular, y fibrosis dérmica en la zona donde había previamente células tumorales. A: Nevo melanocítico; B: Melanoma. Hematoxilina-eosina, x 100.

1.2. SIGNIFICADO PRONÓSTICO DE LA REGRESIÓN.

La importancia de la regresión histológica como un determinante del comportamiento biológico del melanoma ha sido origen de gran controversia. Clásicamente se ha considerado que la regresión implica un peor pronóstico, al no poderse descartar que el grosor inicial del melanoma en la zona en que ha regresado sea superior al que sugiere el índice de Breslow del melanoma restante. Sin embargo, la mayoría de melanomas que experimentan regresión tienen un índice de Breslow pequeño y se hallan en fase de crecimiento radial^{27,28}, lo que indica que se produciría una activación precoz de la respuesta inmune.

La presencia de regresión implica por definición que existe destrucción de tejido tumoral. En este sentido, debería considerarse como un intento de proteger al organismo frente a la amenaza que constituye el tumor. Por tanto, representaría un mecanismo con una finalidad protectora para el organismo, mediante el cual éste intentaría eliminar las células tumorales, pero que no implicaría un buen pronóstico por sí mismo, ya que lamentablemente no siempre consigue su propósito.

Por tanto, se podría especular que los melanomas con regresión y una evolución clínica desfavorable, probablemente se deberían a que algunas células del melanoma han sido

capaces de vencer a los diversos mecanismos de protección frente al cáncer que posee el individuo.

El melanoma es, junto al carcinoma microcítico de pulmón, de los tumores que acumula un mayor número de mutaciones, lo que le confiere una extraordinaria capacidad para sobrevivir ²⁹. Por tanto, se trata de un tumor con una elevada capacidad de desarrollar múltiples mecanismos de escape frente a la vigilancia a la que son sometidas sus células por el sistema inmune, al igual que manifiesta resistencia a la quimioterapia.

Para algunos autores, la existencia de una regresión extensa en melanomas se asocia a un mayor riesgo de desarrollo de metástasis. Este aparente mal pronóstico se ha intentado justificar en base a distintas hipótesis:

Selección de tipos celulares menos diferenciados:

En primer lugar, se ha especulado con que la destrucción inicial del melanoma en regresión, inducida por el infiltrado inflamatorio, podría provocar que se seleccionen clones de melanocitos más agresivos, con un comportamiento imprevisible y potencialmente metastásicos. De este modo, el aumento de la respuesta inmune en el tumor se asociaría a una progresión de los tipos celulares menos diferenciados, con destrucción de las células “menos agresivas”, las que tienen menos capacidad de diseminación ³⁰.

En algunos melanomas se pueden activar los mecanismos del sistema inmunológico para lograr una respuesta inmune temprana frente a los antígenos tumorales, mientras que en otros, este hecho puede no suceder ^{31,32}. Al primer grupo pertenecerían los casos en los que se observan infiltrados de linfocitos que están localizados en las áreas de regresión tumoral, y que son capaces de destruir células de melanoma. Este hallazgo sugiere que, durante el crecimiento primario, la respuesta inmune de los linfocitos T promueve una inmunoselección que elimina una parte de las células integrantes del tumor, perdurando las células que no expresan los antígenos frente a los que se ha inducido la respuesta inmune y que son las que pueden originar las metástasis de células no reconocibles por el sistema inmunológico.

Por tanto, una regresión espontánea parcial puede indicar una fase de progresión del tumor en la cual el genoma del mismo sufre un extenso remodelado, pagando el tributo de una aniquilación temporal pero ganando en última instancia la recompensa hacia la inmortalidad.

Desarrollo de mecanismos de escape:

Además de las alteraciones genéticas específicas predisponentes, resulta esencial la vigilancia que ejerce el sistema inmune sobre las células tumorales del melanoma para controlar las neoplasias incipientes. La transformación con capacidad metastásica, también puede ser consecuencia de las argucias que esas células desarrollan para escaparse del control inmunológico³⁴.

Por tanto, la falta de respuesta al ataque por los linfocitos T en los melanomas también podría deberse a que los clones del melanoma no sean inmunogénicos, o bien incluso en el caso de que el tumor fuera potencialmente antigénico, a alguno de los múltiples mecanismos conocidos que son capaces de desarrollar las células malignas para evitar el reconocimiento y destrucción mediado por linfocitos T, entre los que puede incluirse, la existencia de un defecto en las células presentadoras de antígeno causado por las radiaciones ultravioleta³⁰. Por otro lado, es conocido que el melanoma expresa en su progresión moléculas que contribuyen a facilitar un crecimiento local y a distancia, modificando la matriz tisular o induciendo alteraciones vasculares, pero también suprimiendo la respuesta efectora del sistema inmune.

El desarrollo de mecanismos de escape frente al sistema inmunitario también está contrastado con la ausencia de regímenes de inmunoterapia eficaces a pesar de ser una neoplasia muy inmunogénica, y sería uno de los principales motivos por los que fallan las vacunas del melanoma. Esta situación está cambiando en los últimos años debido principalmente a la introducción y efectividad de los inhibidores del antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4) y de la proteína de muerte programada 1 (PD-1).

Inicio tardío de la regresión:

También cabría la posibilidad de que la regresión pudiera iniciarse en algunos casos de forma tardía, cuando algunas células tumorales ya se hubieran diseminado por invasión linfovascular. Se ha demostrado que la presencia de células de melanoma en los ganglios linfáticos puede estimular una respuesta inmune contra antígenos frente a los que el organismo era inicialmente tolerante, que puede inducir la regresión de la lesión primaria³⁵.

En la literatura, la mayoría de estudios sobre la regresión de lesiones melanocíticas se centran en melanomas. Otro argumento que justificaría que la regresión no constituiría un determinante de un comportamiento biológico más agresivo para el organismo es el hecho de que no existen casos documentados de lesiones melanocíticas benignas con regresión que luego hayan dado metástasis. De hecho, incluso la regresión extensa o completa de los nevos melanocíticos convencionales o displásicos no modifica el pronóstico del paciente ³⁶.

Como se ha comentado anteriormente, la regresión es un proceso dinámico y, por lo tanto, con hallazgos histológicos diferentes e incluso solapados según el momento en que la estudiemos, que se inicia con un infiltrado inflamatorio acompañante. La existencia de este infiltrado inflamatorio informa de que se ha producido una respuesta del sistema inmunitario del huésped frente al tumor. Esta respuesta podrá ser efectiva o no, según sea capaz de frenar el crecimiento del tumor o conseguir su regresión parcial o completa. De hecho, la mera presencia de inflamación aislada, en forma de un infiltrado linfocitario denso en un melanoma en fase de crecimiento vertical, se acepta actualmente como un factor de buen pronóstico ³⁷.

Algunos autores han especulado con que la regresión avanzada sí que podría implicar un peor pronóstico y, consecuentemente, ésta podría ser la causa de que encontremos resultados tan contradictorios entre los distintos estudios. Por tanto, la regresión podría tener un significado pronóstico diferente dependiendo de la fase cronológica en la que fuera valorada: favorable en las iniciales y negativo en las avanzadas.

A pesar de esta hipótesis, en un estudio reciente de lesiones melanocíticas con regresión, en las que la característica histopatológica esencial era la presencia de fibroplasia florida, propia de un estadio tardío, objetivamos que la presencia de esta variedad de fibrosis no se debería a una predisposición genética del paciente para generar nevos displásicos o melanomas, ya que se apreciaba con más frecuencia en nevos melanocíticos sin displasia y un 83% de esos pacientes no tenía antecedentes personales de nevos displásicos, ni tampoco se asociaría a un comportamiento biológico más agresivo de los melanomas en los que se encuentra ^{38,39}.

Como conclusión, los mecanismos de regresión engloban una compleja interacción de diversos procesos entre los cuales el más destacado sería la respuesta inmune, con la finalidad en última instancia de proteger al organismo frente al cáncer.

En algunas ocasiones se conseguiría una eliminación tumoral total, con lo que el organismo lograría su propósito. Desafortunadamente, son más frecuentes los casos en los que la destrucción tumoral es sólo parcial, ya sea porque el mecanismo se inicia demasiado tarde, cuando las células con capacidad de producir metástasis ya han invadido vasos linfáticos o sanguíneos, porque las células malignas desarrollan diversos mecanismo de escape a la presión producida por el sistema inmune, o porque se destruyen las células tumorales “menos agresivas”, permitiendo que proliferen las que tienen más capacidad de generar metástasis.

1.2.1. Revisión de los principales estudios que relacionan la regresión con el pronóstico en el melanoma.

Principales estudios que sugieren que la regresión en el melanoma constituye un factor de mal pronóstico.

Existen diversos estudios que demuestran que la regresión es un factor de mal pronóstico en el melanoma cutáneo primario, especialmente en melanomas delgados.

En el trabajo de Paladugu et al ⁴⁰, en el que se estudiaron 36 melanomas delgados (Breslow <0,76 mm), se demostró que un 45,5% de las lesiones con regresión metastatizaron, comparado con el 12% de las que no mostraban regresión.

Sondergaard et al ⁴¹, evaluando 486 pacientes con melanoma en estadio I e índice de Breslow <1 mm, verificaron que la supervivencia a los 10 años de los individuos cuyas lesiones presentaban regresión fue considerablemente inferior a la de los pacientes sin evidencia de regresión (79% y 95% respectivamente).

El grupo de Ronan et al ⁴² examinó 103 melanomas delgados (Breslow <0,76 mm) y halló que 30 (29%) tenían regresión. De ese grupo de pacientes, 6 (20%) desarrollaron metástasis viscerales, mientras que ninguno de los 73 pacientes con melanomas sin regresión tuvo metástasis.

Singluff et al ⁴³ revisaron una serie de 681 melanomas con índice de Breslow <0,76 mm y observaron que el 40% de los casos que metastatizaron mostraron regresión severa,

definida por los autores como una marcada fibrosis junto a la ausencia total o casi total de melanocitos, frente a un 17% de los casos no metastásicos. El porcentaje de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años fue del 72% en el grupo con fibrosis prominente, frente a un 94% en el grupo sin regresión o con regresión caracterizada por inflamación aislada (sin fibrosis o con una fibrosis discreta en la dermis papilar).

Morton et al ⁴⁴ hallaron que la regresión, junto a otros factores como una edad inferior a 40 años, presencia de ulceración y un nivel IV de Clark, aumentaba el riesgo de padecer metástasis en el ganglio centinela en melanomas primarios delgados.

Olah et al ⁴⁵ analizaron 134 pacientes con melanomas con índice de Breslow ≤ 2 mm a los que se les había realizado un estudio del ganglio centinela, y apreciaron un mayor riesgo de metástasis ganglionar en el grupo de pacientes con regresión (64%) que en aquellos sin regresión (15%).

Gromet et al ⁴⁶ observaron que un 22% de sus melanomas con índice de Breslow $< 0,76$ mm con regresión metastatizaron, frente a sólo un 2% de metástasis en los casos sin regresión.

En el estudio de Guitart et al ⁴⁷ se compararon 43 melanomas delgados metastásicos con 42 melanomas controles sin metástasis, que tenían características similares referentes a la edad, sexo, localización e índice de Breslow. El 42% de los melanomas metastásicos mostró una regresión extensa ($> 50\%$), mientras que sólo hallaron regresión extensa en un 5% de los melanomas no metastásicos.

Clark et al ⁴⁸ evidenciaron que la presencia de regresión es un factor predictivo de mal pronóstico en melanomas en estadio I, ya que en 90 melanomas con regresión la supervivencia tras 8 años fue del 60%, frente a un 77% en 174 melanomas sin regresión.

Blessing et al ⁴⁹ compararon melanomas de pacientes que habían desarrollado metástasis y que tenían un índice de Breslow $< 1,5$ mm con controles libres de enfermedad a los 6 años, y hallaron que 13 de los 26 casos metastásicos mostraron regresión, frente a 1 de los 40 controles.

Una de las series más extensas es la estudiada por Kelly et al ⁵⁰, con 844 pacientes con melanoma a los que separaron en tres grupos en función del índice de Breslow ($< 0,76$ mm, entre 0,76 y 1,5 mm y $> 1,5$ mm respectivamente). A pesar de que no encontraron

diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia a los 5 años en los casos con regresión, el porcentaje de metástasis en el grupo de melanomas delgados con regresión era de un 7,2%, y en el grupo sin regresión del 3,8%.

Principales estudios que sugieren que la regresión en el melanoma constituye un factor de buen pronóstico.

Por el contrario, otros autores consideran la regresión en el tumor primario como un marcador de pronóstico favorable, y se ha demostrado en numerosos estudios que no se asocia a un riesgo aumentado de metástasis en el ganglio centinela.

Trau et al ⁵¹ estudiaron una serie de 41 melanomas delgados (Breslow <0,76 mm) con evidencia de regresión, de los cuales sólo uno metastató.

En el estudio de Brogelli et al ⁵² con 201 melanomas en estadio I, 67 tuvieron regresión. Aunque el 48% de los melanomas con un índice de Breslow $\leq 0,75$ mm tenían regresión, comparado con el 12% de los melanomas con un Breslow >3 mm, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el período libre de enfermedad y la supervivencia global. Las metástasis se desarrollaron en un 19,4% de los pacientes con melanomas con regresión, comparado con el 29,8% de los pacientes con melanomas sin regresión.

Merece especial interés el trabajo de Ribero et al ⁵³, que con una casuística amplia de 1693 pacientes con melanoma invasor en estadios I-II, analizaron el ganglio centinela en 182 de 349 pacientes con regresión en el tumor primario (52,1%), y en 474 de 1344 (35,3%) melanomas sin regresión. El estudio del ganglio centinela se realizó en 104 de 223 pacientes con un melanoma con grosor <1 mm y regresión.

Durante el seguimiento, encontraron progresión en un 20,5% de sus pacientes, aunque la presencia de regresión histológica se asoció de forma significativa con una reducción en el riesgo de progresión del melanoma. Sólo 33 de 349 pacientes con regresión (9,5%) mostró una progresión de la enfermedad comparado con los 314 de 1344 pacientes sin regresión (23,4%). Tampoco hubo diferencias en el porcentaje de recidivas entre los pacientes sin metástasis en el ganglio centinela (135 de 656; 20,5%) al compararlos con los pacientes en los que no se realizó el estudio del ganglio centinela (212 de 1037; 20,4%).

La presencia de regresión en el tumor primario se asoció de forma estadísticamente significativa con una menor incidencia tanto de metástasis en tránsito (3,1% frente a un 6%), como de metástasis ganglionares (4% frente a un 8,8%) o metástasis a distancia (2,3% frente a un 8,5%). Durante el seguimiento sólo fallecieron un 5,8% de los pacientes que tuvieron melanomas con regresión, comparado con un 13% de los pacientes con melanomas sin regresión.

Para estos autores la regresión aislada no debería ser una razón por sí misma para realizar el estudio del ganglio centinela en melanomas delgados. Por el contrario, la regresión puede considerarse un factor de pronóstico favorable en cuanto a la supervivencia global y a la supervivencia libre de enfermedad en melanomas en estadios I y II.

Morris et al ⁵⁴ también revisaron una serie amplia de 1349 melanomas cutáneos primarios, de los cuales se realizó el estudio del ganglio centinela en 931. Éste fue positivo con más frecuencia en los casos sin regresión (18%) que en aquellos con regresión (10%).

Fontaine et al ⁵⁵ analizaron 97 melanomas en los que habían realizado el estudio del ganglio centinela, y no encontraron evidencia de un riesgo incrementado de metástasis en el ganglio centinela en los pacientes con regresión respecto a aquellos que no la presentaban (29% de positividad en ambos grupos).

Kaur et al ⁵⁶, en un grupo de 146 melanomas en los que conocían el estado del ganglio centinela, encontraron 17 ganglios centinelas positivos, de los cuales 13 correspondían a casos sin regresión y 4 a casos con regresión.

McGovern et al ⁹ revisaron 353 pacientes con melanomas delgados de hasta 0,7 mm de grosor. Los melanomas con regresión metastatizaron con una frecuencia ligeramente superior que los que no la tenían (8 y 5% respectivamente), pero la supervivencia a 10 años era en prácticamente idéntica en ambos grupos.

Cooper et al ⁵⁷ también concluyeron su estudio afirmando que la regresión no tenía importancia pronóstica en la mayoría de melanomas delgados, y al igual que White et al ⁵⁸, demostraron que la presencia de regresión se asociaba con una menor probabilidad de metástasis en el ganglio centinela.

El trabajo de Ma et al ⁵⁹ demostró que la regresión en el melanoma y un aumento de las células dendríticas en la lesión primaria se asociaban de forma significativa con una menor afectación del ganglio centinela. Estos autores hallaron que el perfil inmune del melanoma primario predice el desarrollo de metástasis en el ganglio centinela. Adicionalmente, la presencia de regresión en el tumor primario estaba asociada a un riesgo reducido de progresión ganglionar.

Liszky et al ⁶⁰ analizaron la presencia de células circulantes de melanoma, de forma preoperatoria, en 94 pacientes a los que se realizó un estudio del ganglio centinela. Evidenciaron la presencia de células circulantes en 5/26 (19,2%) melanomas con regresión, y en 19/68 (29,4%) de melanomas sin regresión. La mayoría de melanomas con regresión mostraron en el análisis multivariante que tan sólo el índice de Breslow y la ulceración, pero no la regresión, fueron predictores de la presencia de metástasis en el ganglio centinela.

Motivos de la discrepancia entre los diferentes estudios.

Las causas que podrían justificar la discrepancia existente entre los distintos estudios han sido motivo de análisis.

La ausencia de estandarización de los criterios para el diagnóstico histopatológico de la regresión, y la pobre reproductibilidad entre distintos observadores son algunas de las razones que justificarían los resultados discordantes de los diferentes estudios ^{61,62}.

No existe un consenso en la definición exacta de regresión histológica y en cómo debe medirse. Algunos autores defienden que sólo debe considerarse como melanoma en regresión aquel que tiene un 75% o más de su extensión horizontal afectada ⁶³. En otros trabajos se incluyen todos los casos que muestran algún grado de regresión y se subdividen en melanomas con regresión parcial si ésta es menor del 50%, o extensa si afecta al 50% o más de la extensión horizontal del mismo ^{64,65}. Finalmente, otros estudios consideran la regresión sólo cuando ésta es completa ⁶⁶⁻⁶⁸.

Lo mismo sucede con las fases de la regresión, ya que algunos estudios consideran regresión sólo cuando se aprecia una reducción marcada o una ausencia completa de melanocitos en presencia de una fibrosis prominente, mientras otros incluyen también la fase activa, en la que la fibrosis es escasa o ausente y predomina el infiltrado inflamatorio ^{66,68}.

Dependiendo de los criterios empleados, la estimación de melanomas delgados que muestran regresión pero no metástasis es muy variable, ya que puede oscilar entre un 7 y un 61%, mientras que la estimación de melanomas metastásicos delgados con regresión también puede variar entre un 40 y 100% ⁴⁷.

El efecto de la regresión también puede diferir al correlacionarse con otros factores pronósticos. Se ha sugerido que la presencia de metástasis de melanoma en un ganglio linfático regional podría estimular una amplificación de la respuesta inmune, provocando la regresión de la lesión primaria ^{35,69}, o incluso de otras lesiones no malignas que compartan los mismos antígenos que han desencadenado la respuesta inmune ^{70,71}.

Además también sería necesario definir criterios estándares para diferenciar la regresión de otras respuestas del estroma ⁷².

Como se deduce de todo lo referido anteriormente, parece evidente que hasta la fecha no está completamente esclarecida la relevancia de la regresión en el pronóstico del melanoma.

Como conclusión, la histología no soluciona el problema de conocer con antelación cuál va a ser el comportamiento biológico de la lesión melanocítica en la que hay regresión, aunque debería considerarse con precaución cuando se evalúa en los melanomas, ya que podría enmascarar un mayor espesor tumoral y modificar el pronóstico.

Por tanto, la regresión histológica aislada no debería ser considerada como un marcador que de forma categórica implique un mal pronóstico en el melanoma.

El descubrimiento de marcadores moleculares o un mejor conocimiento de los mecanismos involucrados en su desarrollo podrían aclarar qué melanomas con regresión tendrán un comportamiento biológico agresivo o no.

1.3. DEFINICIÓN DE LA REGRESIÓN.

La regresión se puede definir tanto desde un punto de vista clínico, mediante el examen directo de la lesión o utilizando técnicas como la dermatoscopia, y por supuesto, desde una vertiente histopatológica.

1.3.1. Regresión desde un punto de vista clínico.

Clínicamente, la regresión se definiría por la pérdida de pigmento en una porción o incluso en la totalidad de una lesión melanocítica, que se manifestaría por la presencia de áreas con colores que varían entre blanco, azulado, rojizo y gris (**figura 1.3**).



Figura 1.3. Melanoma de extensión superficial en la pierna con un área extensa de regresión, que se manifiesta como una región de coloración blanquecina. Índice de Breslow 0,42 mm.

La dermatoscopia muestra fundamentalmente 3 tipos de patrones asociados a la regresión, que se identifican en función de su coloración y se pueden clasificar como “regresión blanca”, “regresión azul” y “regresión mixta” ⁷³⁻⁷⁵ (**figuras 1.4 y 1.5**). Las áreas de regresión blanca son estructuras con pigmentación blanquecina más o menos delimitada, que en ocasiones recuerdan a una cicatriz superficial, por lo que también se denominan “áreas blancas pseudocicatriciales”. Histopatológicamente se correlacionan con la presencia de una dermis engrosada y fibrosis ⁷⁶.

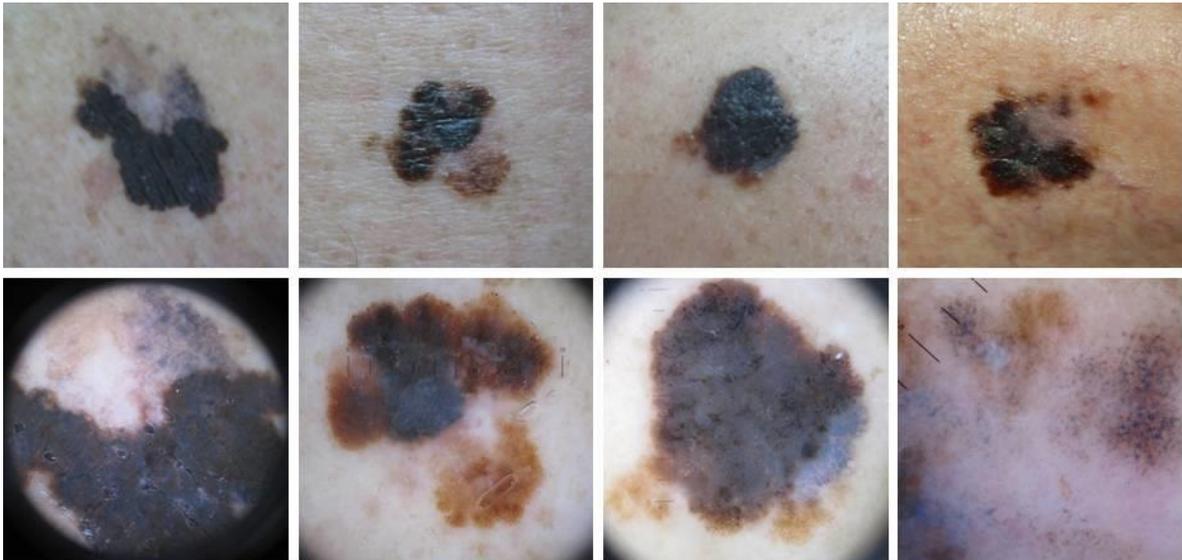


Figura 1.4. Imagen clínica (superior) y dermatoscópica (inferior) de diversos melanomas con regresión, que se manifiesta como áreas blanquecinas, azuladas o grisáceas.



Figura 1.5. Imagen clínica (superior) y dermatoscópica (inferior) de diversos nevos melanocíticos con regresión, que también se manifiesta como áreas blanquecinas, azuladas o grisáceas.

Las áreas de regresión azul están constituidas por el denominado “velo azul-gris”, o por las “áreas con punteado azul o con gránulos de pimienta”. El velo azul-gris está constituido por un área compacta de pigmentación azulada o azul-grisácea, mientras que las áreas con múltiples puntos azulados, son zonas de la lesión con pigmentación azul menos confluyente que en el caso del “velo azul-gris” y con un punteado fino en su

interior. Las áreas azules de regresión corresponden histopatológicamente a melanófagos ⁷⁶.

La presencia de estructuras vasculares en el seno de áreas blancas pseudocicatriciales también es un hallazgo habitual en las áreas de regresión. En el caso del melanoma, dado que habitualmente se trata de vasos perpendiculares a la superficie epidérmica es frecuente que se observen vasos puntiformes ⁷⁷.

La observación clínica o dermatoscópica de regresión justifica en muchas ocasiones la extirpación de una lesión melanocítica. La regresión en más del 50% de una lesión melanocítica, o la presencia de regresión mixta (azul y blanca), se asocia a melanoma, por lo que es aconsejable la extirpación de las lesiones melanocíticas que presenten esas características ^{78,79}. Aunque las áreas de regresión se asocian a melanoma, también se encuentran presentes en nevos atípicos e incluso en nevos melanocíticos convencionales traumatizados (**figura 1.6**), así como en lesiones no melanocíticas como queratosis actínicas y queratosis liquenoides ²⁶.

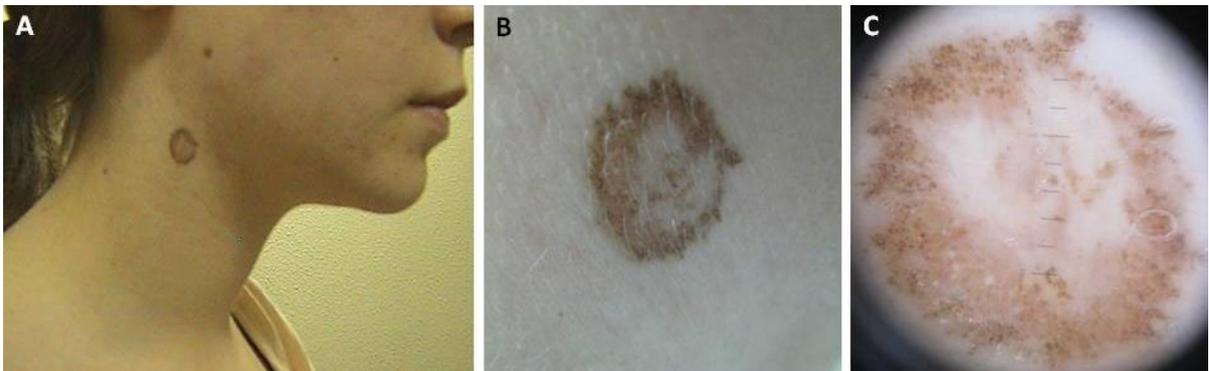


Figura 1.6. Nevo melanocítico congénito en el cuello que muestra un área extensa de regresión como consecuencia de un traumatismo.

1.3.2. Regresión desde un punto de vista histológico.

Histológicamente, el fenómeno de regresión representa una evolución continua de un mismo proceso, que se inicia con la aparición de un infiltrado inflamatorio y culmina con la presencia de fibrosis.

A nivel histológico, la regresión se definiría por la sustitución de la población celular tumoral por un estroma fibroso, con escasos o nulos melanocitos tumorales, pero con melanófagos, linfocitos, y vasos neoformados. En las fases iniciales o activas de la regresión predomina la inflamación, con presencia de abundantes linfocitos que infiltran las células neoplásicas y fragmentan el tumor en pequeños nidos. En esta fase no se aprecia fibrosis, pero sí pueden aparecer melanófagos en cantidad variable. La capa basal de la epidermis suele estar vacuolada y con queratinocitos o melanocitos degenerados fruto de la apoptosis de los mismos, que se observan como pequeños glóbulos eosinófilos. Habitualmente, en las fases tardías, el área de regresión muestra una epidermis atrófica suprayacente, que ha perdido su red de crestas o se han aplanado, y que contiene ocasionalmente algunos melanocitos supervivientes y en ocasiones incluso una hiperplasia melanocítica. La dermis papilar en estas fases tardías se encuentra ocupada por fibrosis colágena, y también pueden verse vasos dilatados o una proliferación de vasos sanguíneos perpendiculares a la superficie con distintos grados de edema, y algunos melanófagos acompañantes ^{27,80}.

Fases de la regresión histológica en el melanoma

Los cambios histológicos que se aprecian en la regresión forman un espectro continuo, dado que muy frecuentemente se solapan características de fases diferentes en una misma biopsia, por lo que, aunque ésta se puede dividir arbitrariamente en distintas fases, esta división no es realista ni práctica en algunas ocasiones (**figura 1.7**)⁹.

Algunos autores como Massi y Leboit ⁶³ reconocen una fase de regresión precoz o temprana (inflamatoria) que denominan “melanoma en regresión” y una tardía (cicatricial), a la que llaman “melanoma regresado”.

- ***Fase precoz o activa (inflamatoria):*** la regresión activa se caracteriza por la presencia de densos infiltrados linfocitarios en la dermis, de localización peri e intratumoral, que se mezclan con las células neoplásicas y fragmentan el tumor en pequeños nidos, con apoptosis y pérdida de células tumorales. Este infiltrado puede ser liquenoide, englobando en ocasiones la mayor parte de la lesión. También se observan melanófagos en cantidad variable.
- ***Fase tardía o antigua (cicatricial):*** se aprecia una zona de reducción marcada o completa de la masa tumoral, que es reemplazada por una densa fibrosis. Así mismo, se observa una proliferación de vasos sanguíneos, generalmente perpendiculares a la superficie, y aplanamiento de las crestas interpapilares, junto a un número variable de melanófagos y escasos o ausentes linfocitos. Salvo la fibrosis, no se considera imprescindible ninguno de los otros rasgos histopatológicos para el diagnóstico de esta fase.

Otros autores como Kang et al ⁸¹ proponen diferenciar 3 fases: inicial, intermedia y tardía:

- ***Fase inicial:*** se aprecian densos infiltrados de linfocitos que alteran o destruyen algunos nidos de células tumorales dentro de la dermis papilar. En esta fase, aunque pueden aparecer melanocitos degenerados, se puede observar una zona de tumor aún reconocible en la dermis papilar y en la epidermis, y aún no existiría fibrosis.
- ***Fase intermedia:*** en esta fase existe todavía una zona de tumor reconocible, y en las áreas en las que éste ha sido reemplazado, se observa fibrosis junto a linfocitos, melanofagia y neovascularización.
- ***Fase tardía o antigua:*** la masa tumoral muestra una marcada reducción o incluso existe una ausencia completa de la misma. Se aprecia fibrosis en la dermis junto a un grado variable de melanófagos y formación de nuevos vasos. Los infiltrados linfocitarios están ausentes o bien dispersos.

En cualquier caso, dado que la concordancia entre observadores disminuye cuando se divide la regresión en estos tres subgrupos cronológicos, parece poco práctico dividir la regresión en tantas fases ⁸².

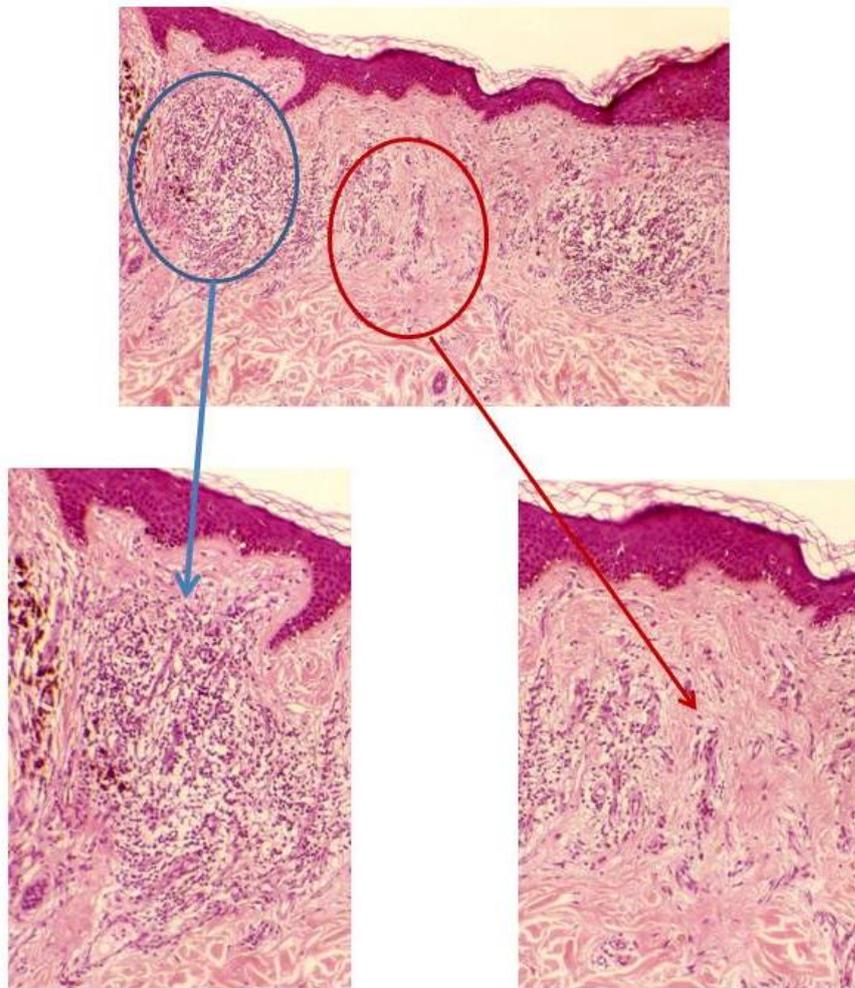


Figura 1.7. Imagen histológica de una misma biopsia que muestra tanto la presencia de fase activa (círculo azul), caracterizada por la presencia de infiltrado linfocitario y melanófagos, y de fase tardía (círculo rojo) caracterizada por fibrosis de la dermis.

1.4. MECANISMOS DE REGRESIÓN DE LAS NEOPLASIAS CUTÁNEAS MELANOCÍTICAS Y EPITELIALES.

Tal como apuntábamos al principio de este trabajo, la regresión espontánea de tumores malignos es un fenómeno extremadamente raro y enigmático, que puede observarse hasta en 1:140000 cánceres ^{6,83}.

Puede producirse en cualquier tipo de neoplasia, aunque es más frecuente en el melanoma, retinoblastoma, carcinoma renal, y en trastornos linfoproliferativos.

La inducción de regresión tumoral engloba múltiples mecanismos complejos e interrelacionados, entre los que se encuentran la respuesta inmune, la diferenciación terminal, la apoptosis, la crisis genómica o la senescencia replicativa ⁴⁻⁶.

Un mejor conocimiento de las principales vías moleculares implicadas en el desarrollo de la regresión de las lesiones malignas puede ayudar a entender los motivos por los cuales algunos tumores regresan completamente mientras otros, en cambio, sólo lo hacen de forma parcial. Los diferentes mecanismos que conducen a la regresión tumoral también pueden estar relacionados con el pronóstico de los pacientes, y como sucede en el melanoma, pueden ayudar a explicar por qué es posible apreciar regresión en el tumor primario de forma simultánea a la presencia de metástasis a distancia. Del mismo modo, puede ser de gran ayuda en el desarrollo de nuevas dianas terapéuticas para el melanoma.

1.4.1. RESPUESTA INMUNE.

Es conocido el papel fundamental del sistema inmune en evitar el desarrollo de procesos tumorales y eliminarlos cuando éstos se han producido ^{84,85}. De ahí que los síndromes que asocian inmunosupresión tengan una mayor incidencia de neoplasias. Por otro lado, se han observado diversas manifestaciones autoinmunes de forma concomitante con la regresión espontánea de tumores ⁸⁶.

En relación al melanoma, existen numerosas evidencias clínicas e histológicas que sugieren que existe una interacción entre esta neoplasia y el sistema inmune del huésped, por lo que la explicación más aceptada en la actualidad sobre la regresión es

que el mecanismo inmune sería el que está implicado de forma más consistente en la mayoría de los casos.

De todos los tumores, el melanoma es uno de los que tienen un mayor índice de regresión espontánea total, y se aprecia regresión parcial hasta en el 35% de los casos ^{87,88}.

Por otro lado la presencia de fenómenos inflamatorios como nevos de Meyerson o halo nevos, junto a las diferencias pronósticas en aquellos pacientes que desarrollan vitíligo o presentan infiltrados linfocitarios densos en su fase de crecimiento vertical, también justificarían el desarrollo de una respuesta inmune en pacientes con melanoma ⁸⁹⁻⁹⁴.

El sistema inmunitario, a través de sus células efectoras, los linfocitos T citotóxicos y las células "asesinas naturales" (*natural killer*), elimina las infecciones virales o se enfrenta al desarrollo tumoral induciendo apoptosis de las células infectadas o tumorales, respectivamente. En el caso de los linfocitos T citotóxicos, éstos reconocen antígenos virales o tumorales a través de su receptor específico de antígeno en asociación con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I propio ^{95,96}. Este reconocimiento conduce a la activación funcional de los linfocitos T citotóxicos y ello provoca la muerte por apoptosis de la célula infectada o tumoral.

La inmunidad innata aparece durante el desarrollo inicial del sistema inmunitario, y sus componentes están diseñados para reconocer agentes invasores externos al organismo, sin necesidad de adaptaciones. La citocina fundamental de este tipo de inmunidad es el factor de necrosis tumoral (TNF), que induce una notable inflamación y la necrosis de tumores. A nivel celular, la inmunidad innata viene mediada por las células *natural killer* (NK) y los linfocitos NK, que identifican y son capaces de destruir las células tumorales en las que no se expresa el MHC, un fenómeno que sucede con frecuencia en el melanoma, tanto por la pérdida del gen de la microglobulina β_2 como por la falta de expresión de éste.

Por otro lado, la inmunidad adaptativa incluye los linfocitos T y los anticuerpos producidos por los linfocitos B. Las características básicas de la inmunidad adaptativa son su especificidad y su memoria. Cuando un antígeno tumoral es reconocido como tal por los linfocitos B y T, éstos se expanden y se activan, dando lugar a una respuesta específica de alta afinidad.

Hoy en día se acepta que la respuesta celular mediada por linfocitos T es la principal implicada en la destrucción de los tumores ya establecidos ^{97,98}. Sin embargo es posible

que en las etapas iniciales de la diseminación metastásica, los anticuerpos anti-células tumorales también puedan ejercer un papel estabilizador, esencial para evitar esa diseminación.

La estimulación de una respuesta específica de células T tiene varias ventajas. Primero, las células T pueden destruir cualquier célula tumoral que exprese el antígeno que reconocen, independientemente de la región corporal en la que se encuentren. Adicionalmente, las células T pueden continuar proliferando en respuesta a proteínas inmunogénicas hasta la destrucción completa de todas las células tumorales. Finalmente, se puede generar una memoria inmunológica que permite eliminar tumores que recurran si comparten los mismos antígenos tumorales ⁹⁹.

1.4.1.1. Biología de la célula tumoral y sus interacciones con el sistema inmunitario.

La etiopatogenia del melanoma se caracteriza por la acumulación de alteraciones genéticas en los sistemas moleculares que regulan la activación y proliferación de las células que sufren la transformación neoplásica. En el crecimiento local y diseminación sistémica participan diversos mecanismos del huésped, que pueden favorecerlo o suprimirlo. Por tanto, la enfermedad debe enfocarse desde dos perspectivas distintas pero relacionadas: las características intrínsecas de las células malignas y las interacciones de las células neoplásicas con el huésped.

La célula neoplásica se caracteriza por una biología descontrolada, con intensa capacidad de proliferación. Las anomalías en el sistema de control del ciclo celular y su metabolismo conllevan la síntesis de nuevas moléculas, inéditas para el organismo y potencialmente reconocibles por el sistema inmunitario, que constituyen los denominados antígenos asociados a tumor.

El huésped modula el crecimiento de las células tumorales a través de diversos mecanismos. La acción del sistema inmunitario contra la célula neoplásica comienza con el reconocimiento de los antígenos tumorales, seguida por el desencadenamiento de complejos fenómenos de activación de los linfocitos T y B, de las células accesorias, y de las células NK.

Las células dendríticas son las células profesionales presentadoras de antígenos del sistema inmunitario. Tienen la capacidad de iniciar y mantener la respuesta inmunitaria

contra la célula tumoral. Se ha observado que las células dendríticas en los pacientes con melanoma están cuantitativa y cualitativamente disminuidas a causa del efecto inmunosupresor del tumor. Inicialmente las células dendríticas penetran en el tumor e internalizan el antígeno tumoral mediante fagocitosis, endocitosis o pinocitosis. Posteriormente el antígeno es procesado y expresado en la superficie celular a través de los MHC. Las células dendríticas desarrollan un proceso de maduración regulado por diferentes citocinas. Durante todo este proceso deben adquirir la capacidad de migrar al ganglio linfático donde presentan el antígeno tumoral a los linfocitos T cooperadores. Dichos linfocitos reconocen al antígeno tumoral y amplifican la respuesta inmunitaria a través de la secreción de diversas citocinas que activan tanto a los linfocitos T citotóxicos como a los linfocitos B, que tras su diferenciación a células plasmáticas secretan inmunoglobulinas, y también a las células NK, que son las que conducen a la lisis de las células tumorales.

Las células dendríticas maduras expresan, además del MHC que interacciona con el receptor de células T, moléculas coestimuladoras que interaccionan con receptores de células T adicionales. La combinación de señales a través de interacciones MHC-receptor de célula T, y de la molécula B7 con el receptor CD28 activa la respuesta del linfocito T ⁸ (**figura 1.8**).

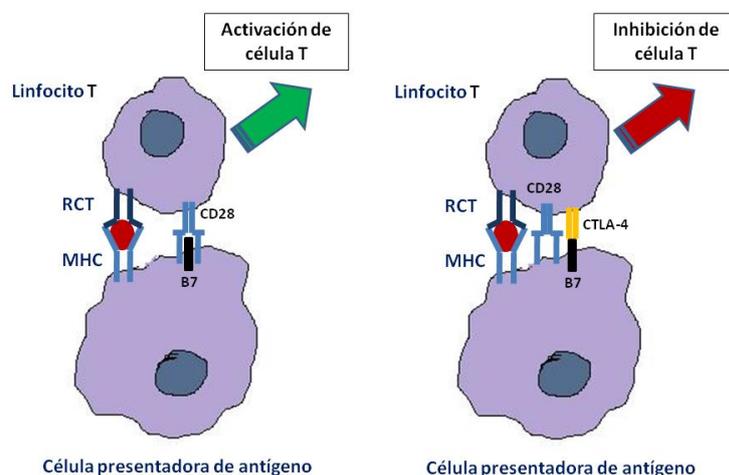


Figura 1.8. La imagen de la izquierda representa de forma esquemática como para la activación de la célula T se requiere además de la interacción entre el MHC de la célula dendrítica con el receptor de la célula T, moléculas coestimuladoras que se unen a receptores de células T adicionales, como el CD28. Moléculas como el CTLA-4, al impedir la unión entre CD28 y B7 provocan la inhibición del linfocito T (imagen de la derecha). RCT: receptor de célula T; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

El desarrollo del melanoma supone un fracaso de la capacidad defensiva del sistema inmunitario. En dicho fracaso participan factores propios de las células tumorales, que pueden enmascarar la expresión de sus antígenos tumorales o incrementar su proliferación por encima de la capacidad lítica del sistema inmunitario, y alteraciones propias del sistema de defensa en su capacidad de reconocimiento de antígenos o en su capacidad para llevar a cabo su función efectora.

1.4.1.2. Antígenos de melanoma identificados por linfocitos T intratumorales.

Existen varios antígenos asociados a melanoma que pueden ser reconocidos por linfocitos T citotóxicos que infiltran el tumor. Hasta la fecha se han identificado cuatro grupos fundamentales de antígenos ^{8,100-102}:

- **Genes que codifican antígenos de diferenciación presentes tanto en los melanocitos como en las células de melanoma:** el grupo de antígenos que se detecta con más frecuencia en pacientes con melanoma está constituido por los denominados antígenos de diferenciación o antígenos asociados al tipo de tejido. A esta categoría pertenecen los antígenos melanosómicos Mart-1/Melan A, gp100 y tirosinasa ¹⁰³. Los genes que codifican estos antígenos, no se expresan sólo en los melanomas, sino también en melanocitos normales y en el epitelio pigmentario de la retina, por lo que pueden ser considerados como autoantígenos ^{70,71,96,104,105}. De hecho, en pacientes con melanoma pueden aislarse en sangre periférica, ganglios linfáticos y tejido tumoral linfocitos T citotóxicos específicos contra este tipo de antígenos ¹⁰⁴. Este hecho ha sido interpretado como una ruptura de la tolerancia inmunológica contra antígenos propios, y se debe probablemente a la sobreexpresión de estas proteínas en las células tumorales. Otro antígeno de estas características es el receptor de melanocortina 1 (MC1R), que también se expresa en melanomas y melanocitos. MC1R es el ligando natural de la hormona peptídica estimulante del melanocito, involucrada en la proliferación, diferenciación, pigmentación y potencial metastásico de los melanomas ¹⁰⁰.

- **Genes de las familias MAGE, BAGE, GAGE, LAGE y RAGE:** este grupo está constituido por los antígenos específicos de tumor, entre los que destaca la familia de genes MAGE (antígenos asociados a melanoma). Estos genes codifican proteínas que no se expresan en ningún tejido adulto, excepto en los tumores y en las células germinales masculinas, ya que están relacionados con las etapas primarias del desarrollo embrionario. La familia MAGE está codificada por 19 genes que se localizan en el cromosoma X, y se distribuyen en cuatro grupos: A, B, C y D. Mientras MAGE D se expresa de forma ubicua, los otros tres genes se expresan específicamente en los tumores ^{8,84}.
- **Mutaciones puntuales en genes que se expresan de forma ubicua:** esta categoría de antígenos está constituida por proteínas codificadas por genes mutados, como el derivado de la mutación de la quinasa 4 dependiente de la ciclina.
- **Genes sobreexpresados en los tumores con respecto al tejido normal.**

Los linfocitos T reconocen antígenos sólo cuando éstos les son presentados por células con antígenos leucocitarios humanos (HLA o *human leukocyte antigen*) apropiados. Los HLA son antígenos que se encuentran en la superficie de casi todas las células del individuo. Se trata de un conjunto de moléculas implicadas en el reconocimiento inmunológico y en la señalización entre células del sistema inmunitario, que son transmitidas de padres a hijos.

Algunos de los antígenos descritos anteriormente tienen epítomos que se reconocen específicamente por un HLA concreto. Más del 90% de los clones de linfocitos T citotóxicos restringidos por HLA-A2 (el alelo más frecuente en la población europea y norteamericana) que reconocen específicamente células autólogas de melanoma, reconocen péptidos derivados de las proteínas Mart-1/Melan A, gp 100 o tirosinasa. Esta información es fundamental cuando se realizan vacunaciones con péptidos, ya que un individuo que no exprese HLA-A2 no responderá a un tratamiento concreto, o si el tumor deja de expresar el HLA-A2 también puede resultar resistente al tratamiento.

Por tanto, el conocimiento de los antígenos expresados en las células del melanoma de cada paciente puede permitir desarrollar una inmunoterapia específica, dirigida contra los antígenos diana presentes en dicho tumor.

A pesar de ser una neoplasia muy inmunogénica, la regresión completa de melanomas es rara. En el caso de melanomas metastásicos, algunas células circulantes del melanoma, así como las que integran las metástasis pueden ser antigénicamente diferentes a las del tumor primario que dieron lugar a la respuesta inmune, mientras que también cabe la posibilidad de que en otros casos puedan mantener el perfil antigénico de las células primarias del melanoma, aunque durante su progresión incorporen el propio de las células con capacidad invasiva y metastásica.

Cuando las células tumorales alcanzan los ganglios linfáticos puede producirse una amplificación de la respuesta inmune, e iniciarse una nueva respuesta T frente a los antígenos de diferenciación adquiridos que han posibilitado la invasión y las metástasis, que puede ser efectiva debido a la existencia de un nuevo microambiente, con presencia de abundantes citocinas proinflamatorias ^{70,106}.

Por tanto, la selección natural de células tumorales heterogéneas resulta en la proliferación y supervivencia de variantes que poseen características genéticas y epigenéticas que facilitan su crecimiento y evasión inmune ³⁰.

Uno de los retos prácticos sería transformar las habituales respuestas inmunitarias que se generan en el melanoma en respuestas clínicamente objetivas.

En la mayoría de los pacientes con melanoma pueden detectarse linfocitos T dirigidos contra antígenos tumorales. Desafortunadamente, la respuesta inmunitaria frente a células tumorales no es tan potente como la dirigida contra bacterias, virus y otros patógenos. A menudo, el tumor inhibe la maduración de las células dendríticas que lo infiltran, de modo que éstas no se activan adecuadamente y se produce tolerancia inmunitaria al tumor, por inhibición funcional de los linfocitos T citotóxicos y de los linfocitos T cooperadores, o bien por aumento de los linfocitos T reguladores, una subpoblación que limita la potencia de las reacciones inmunitarias mediadas por linfocitos T ⁸.

La potenciación de la respuesta inmune mediante fármacos que bloquean señales que limitan la potencia inmunitaria frente al melanoma o activan moléculas coestimuladoras está mostrando resultados prometedores.

Los anticuerpos monoclonales anti-CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico) activan las células efectoras de la inmunidad celular antitumoral y provocan una depleción de los linfocitos T reguladores, que son los encargados de limitar la potencia de la respuesta inmunitaria contra el tumor (**figura 1.9**).

La PD-1, del inglés "*Programmed Death-1*", es una proteína que actúa como receptor, que está localizada en la membrana de los linfocitos T activados. Uno de los ligandos de PD-1, es PD-L1, y desempeña un papel esencial en la capacidad de las células tumorales para evadir el sistema inmune. Por tanto, el bloqueo de las interacciones entre PD-1 y PD-L1 modifica la función inmune, y constituye una diana con potencial terapéutico para tratar procesos oncológicos. Actualmente se están desarrollando fármacos contra esta proteína y sus ligandos, y aunque están en fases iniciales ¹⁰⁷, los anticuerpos dirigidos contra PD-1, producen respuesta en aproximadamente uno de cada 4-5 pacientes con cáncer de pulmón no microcítico, melanoma y cáncer renal.

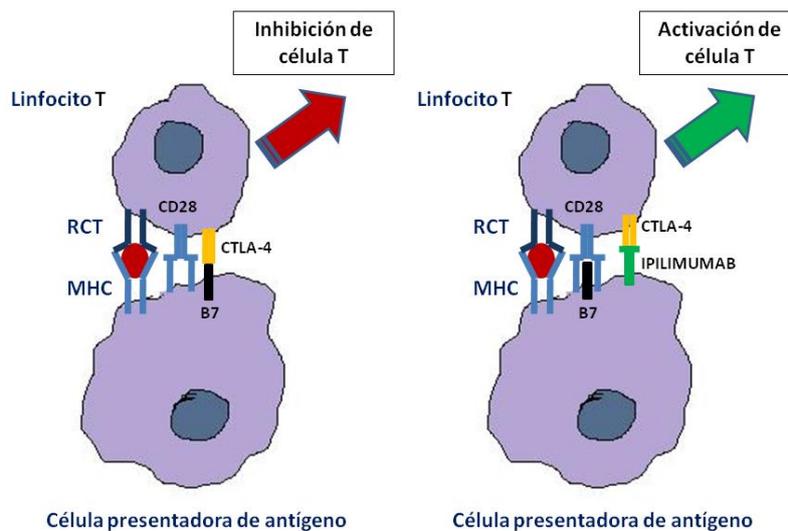


Figura 1.9. Los anticuerpos monoclonales que actúan frente al CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico), como el ipilimumab, producen una activación del linfocito T al bloquear el efecto inhibitorio de CTLA-4 sobre la estimulación del linfocito T. El CTLA-4 es una proteína transmembrana que se expresa en los linfocitos T citotóxicos activados, cuya función es regular la activación celular mediada por el coestimulador CD28.

1.4.1.3. Mecanismos de escape tumoral.

El problema fundamental de la inmunología del cáncer reside en el hecho de que el tumor se origina a partir de células del propio individuo, que expresan antígenos que también están presentes en tejidos normales. En cualquier caso, las células de melanoma adquieren mutaciones e inestabilidad genética que favorece la expresión de determinados antígenos propios de cada tumor. Por otro lado, la respuesta inmunitaria del huésped, frecuente en la gran mayoría de melanomas, es también responsable de la selección de los clones más agresivos o capaces de escapar del control inmunológico³⁴. Por tanto, el desarrollo de una neoplasia en presencia de un sistema inmune puede explicarse por mecanismos patogénicos no mutuamente excluyentes. Podría ser que exista un déficit inmunológico absoluto o relativo que favorezca el desarrollo de la neoplasia, ya que es un hecho constatado que los pacientes inmunodeprimidos tienen un riesgo superior de desarrollar melanomas, con un peor pronóstico, o bien que ese déficit sea inducido por la propia neoplasia, o incluso que el tumor genere o produzca clones celulares con menor o nula inmunogenicidad debido a la falta de expresión de antígenos tumorales¹⁰⁰.

Los linfocitos citotóxicos constituyen la piedra angular en la respuesta antitumoral del sistema inmune. Cuando el reconocimiento o la presentación antigénica son defectuosos, o cuando predomina un fenotipo de respuesta inmunosupresora, se producen déficits importantes en el sistema defensivo que favorecen el escape inmunológico del melanoma.

Otro mecanismo sería la pérdida parcial de algunos antígenos HLA, sobre todo de los que mejor expresan los antígenos asociados al melanoma como el HLA-A2.

Reconocimiento antigénico defectuoso o presentación anómala.

La pérdida o alteración en las células tumorales de las moléculas de clase I puede evitar su lisis por los linfocitos T citotóxicos. Por otra parte, la unión de un linfocito T al antígeno presentado por el HLA de clase II en la célula presentadora sólo induce una respuesta inmune potente si la célula presentadora expresa en su superficie una segunda molécula coestimuladora (interacción entre B7-CD28, ICAM-1-LFA-1...) ^{8,100}. Las células presentadoras de antígenos más importantes (las células dendríticas) expresan estas moléculas que ejercen de segunda señal. En cambio, si el antígeno es presentado al sistema inmune por otro tipo de célula presentadora (como por ejemplo las células

tumorales) lo que se induce es una falta de respuesta inmune o anergia antígeno-específica ¹⁰⁸. Por tanto, las células dendríticas desempeñarían un papel esencial en la presentación de antígenos MHC-II.

Otro mecanismo de escape de las células tumorales también puede ser la pérdida de moléculas de adhesión no específicas para antígeno, como por ejemplo ICAM-1, que se produce en algunos melanomas. La ICAM-1 se expresa de forma significativamente mayor en melanomas que en nevos melanocíticos, y se ha demostrado que existe relación entre el nivel de expresión de ICAM-1 y el grosor tumoral. Además, los niveles séricos solubles de ICAM-1 también se encuentran elevados en pacientes con melanoma, correlacionándose directamente con el estadio tumoral e inversamente con la supervivencia en los estadios II y III ¹⁰⁹.

Fenotipo específico de los linfocitos T.

En relación a la funcionalidad de los linfocitos T se han identificado 2 tipos de respuestas colaboradoras: la Th1 (inmunidad celular o retardada) y la Th2 (inmunidad humoral). Los linfocitos T colaboradores "vírgenes" o Th 0, pueden transformarse en linfocitos Th con un patrón de secreción de citocinas denominado tipo 1 (Th1), constituido preferentemente por el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), la IL-2 y el interferon-gamma (IFN- γ), o un tipo 2 (Th2), donde destacan la IL-4, la IL-5 y la IL-10 e IL-13, entre otras. El que la respuesta celular se decante por uno u otro tipo depende, entre otros factores, de una mayor presencia de las citocinas IL-12 o IL-10 en el medio. La IL-12 liberada por células dendríticas estimula una respuesta Th1, mientras que la IL-10 liberada por células presentadoras de antígenos diferentes de las células dendríticas promueve una respuesta Th2 ¹⁰⁰.

En los melanomas que regresan espontáneamente se ha comprobado que predomina un patrón Th1, mientras que en los que progresan se observa un patrón Th2 ¹¹⁰. En general se considera que las citocinas secretadas por los linfocitos Th2 tienen una importante acción inmunomoduladora, y pueden inhibir en diversos puntos la cascada inflamatoria, favoreciendo la progresión tumoral ¹⁰⁰.

Citocinas inducidas por células tumorales e inmunosupresión.

La progresión del melanoma coincide con un incremento en la producción de múltiples factores de crecimiento y de sus receptores, muchos de ellos sintetizados por las propias

células tumorales¹⁰⁰. Además, se ha comprobado cómo las células del melanoma pueden secretar citocinas con actividad inhibidora sobre células efectoras y reguladoras del sistema inmune, como el factor transformador de crecimiento-beta (TGF- β), y la IL-10. El TGF- β es una citocina inmunosupresora, que inhibe la producción de otras citocinas que estimulan la respuesta inmune.

La IL-10 es otra citocina inmunosupresora que se sintetiza preferentemente por los linfocitos Th2. Los melanocitos normales y las células névicas expresan niveles muy bajos de ARN de IL-10. En cambio, las células de melanoma sí secretan IL-10 biológicamente activa, y se ha demostrado que una elevación de los niveles séricos de IL-10 en pacientes con melanoma se relacionan con la progresión de la enfermedad¹¹¹⁻¹¹³. Por otra parte, la IL-10, además de ser un factor de crecimiento autocrino para células de melanoma y ejercer una acción inmunosupresora, disminuye la expresión de moléculas de clase I y II del MCH, así como de ICAM-1, pudiendo disminuir por tanto la eficacia de la respuesta inmune. Por tanto, la IL-10 secretada constitutivamente por las células tumorales puede producir anergia inmunológica¹¹⁴.

Linfocitos T reguladores (Treg).

La respuesta inmunológica a los antígenos tumorales puede ser inhibida por unas células supresoras denominadas células T reguladoras (Treg). Estas células producen citocinas inhibidoras de la respuesta celular, como la IL-10, el TGF- β , y el CTLA-4. La supresión del sistema inmunitario es una consecuencia natural de la propia inmunidad y tiene como objetivo proteger a los tejidos de la respuesta inmunológica. La utilización de anticuerpos que bloquean CTLA-4 induce una inmunidad efectiva contra el tumor³⁰. La reducción de células Treg asociada a la utilización de anticuerpos anti-CTLA-4 es particularmente efectiva en algunos pacientes con melanoma metastásico^{8,115}.

1.4.1.4. Perspectivas actuales sobre la respuesta inmunitaria en el melanoma.

A pesar de la gran cantidad de estudios realizados con diferentes esquemas de quimioterapia, los resultados obtenidos en el melanoma metastásico son muy modestos. El mejor entendimiento de las vías de señalización en el desarrollo de la enfermedad y la interacción de las células tumorales con el sistema inmunológico del huésped ha

permitido la identificación de nuevas dianas terapéuticas y ha abierto un amplio campo de investigación en búsqueda de nuevas estrategias.

En la actualidad existen importantes líneas de investigación sobre el tratamiento del melanoma, que se basan en la respuesta inmunitaria frente al tumor. Uno de los avances más notorios en el tratamiento del melanoma se fundamenta en el desarrollo de terapias que potencian la respuesta inmune frente al mismo, como el anticuerpo monoclonal ipilimumab, que bloquea el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), o el anticuerpo humano que actúa contra la proteína de muerte programada 1 (PD1). Tanto el CTLA-4 como la proteína PD-1 son moléculas que limitan la potencia inmunitaria frente al melanoma. El CTLA-4 es una proteína transmembrana que se expresa en los linfocitos T citotóxicos activados, cuya función es regular la activación celular mediada por el coestimulador CD28 (**figura 1.9**). Los linfocitos T reguladores disminuyen la respuesta inmunológica a través de la interacción con dicho antígeno presente en los linfocitos T citotóxicos. Su inhibición mediante el uso de un anticuerpo específico facilita la respuesta inmunológica antitumoral, favoreciendo la lisis tumoral y la supervivencia de las células del sistema inmunitario ¹¹⁶. Por otro lado, la PD-1 es un miembro de la familia del factor de necrosis tumoral que se encuentra aumentada en los linfocitos T activados. La interacción PD1-PDL-1 (proteína presente en las células dendríticas y en las células tumorales del melanoma) disminuye la respuesta inmunológica ¹¹⁷.

Numerosos estudios también están investigando tratamientos que utilizan vacunas de células autólogas o heterólogas de melanomas, o bien linfocitos intratumorales o células dendríticas cargadas con antígenos lisados de melanoma. Aunque todas estas líneas de investigación son muy prometedoras, las respuestas completas en los pacientes con metástasis no alcanzan el 10% ⁸. En cualquier caso, mientras no se disponga de una terapia inmunológica específica para cada individuo, la utilización de vacunas heterólogas de células atenuadas puede ser beneficiosa para determinados pacientes.

Como conclusión, el sistema inmune desempeña un papel esencial en el control del crecimiento y diseminación tumoral. Los tratamientos dirigidos a potenciar las respuestas inmunitarias antitumorales o suprimir las respuestas inmunitarias que favorecen el crecimiento tumoral pueden mostrar en los próximos años un beneficio clínico importante.

1.4.2. APOPTOSIS

La homeostasis normal precisa de un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular, ya que cualquier desequilibrio determina un crecimiento anormal de las células. La muerte celular resulta esencial para la remodelación tisular durante la embriogénesis y para mantener la homeostasis en los tejidos adultos normales. Así mismo, es fundamental para eliminar las células lesionadas, y puede producirse de dos maneras: la apoptosis y la necrosis. La necrosis se produce por un mal aporte de nutrientes, que deriva en una rotura de la membrana y en la lisis celular. Por el contrario, la apoptosis o muerte celular fisiológica se regula y requiere de la síntesis de ARNm y proteínas. A nivel microscópico, este proceso se caracteriza por la aparición de cuerpos apoptóticos, compuestos por restos de membrana celular y cromatina condensada.

Las proteasas responsables de la apoptosis, denominadas caspasas, se activan y afectan las vías de transducción de señales mediante la puesta en funcionamiento de precursores enzimáticos, que digieren el ADN genómico en unidades de 200 pb, y que degradan proteínas con importancia estructural.

La apoptosis se puede inducir a través de estímulos muy dispares, como las lesiones del ADN causadas por radiación ultravioleta o determinadas sustancias químicas, la falta de citocinas estimuladoras del crecimiento, o la presencia de factores que favorecen la muerte celular como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Así mismo, las interacciones entre distintas vías de transmisión de señales también pueden causar la apoptosis.

La cascada de eventos que conduce a la apoptosis de la célula diana se lleva a cabo por dos vías que están interrelacionadas entre sí (**figura 1.10**). Una de ellas se produce alrededor de la mitocondria y se activa por factores intrínsecos como el daño en el ADN. La vía intrínseca es controlada por la interacción entre los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), que se agrupan en tres subfamilias; una antiapoptótica, la subfamilia Bcl-2, cuyos elementos más conocidos son Bcl-2 y Bcl-XL, y dos proapoptóticas, las subfamilias Bax (constituidas por Bax y Bad) y BH3 (formada por Bad, Bid, PUMA y NOXA entre otras).

Los miembros de la familia de Bcl-2 se encuentran en la superficie de la mitocondria y su función principal es regular la salida del citocromo C. El daño generado por el

estímulo inductor provoca la expresión del gen supresor de tumores p53, que induce la expresión de los miembros de la subfamilia BH3, que activan a su vez a los dos miembros de la familia Bcl-2 responsables de la permeabilización de la membrana mitocondrial, Bax y Bak. La expresión de estas proteínas provoca la salida de citocromo C, que se une con Apaf-1 y después con la procaspasa 9 para formar el apoptosoma. Este apoptosoma hidroliza la procaspasa 3 a caspasa 3, originando que se estimulen el resto de caspasas.

El otro mecanismo, la vía extrínseca, se activa generalmente por interacciones entre receptores localizados en la superficie de la célula diana y sus ligandos, que se trata de citocinas como TNF- α , TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) o ligando de Fas (L-Fas) ¹¹⁸. Estos receptores se han denominado de forma colectiva como “receptores de muerte” y pertenecen a la familia del receptor del factor de necrosis tumoral. La unión del ligando a su receptor induce la trimerización y activación del receptor. Una vez activado, el dominio citoplasmático (dominio de muerte) se une a una serie de proteínas adaptadoras que reclutan las formas inactivas de caspasa 8, que se divide y activa el resto de caspasas ^{119,120}. El miembro de los receptores de muerte más estudiado y relevante en inmunología es el CD95 o Fas. El ligando para este antígeno (L-Fas) es una glicoproteína de membrana que se expresa en la superficie de los linfocitos citotóxicos. Tras la activación del receptor Fas por su ligando soluble o asociado a la célula, la proteína trimeriza formando microagregados e induce la transducción de la señal apoptótica. Se trata por tanto de una vía calcio-independiente, por la que los linfocitos activados inducen apoptosis tras la unión a moléculas de Fas expresadas por las células diana.

La apoptosis también está mediada por la secreción de gránulos citoplasmáticos que contienen perforina y granzimas (enzimas con actividad proteasa serina) por parte de los linfocitos citotóxicos. La exocitosis de estos gránulos activa endonucleasas (a partir de la caspasa 3) que originan la fragmentación del ADN de la célula diana, provocando la apoptosis celular ⁹⁵ (**figura 1.10**). Durante la degranulación, la membrana externa de los gránulos del linfocito T citotóxico se fusiona con la membrana celular, liberando los contenidos del gránulo en el pequeño espacio que queda entre el linfocito T citotóxico y la célula “diana”, estrechamente adheridas en ese momento. La proteína perforina es uno de los componentes de estos gránulos, y es crucial en la inducción de apoptosis por este sistema, ya que interacciona con los fosfolípidos de membrana de la célula “diana”.

Finalmente, varias moléculas de perforina se oligomerizan en la membrana produciendo un poro que la atraviesa y que, transitoriamente, permite el acceso de otras proteínas presentes en el interior de los gránulos al espacio intracelular de la célula “diana”. Las más importantes son las granzimas A y B, que, una vez libres en el citoplasma inician el proceso apoptótico ⁹⁵.

Las vías mitocondrial y del receptor de muerte están íntimamente interconectadas. Independientemente de los mecanismos que activan la apoptosis, éstos convergen en una serie de acontecimientos moleculares comunes, que acaban produciendo cambios moleculares irreversibles y, por último, la muerte celular ¹²¹.

El proceso de apoptosis consta de 3 fases:

- **Fase de iniciación**, en la que se produce una ruta de transducción de señales que se activa tras el daño que el estímulo inductor (agentes químicos y físicos, activadores fisiológicos, determinadas terapias o toxinas) provoca en las macromoléculas biológicas, o por acción sobre receptores específicos, como sucede con la unión de Fas a su ligando.
- **Fase efectora**, en la que la célula está programada para morir, activándose las enzimas proteolíticas encargadas del proceso, denominadas caspasas. En el caso de la vía intrínseca, esta fase está modulada por la familia de proteínas Bcl-2.
- **Fase degradativa**, en la que las células muertas son reconocidas y fagocitadas por los macrófagos. La muerte celular se produce por graves alteraciones nucleares, de la membrana plasmática o de las mitocondrias. En el núcleo se degrada el ADN y se hacen visibles condensaciones de cromatina nuclear, formándose aglomeraciones que se desplazan hacia la superficie de la membrana nuclear.

1.4.2.1. Regulación de la apoptosis.

Los índices apoptóticos son típicamente bajos en el melanoma sin regresión, particularmente en estadios avanzados ¹²². La pérdida en el control de la apoptosis puede deberse a diversos tipos de cambios moleculares, como una activación de factores

antiapoptóticos, la inactivación de efectores proapoptóticos o un refuerzo de las señales de supervivencia.

La apoptosis está sometida a una estricta regulación por diversas proteínas. Las membranas mitocondriales contienen proteínas que pueden activarla (Bax, Bad) o inhibirla (Bcl-2). Por tanto, la sobreexpresión del factor de supervivencia Bcl-2, al bloquear la apoptosis, protege a las células tanto de la radioterapia como de la quimioterapia, lo que complica el tratamiento de los pacientes que presentan esta particularidad. Por otro lado, la proteína p53 activa la transcripción de Bax e inhibe la transcripción de Bcl-2, lo que favorece la apoptosis. Por este motivo, esta proteína resulta esencial para la integración de las vías que regulan la síntesis del ADN, su reparación y la apoptosis¹⁰⁰.

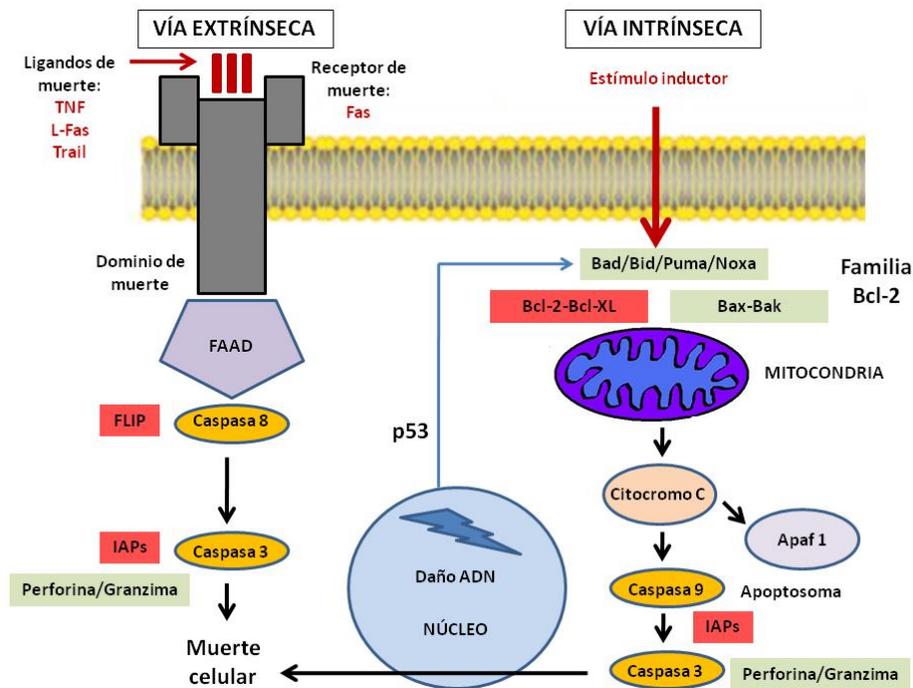


Figura 1.10. La vía extrínseca se activa por interacciones entre receptores de muerte localizados en la superficie de la célula diana y sus ligandos. Una vez activado, el dominio citoplasmático del receptor se une a una serie de proteínas adaptadoras que reclutan a la caspasa 8, que activa el resto de caspasas. La vía intrínseca es controlada por la interacción entre los miembros proapoptóticos y antiapoptóticos de la familia Bcl-2. Bax y Bad provocan la salida de la mitocondria de Citocromo C, que al unirse a Apaf-1 y caspasa 9 forma un apoptosoma y activa la caspasa 3.

Los recuadros verdes indican moléculas que activan la apoptosis, mientras que los rojos moléculas que la inhiben.

1.4.2.2. Defectos en la regulación de la apoptosis.

Si una célula normal no sufre apoptosis, se perpetúa y puede originar un clon tumoral. Los principales factores que generan defectos en la regulación de la apoptosis son los siguientes:

Desequilibrio entre genes de la familia Bcl-2.

Los melanocitos y las células névicas expresan de forma constitutiva Bcl-2, principal inhibidor de la apoptosis ¹²³. La dependencia de los melanocitos normales de Bcl-2 para la supervivencia se ilustra por la despigmentación y pérdida de melanocitos en ratones deficientes para Bcl-2 ¹²⁴.

La implicación de Bcl-2 en el melanoma es controvertida. Se ha demostrado que existe una disminución en la expresión de proteína Bcl-2 en el melanoma, en comparación con lo que se sucede en los nevos melanocíticos ¹²⁵. Algunos artículos han asociado niveles altos de Bcl-2 a una menor supervivencia en pacientes con melanoma metastásico, mientras otros sugieren una infraregulación de Bcl-2 durante la progresión del mismo ^{126,127}, o bien no encuentran alteraciones significativas en los balances de los miembros de la familia Bcl-2 que indiquen que su alteración pueda estar implicada en la evolución del melanoma ¹²⁸.

Así pues, Bcl-2 no constituiría un factor esencial en la génesis del melanoma, pero sí constituye un mecanismo esencial para la supervivencia de los melanocitos normales.

La inserción artificial de células con Bcl-2 confiere resistencia a la quimioterapia en tumores sólidos y hematológicos. Por el contrario, la inactivación de Bcl-2 amplifica las respuestas tumorales a la quimioterapia, y favorece la apoptosis de las células tumorales producida por la quimioterapia.

Las mutaciones de la p53 se han asociado a resistencia a la quimioterapia, aunque el melanoma presenta una baja frecuencia de mutaciones de la p53 a pesar de su extrema resistencia a la quimioterapia ¹²⁹.

Falta de expresión de Fas y expresión anómala de L-Fas en células de melanoma.

La interacción entre Fas y su ligando juega un importante papel en la regulación del sistema inmune y en la progresión del cáncer, ya que induce apoptosis en las células diana. Tras la activación que se produce como consecuencia del reconocimiento de los

antígenos tumorales, las células T expresan cantidades elevadas de L-Fas, que induce la apoptosis de las células neoplásicas^{30,130,131}.

Uno de los mecanismos de escape de las células de melanoma es la expresión de moléculas de L-Fas en la superficie, que actúa como sistema de autodefensa debido a que se asocia a apoptosis de los linfocitos citotóxicos que llegan al lecho tumoral, lo que provocaría una menor capacidad de destrucción tumoral y por tanto un peor pronóstico. Trabajos recientes han demostrado un incremento de L-Fas en el suero de pacientes con melanoma metastásico¹³⁰. Este L-Fas soluble también puede inducir apoptosis de linfocitos citotóxicos circulantes que expresan Fas. Por tanto, además de la apoptosis paradójica de los linfocitos que infiltran el tumor, los pacientes con melanoma metastásico diseminado pueden presentar inmunosupresión sistémica por esta vía^{30,100}. La infraregulación o la pérdida de la expresión de Fas en los tumores también puede contribuir a su resistencia a la apoptosis³⁰.

Expresión de factores antiapoptóticos en células de melanoma.

Existen diversos protectores endógenos de la apoptosis cuya función es aprovechada por las células tumorales para aumentar su capacidad de supervivencia. Los dos principales frenos de la apoptosis están constituidos por las denominadas IAPs (proteínas celulares intrínsecas inhibidoras de la apoptosis), y FLIPs (proteína inhibidora FLice), que además de en el melanoma, se expresan en nevos melanocíticos y en otros tipos de tumores (**figura 1.10**)¹³².

En el melanoma, varios miembros de las familias IAPs y FLIPs se han asociado con la progresión tumoral, ya que están sobreexpresados en melanomas invasivos y metastásicos^{127,133}.

IAPs

Las proteínas celulares intrínsecas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) previenen de la apoptosis antagonizando las caspasas o inhibiendo otras proteínas proapoptóticas¹³⁴. En humanos se han identificados ocho IAPs, que se denominan NAIP, CIAP1, CIAP2, XIAP, BIRC5/survivina, Apollon/BRUCE, Livina (ML-IAP, KIAP), e ILP-2, algunas de las cuales se han asociado a génesis de tumores y resistencia a la quimio y radioterapia^{133,135}.

Las 5 IPAs sobreexpresadas en melanomas cutáneos primarios son la survivina, CIAP1, CIAP2, XIAP y Livina ^{133,136}.

De todas ellas, la survivina es la que ha demostrado tener una mayor importancia el melanoma, ya que es la que se ha relacionado de una forma más consistente con un peor pronóstico ¹³³, aunque su mecanismo de acción no se ha esclarecido por completo ¹³⁷. Este inhibidor de la apoptosis es necesario para que se mantenga la viabilidad de la célula. La inactivación de la survivina y de otros reguladores apoptóticos induce la regresión tumoral y puede incrementar la sensibilidad de las células del melanoma a agentes quimioterápicos ¹³⁸.

- **FLIP**

FLIP (*FLice inhibitory protein*) es una proteína de 55 kD inhibidora de FLICE o caspasa 8, que interviene en la apoptosis mediada por Fas produciendo una inhibición de la misma. La expresión de FLIP ocurre en los estadios iniciales de la activación de linfocitos T, pero desaparece cuando los linfocitos T se tornan susceptibles a la apoptosis mediada por L-Fas ¹³⁹.

Los melanocitos normales no expresan FLIP. En cambio, las líneas celulares de melanoma sí expresan niveles detectables de esta proteína. FLIP contribuye a la resistencia al L-Fas por parte de las células de melanoma que expresan Fas en su superficie ^{100,139}.

Por otro lado, la sobreexpresión de FLIP también aumenta la resistencia de las células de melanoma al ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL) ¹⁴⁰. Se cree que todos esos defectos en la vía de la caspasa 8 provocan que las células de melanoma sean refractarias al control inmune.

Defecto en la síntesis de óxido nítrico.

La producción de óxido nítrico por las células tumorales reduce su capacidad de metastatizar, ya que el óxido nítrico inhibe o reduce la agregación plaquetaria y puede inducir directamente fragmentación del ADN y apoptosis ¹⁰⁰.

En células de melanoma se aprecia una disminución de la enzima precursora del óxido nítrico, la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). Existe una relación inversa entre la

expresión de iNOS y el potencial metastásico de una línea murina de melanoma ¹⁴¹. En un modelo experimental animal se ha demostrado que la transferencia del gen de la iNOS a las células malignas suprime la tumorigénesis y reduce el potencial metastásico del melanoma ¹⁴².

1.4.2.3. Consideraciones finales sobre la apoptosis en el melanoma.

El melanoma es considerablemente resistente a todas las modalidades actuales de tratamiento del cáncer. Numerosos estudios genéticos, funcionales y bioquímicos sugieren que las células de melanoma son extremadamente refractarias a una gran variedad de fármacos quimioterápicos aprovechando su resistencia intrínseca a la apoptosis, y reprogramando sus vías de proliferación y supervivencia durante su progresión.

Los melanocitos y sus células madre precursoras se activan para secretar melanina y proteger a los queratinocitos colindantes y otras células epidérmicas. Así pues, los melanocitos están programados para sobrevivir. Los rasgos aumentados de supervivencia de los melanocitos no dependen sólo de circunstancias específicas de los propios melanocitos, sino también de la estimulación paracrina desde los fibroblastos y los queratinocitos ¹⁴³. Los fibroblastos inducen la expresión del factor de crecimiento básico de los fibroblastos (bFGF), un potente factor de supervivencia para los melanocitos ¹⁴⁴, y los queratinocitos promueven la expresión de Bcl-2 por los melanocitos ¹⁴⁵.

Las células de melanoma adquieren de forma simultánea la capacidad de evadir los mecanismos de inmunovigilancia y la acción citotóxica de diversos agentes químicos que provocan daño en el ADN. Las bases para la resistencia a fármacos en el melanoma son fundamentalmente la desregulación de la apoptosis, aunque también pueden contribuir otros mecanismos que incluyen el transporte de fármacos, la detoxificación y una mejoría en la reparación del ADN ¹⁴³.

1.4.3. INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS.

La formación de nuevos vasos sanguíneos resulta fundamental para que se produzca el crecimiento de la masa tumoral, ya que éstos deben aportar oxígeno y nutrientes en la medida adecuada ^{146,147}. Por tanto, a medida que el tumor se expande, su proliferación se torna dependiente de la neoangiogénesis, sin la cual no se podría mantener su crecimiento, invasión y capacidad metastásica.

Muchos estudios han mostrado que un incremento de la vascularización tumoral se correlaciona con un peor pronóstico tanto en melanoma como en otros tipos de cánceres ¹⁴⁸⁻¹⁵⁶.

Las células endoteliales suelen ser quiescentes y tienen una baja velocidad de proliferación, por lo que no suelen identificarse mitosis. La angiogénesis se produce en la dermis en respuesta a factores de crecimiento derivados del tumor, siendo el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) el principal regulador de la angiogénesis tanto fisiológica como patológica ¹⁵⁶. El VEGF es parte de una familia de factores de crecimiento de los que se han identificado 6 subtipos. Los melanocitos no poseen en condiciones normales receptores para el VEGF. En cambio, las líneas celulares de melanoma expresan el receptor del VEGF y secretan también el propio VEGF, considerándose que esta expresión ocurre durante su transformación maligna ¹⁰⁰. Además, se ha demostrado que el VEGF incrementa el índice de proliferación del melanoma.

El VEGF es el factor angiogénico conocido más potente, que además de inducir la proliferación de células endoteliales aumenta la permeabilidad vascular en tumores sólidos. Se trata de un regulador esencial de la proliferación vascular y de la permeabilidad, que se expresa en respuesta a hipoxia, oncogenes o citocinas, y que se ha asociado con mal pronóstico en diversos tipos de tumores. Se ha constatado que la angiogénesis y concretamente la expresión de VEGF están asociados con la fase de crecimiento vertical del melanoma ¹⁴⁸⁻¹⁵⁶, y también que los niveles séricos de VEGF están elevados de forma significativa en pacientes con melanoma metastásico o recurrencia local respecto a controles sanos ¹⁰⁰, y en pacientes con melanomas primarios respecto a pacientes sin melanoma. Otra citocina proangiogénica secretada por las células de melanoma es el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), que también favorece la proliferación endotelial y la capacidad invasiva del tumor. El bFGF,

al igual que el VEGF, es mitógeno para células de melanoma, al mismo tiempo que estimula la angiogénesis y la capacidad invasiva mediante la activación de diversas enzimas proteolíticas ¹⁵⁷.

La angiogénesis es una de las dianas de los tratamientos contra el cáncer, empleándose proteínas que inhiben el proceso, como angiostatina y endostatina. El bloqueo del VEGF ha demostrado un rápido efecto antivascolar en tumores animales. El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal anti-VEGF aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento del cáncer de colon y del cáncer no microcítico de pulmón metastásico ¹⁵⁸, que también ha demostrado actividad en otros tumores como el cáncer de mama, de ovario, renal o melanoma ¹⁵⁹.

1.4.4. DIFERENCIACIÓN TERMINAL

El fenómeno conocido como diferenciación terminal también es responsable de la regresión espontánea de algunas neoplasias cutáneas, fundamentalmente de tumores queratinizantes ⁶. Se trata de un proceso por el cual la neoplasia queratiniza por sí misma de forma sucesiva, hasta un punto en el cual las células diferenciadas terminalmente no son capaces de dividirse más, por lo que fallecen ¹⁶⁰. La diferenciación terminal de las células escamosas epiteliales se manifiesta por queratinización, y se puede evidenciar mediante la medición de la expresión de citoqueratina 10, que es un marcador de este tipo de diferenciación.

Este fenómeno también es bien conocido en otros tumores, y sucede de forma simultánea con inflamación o apoptosis. Por ejemplo, en la leucemia aguda promielocítica, el tratamiento con ácido all-transretinoico y quimioterapia produce en ocasiones tanto diferenciación terminal como apoptosis ¹⁶¹. Lo mismo sucede con el tratamiento con bruceantina en otras neoplasias hematopoyéticas ¹⁶². Los anticuerpos monoclonales contra los receptores de los factores de crecimiento epidérmicos y los inhibidores de la tirosin quinasa de estos receptores también inducen diferenciación terminal y apoptosis ¹⁶³, al igual que el tratamiento con derivados del ácido retinoico en el neuroblastoma ⁶.

El queratoacantoma muestra un período inicial de crecimiento rápido, seguido de diferenciación terminal e involución, y en los estadios finales del tumor se aprecia una

respuesta inflamatoria. Este patrón evolutivo se puede producir en otras líneas celulares escamosas.

La diferenciación terminal no parece ser un mecanismo que se haya implicado de forma consistente con la regresión del melanoma.

1.4.5. INESTABILIDAD GENÓMICA DEBIDA AL AGOTAMIENTO DE LOS TELÓMEROS.

Los telómeros (del griego *telos*, "final" y *meros*, "parte") son regiones de ADN no codificante, altamente repetitivas, ubicadas en los extremos de los cromosomas de las células eucariotas.

Están constituidos por secuencias de ADN repetidas en tándem y por proteínas asociadas, y presentan una estructura especial que impide su unión a los extremos de otros cromosomas. Cumplen un rol esencial en la preservación de la integridad cromosómica, protegiendo al ADN codificante del final del cromosoma de la degradación por la acción enzimática, y contribuyendo al mantenimiento de la estabilidad cromosómica. Por otro lado, median en importantes interacciones entre los cromosomas y la matriz nuclear, pueden además ejercer efectos sobre la transcripción de genes situados en regiones subteloméricas, e interactúan con los mecanismos regulatorios del ciclo celular. Sin embargo, su función más notoria es la de servir como un reloj mitótico, que mide y regula el número de las divisiones celulares.

Los telómeros están constituidos por subunidades cortas de nucleótidos, generalmente ricos en timina (T) y guanina (G). En la especie humana, la secuencia de cada una de estas subunidades es (TTAGGG) (**figura 1.11**). El número de secuencias que se repiten en tándem es variable según las distintas células de un mismo individuo, aunque se calcula que alcanzan aproximadamente un promedio de 2.000 repeticiones.

Los telómeros se acortan con cada división celular y el número de divisiones que la célula puede experimentar se correlaciona con la longitud de los mismos.

Se ha demostrado que las células normales no crecen de forma indefinida pese a suministrarle todos los nutrientes y factores de crecimiento necesarios. Las células obtenidas de recién nacidos cultivadas "in vitro" experimentan unas 100 divisiones,

mientras que células obtenidas de sujetos mayores, sólo se dividen de unas 20 a 24 veces.

Por tanto, se ha considerado este acortamiento como el reloj biológico que mide el proceso de envejecimiento, que lleva la cuenta del número de divisiones hasta que la célula debe morir, para controlar así su proliferación en los tejidos ¹⁶⁴⁻¹⁷⁰.

Puesto que en la mayor parte de las células somáticas del organismo no hay actividad telomerasa, este acortamiento es fisiológico y se produce continuamente durante toda la vida de un individuo. Por tanto, el envejecimiento es una consecuencia de la pérdida de telómeros con la edad.

Sin embargo, en el caso de las células germinales y embrionarias, de las que el organismo no puede prescindir, existe un elemento, la telomerasa, capaz de restaurar la secuencia del telómero para prolongar la vida de la célula y mantener su capacidad de multiplicación.

La telomerasa es una enzima de tipo transcriptasa inversa formada por un complejo proteína-ácido ribonucleico, con actividad polimerasa, que permite el alargamiento de los telómeros. Sintetiza ADN a partir de un molde de ARN que contiene la secuencia AAUCCC, capaz de crear e insertar los fragmentos TTAGGG que se pierden en cada división. La actividad de la telomerasa varía en diferentes etapas de la vida. En las células somáticas normalmente diferenciadas de la mayoría de tejidos adultos apenas se detecta telomerasa, mientras que sí es muy activa en células de la línea germinal, en tejidos fetales y en ciertas células hematopoyéticas, todas ellas poco diferenciadas y con un alto índice de proliferación. Este hecho se produce porque la mayoría de las células suprimen la actividad de la telomerasa tras el nacimiento. Por el contrario, muchas células tumorales pueden reactivarla, contribuyendo así a la proliferación continua de clones malignos. De este modo, se ha objetivado una actividad incrementada de telomerasa en un 85-90% de los cánceres humanos ^{164,165,169}.

Previamente a la división celular, la célula duplica su ADN, incluida la secuencia de bases que constituye el telómero. Sin embargo, en una célula normal, la maquinaria enzimática de replicación (la polimerasa de ADN) no funciona bien con los telómeros, ya que no es capaz de copiar la totalidad de la secuencia de ADN que los constituye en una de las hebras del cromosoma, y como resultado, el telómero se hace cada vez más corto en cada replicación. Cuando una línea celular no tiene una telomerasa activa, los telómeros de los cromosomas se acortan de 50 a 200 pares de bases en cada división.

Dado el carácter repetitivo y no codificante de éstos, inicialmente esa pérdida no tiene consecuencias, pero llega un punto en que agotadas la mayoría de las repeticiones teloméricas se ven afectadas regiones codificantes, por lo que la función celular se ve alterada. El progresivo desgaste del telómero con la sucesión de ciclos celulares provoca que alcancen una longitud crítica que impide su función protectora, por lo que se activan señales de daño del ADN, se interrumpen las mitosis y se induce la senescencia de las células de esa línea. Si la célula presenta mutaciones en las señales de daño y continúa dividiéndose, se producen fusiones terminales entre las cromátidas, provocando la desorganización del cariotipo e inestabilidad cromosómica, la pérdida de algunos genes indispensables y la apoptosis. El término “crisis” se emplea para definir la muerte celular masiva que ocurre cuando las células sobrepasan su período de vida replicativo. La carcinogénesis implica la alteración de estos mecanismos apoptóticos normales, que se produce si se acumulan demasiadas mutaciones genéticas que no se corrigen por las propias células, lo que les confiere una capacidad de replicación ilimitada. En ese instante, los telómeros suelen ser ya muy cortos y la telomerasa está inactiva. Muchas células tumorales, una vez rotos los frenos fisiológicos normales, tienen la capacidad de reactivar la telomerasa, con lo que se vuelven a fabricar telómeros de cierta longitud, que son más cortos que los normales pero lo suficientemente largos como para evitar el envejecimiento, favoreciendo por tanto su inmortalidad.

En el melanoma, la inestabilidad genómica que ocurre por las crisis teloméricas ha sido implicada entre los diversos mecanismos capaces de provocar su regresión espontánea. En animales de experimentación con melanomas en los que se producía una regresión espontánea de los mismos, se han podido demostrar tanto un acortamiento de telómeros como la existencia de fusiones terminales, indicativas de crisis^{33,165}. Por tanto, una regresión espontánea parcial puede indicar una fase de progresión del tumor en la cual su genoma sufre un extenso remodelado, pagando el tributo de una aniquilación temporal pero ganando en última instancia la recompensa hacia la inmortalidad de sus células³³.

La inhibición de la telomerasa también puede resultar en una crisis genómica y en la regresión tumoral. Cabe esperar, por tanto, que el bloqueo farmacológico específico de la telomerasa pueda impedir la proliferación de las células cancerosas, sin alterar el funcionamiento de muchas células normales. Por otra parte, su activación en las células

somáticas podría alargar la vida celular. Por ello, el desarrollo de activadores e inhibidores específicos de la telomerasa puede constituir un campo fascinante respecto al control del envejecimiento y la malignización.

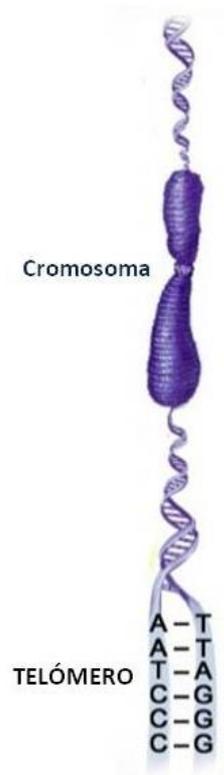


Figura 1.11. Representación esquemática del telómero, que se localiza en el extremo del cromosoma.

1.5. EPIDEMIOLOGÍA DEL MELANOMA.

Situación epidemiológica del melanoma en el mundo.

En la actualidad se diagnostican unos 160.000 nuevos casos de melanoma al año en todo el mundo, y alrededor del 80% se localizan en países desarrollados. A nivel mundial, representa aproximadamente el 1,5% de los tumores en ambos sexos.

La mayor incidencia se registra en países con fuerte irradiación solar y con una población blanca no autóctona, como sucede en Australia, Nueva Zelanda, Estados Unidos y Sudáfrica. Las tasas de incidencia que se observan en Australia y Nueva Zelanda son más del doble de las más altas de Europa, y en algunas regiones de Australia, la tasa de incidencia se ha llegado a cifrar en 55 casos por 100.000 habitantes^{171,172}. En Europa es más frecuente en el norte y en el oeste. Pero mientras que en todas estas zonas la frecuencia del melanoma tiende a estabilizarse e incluso a disminuir, sigue aumentando en el sur y en el este de nuestro continente.

El melanoma se presenta fundamentalmente en adultos de todos los grupos de edad, aunque con una incidencia máxima entre los 40 y los 70 años y, en general, afecta a ambos sexos de forma similar, aunque algunas series determinan una mayor incidencia en la mujer, especialmente en Europa. En cuanto a la localización anatómica, existe un predominio en las extremidades inferiores en las mujeres, y en el tronco y en las extremidades superiores en los varones. A diferencia de muchos tumores, cuya frecuencia disminuye en los grupos de edad avanzada, las tasas de incidencia del melanoma siguen aumentando con la edad. El mayor incremento de incidencia que se ha experimentado en los últimos años tanto en hombres como en mujeres ocurre a expensas de lesiones localizadas en el tronco. También se aprecia una incidencia creciente en edades más tempranas, y para algunos autores la edad media de presentación se situará progresivamente entre los 30 y 35 años^{173,174}.

La mayoría de estudios de melanoma sugieren un peor pronóstico a medida que aumenta la edad de los pacientes en el momento del diagnóstico. Por otro lado, también se ha sugerido que los melanomas localizados en las extremidades tienen un mejor pronóstico que los que se hallan en el tronco, aunque la región de cabeza y cuello es la que confiere generalmente un peor pronóstico⁶⁸.

Situación epidemiológica del melanoma en España.

Según los datos publicados por el centro nacional de epidemiología (Instituto de Salud Carlos III), la incidencia anual de melanoma en España se sitúa en una tasa anual ajustada a la población europea de 6,14 en hombres y 7,26 en mujeres por 100.000 habitantes ¹⁷⁵. El aumento de las tasas de incidencia observado varía entre el 3 y el 7%, siendo uno de los cánceres que más ha aumentado en los últimos años. Representa un 2,7% de los cánceres femeninos, y un 1,5% de los masculinos ¹⁷¹.

Según los datos referentes a los últimos años, se ha observado una mayor frecuencia del tumor en las mujeres que en los hombres (56,5% de mujeres y de 43,5% hombres), y la edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico del tumor fue de 57 años, muy similar en ambos sexos (55,8 años en mujeres y 57,9 años en los hombres).

En el momento del diagnóstico, el 78,8% de los melanomas fueron invasivos. El índice de Breslow medio de los melanomas invasivos fue de 1,97 mm. En promedio, los hombres tenían un índice de Breslow 0,38 mm mayor que las mujeres. Este índice aumentó significativamente en función de la edad del paciente, de forma que por cada 10 años de incremento de edad era 0,25 mm mayor.

El 13,8% de los pacientes tenían enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico (el 9,9% presentaban metástasis regionales y el 3,9% a distancia). El melanoma “in situ” y la enfermedad localizada fueron significativamente más frecuentes en las mujeres, mientras que las metástasis regionales y a distancia fueron más frecuentes en los hombres.

La localización más frecuente del melanoma fue el tronco (37,1%), seguido de las extremidades inferiores (27,3%), y la cabeza (20,8%). En el tórax se localizaron el 27,5% de los tumores del tronco, y en la espalda el 72,5%. La localización más frecuente en el tronco, seguida de las extremidades inferiores, fue un dato coincidente con los datos publicados en el ámbito nacional e internacional ^{176,177}.

La variedad clínico-patológica más frecuente fue el melanoma de extensión superficial (62,6%), seguida del melanoma nodular (16,8%) y el lentigo maligno melanoma (14,3%). El melanoma lentiginoso acral constituyó el 5,8% del total. Se observaron diferencias significativas entre géneros en el tipo clínico-patológico de tumor, apareciendo en mayor proporción el melanoma de extensión superficial en las mujeres (64,2% *versus* 60,4% en los hombres) y el melanoma nodular en los hombres (19,5% *versus* 14,8% en las mujeres).

El análisis de la evolución de las proporciones de tumores gruesos demuestra que los tumores mayores de 4 mm no han aumentado su proporción en los últimos años. Sin embargo los tumores finos sí han aumentado su proporción, al igual que la de melanomas “in situ”.

El índice de Breslow fue mayor en los hombres independientemente de su edad. En este sentido se observó que los melanomas nodulares fueron también más frecuentes en los hombres a partir de los 40 años. Este tipo clínico-patológico de melanoma se ha relacionado con un comportamiento clínico más agresivo, por su velocidad de crecimiento mayor, y también con una mayor mortalidad.

Epidemiología de los nevos melanocíticos.

En el caso de los nevos melanocíticos, aunque algunos pueden estar presentes desde el nacimiento, usualmente aparecen en la niñez. Los nevos melanocíticos adquiridos aumentan en número y tamaño durante la infancia y adolescencia, siguen su desarrollo durante la edad adulta hasta estabilizarse, y finalmente tienden a desaparecer al envejecer.

El número total de nevos melanocíticos adquiridos está relacionado fundamentalmente con la predisposición genética. La exposición solar intermitente, particularmente durante la infancia y adolescencia, es el factor de riesgo ambiental más importante para su desarrollo¹⁷⁸. La prevalencia de nevos displásicos varía en las diferentes poblaciones con una media que oscila del 3 al 6%.

La presencia de un nevo clínicamente atípico implica un riesgo 2 veces mayor de desarrollo de un melanoma, mientras que la presencia de ≥ 10 nevos implica un riesgo 12 veces mayor. Por tanto, el nevo atípico parece ser un marcador de riesgo para el paciente más que una lesión de riesgo en sí misma¹⁷⁹.

1.6. ASPECTOS MOLECULARES DEL MELANOMA

Clasificación molecular del melanoma.

En los últimos años se han descrito diversas alteraciones moleculares en el melanoma, y existe una tendencia a clasificarlos basándose en las alteraciones genéticas que presentan. Los melanomas con mutaciones de BRAF suelen localizarse en zonas con exposición solar intermitente mientras que las alteraciones genéticas de KIT ocurren con mayor frecuencia en los melanomas acrales, mucosos y en los que se localizan en áreas con exposición solar crónica^{118,180-182}.

El grupo de melanomas cutáneos localizado en áreas expuestas de forma intermitente al sol es el más frecuente, y hasta un 85% de los casos tiene mutaciones en los genes BRAF (entre el 27 y 70% según las series) o N-RAS (15% de los casos)¹⁸². Sin embargo, la mayoría de los melanomas de los grupos restantes no tienen mutaciones en BRAF ni en N-RAS, sino que presentan con frecuencia un incremento del número de copias 11q13 y 12q14, que codifican la ciclina D1, que es codificada por el gen CCND1 y la cinasa 4 dependiente de la ciclina.

El análisis completo del genoma del melanoma ha revelado una enorme complejidad de alteraciones, que incluyen un número de mutaciones muy variable (de decenas a millares), variaciones en el número de copias y cambios en la metilación del ADN¹⁸³⁻¹⁸⁵. A pesar de ello, sólo una minoría de esas alteraciones contribuye a la formación y/o mantenimiento del melanoma, por lo que se han denominado como *drivers* moleculares, para discriminarlas de todas las demás mutaciones funcionalmente neutrales, que no desempeñan ningún papel esencial¹⁸⁶.

Los *drivers* son habitualmente recurrentes y ocurren de una forma mutuamente excluyente, lo que refleja que en la génesis del melanoma tan sólo estarían involucradas un número limitado de vías de señalización molecular.

El hallazgo molecular más frecuente en el melanoma es la pérdida del gen supresor tumoral p16, que produce la abolición de la barrera de senescencia p16-CDK4-RB. Prácticamente todas las líneas celulares de melanoma comparten alteraciones en el gen p16 (CDKN2A) o, de forma más rara, en los genes CDK4 o RB1¹⁸⁷. La proteína p16 controla la proliferación celular, ya que actúa como un supresor tumoral inhibiendo las cinasas dependientes de la ciclina que fosforilan la proteína del retinoblastoma, induciendo por tanto la detención del ciclo celular y la senescencia celular. La mutación

del gen CDKN2A afecta a la proteína p16, y está presente en la mayoría de pacientes con síndrome del nevo displásico y condiciona una predisposición al melanoma familiar. Parece ser que la prevalencia de la mutación de p16 está influida por la radiación solar, y que los pacientes con nevos atípicos presentan defectos en la reparación del ADN causadas por dicha radiación. Por otro lado, la mayoría de melanomas ocurren de forma esporádica (90%), y tan sólo en un pequeño porcentaje de casos se aprecia agregación familiar (5-10%). El melanoma familiar se ha asociado con mutaciones en línea germinal de los genes CDKN2A (20-40%) y CDK4 (2%).

Una parte sustancial de los drivers restantes del melanoma identificados hasta la fecha, son componentes de la vía de señalización intracelular MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), y de la vía de la PI3K/AKT (*phosphoinositidine 3-kinase*), que desempeñan un papel esencial tanto en el desarrollo de los melanocitos normales como en la génesis de tumores melanocíticos. Las vías MAPK y PI3K/AKT están íntimamente relacionadas y pueden activarse en circunstancias normales por factores de crecimiento, hormonas y citocinas, gracias a los receptores de tirosin quinasa. Su desregulación puede provocar que se activen de forma constitutiva, y pueden generar un crecimiento celular incontrolado y potenciar la supervivencia celular, favoreciendo de este modo el desarrollo y progresión del melanoma¹⁸⁸. Los activadores más comunes de la vía MAPK son mutaciones en BRAF, que son frecuentes tanto en melanomas como en nevos melanocíticos¹⁸⁹, constituyendo la sustitución de valina por ácido glutámico en el aminoácido 600 (V600E), el 90% de todas las mutaciones de BRAF¹⁹⁰. El evento que con más frecuencia provoca la activación constitutiva de la vía de señalización PI3K/AKT en el melanoma es la mutación inactivadora o la delección de PTEN¹⁹¹. Las mutaciones en algunos oncogenes como la amplificación o mutación de KIT, o la mutación de su efector NRAS¹⁹², también pueden activar las vías MAPK y PI3K/AKT.

1.7. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS

Aunque existen numerosos estudios sobre la regresión histológica en el melanoma, no sucede lo mismo con las lesiones melanocíticas benignas.

Por otro lado, los parámetros histopatológicos descritos hasta la actualidad para evaluar la regresión de neoplasias melanocíticas cutáneas no permiten discriminar con garantía, en caso de regresión completa o muy extensa, la naturaleza benigna o maligna de la población neoplásica primaria regresada.

El objetivo de este trabajo es tratar de identificar parámetros clínicos, histológicos y moleculares que permitan diferenciar la regresión de lesiones melanocíticas benignas y de melanomas. Para ello, se ha realizado un amplio estudio comparativo que ha incluido todo el espectro de lesiones melanocíticas con signos histológicos de regresión.

1.7.1. HIPÓTESIS

- Factores relacionados con el proceso destructivo como el tipo de infiltración linfocitaria, así como su densidad y la expresión de marcadores de activación y/o citotoxicidad, al igual que el grado de apoptosis y la densidad de melanófagos podrían ser diferentes en las neoplasias melanocíticas benignas y en las malignas.
- Factores relacionados con el proceso reparativo, como la respuesta del estroma en sus diferentes variedades de fibrosis e intensidad de la misma, al igual que el número de vasos neoformados o la existencia de atrofia epidérmica, pueden ser diferentes en las neoplasias benignas y en las malignas.
- Factores relacionados con las células tumorales como una reducción de la longitud de los telómeros de las células neoplásicas pueden ser esenciales para el desarrollo de fenómenos de regresión tanto en las neoplasias melanocíticas benignas como malignas.
- Una reducción de la longitud de los telómeros puede promover o evitar el desarrollo de melanoma en lesiones potencialmente peligrosas (nevus con displasia severa).

1.7.2. OBJETIVOS

Objetivos principales:

- Determinar los parámetros clínicos e histopatológicos que caracterizan la regresión de las neoplasias melanocíticas cutáneas (nevus melanocíticos comunes, nevus displásicos y melanomas), con particular énfasis en los patrones diferenciales entre las neoplasias benignas y las malignas.
- Estudiar la posible asociación entre la longitud de los telómeros en las neoplasias melanocíticas cutáneas con la presencia o ausencia de regresión en las mismas.
- Realizar un análisis estadístico de todas las variables para obtener cuáles son aquellas que permitirían de forma más fidedigna orientar el diagnóstico de aquellas lesiones con regresión completa o muy extensa.

Objetivos secundarios.

- Tipificar cuantitativa y cualitativamente las diferentes subpoblaciones que constituyen los infiltrados linfocitarios mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas convencionales y, por lo tanto, reproducibles en laboratorios de Anatomía Patológica y Dermatopatología. Se evaluará la respuesta linfocitaria (CD4, CD8) y en particular, la expresión de marcadores de activación (CD25), regulación (CD4,CD25,FoxP3) y citotoxicidad (CD8, granzima B y L-Fas) en todo el espectro de las neoplasias melanocíticas en regresión, con la finalidad de determinar las diferencias y analogías entre las neoplasias benignas y malignas, y su correlación con otros parámetros clínico-patológicos.
- Estudiar la posible asociación entre la longitud de los telómeros con el grado de displasia de las neoplasias melanocíticas (melanomas, nevus melanocíticos con

displasia “severa”, nevos melanocíticos con displasia “convencional”, y nevos melanocíticos sin displasia).

- Estudiar la implicación pronóstica de la presencia de regresión y de la longitud de los telómeros, comparando los melanomas con regresión incluidos en el estudio clínico-patológico con el grupo de melanomas sin regresión incluidos en la evaluación de la longitud telomérica.

II-METODOLOGÍA

2.1. MATERIAL

Este trabajo de tesis consta de dos estudios descriptivos, retrospectivos, en los que se han revisado diversas características clínicas, histológicas, inmunohistoquímicas y moleculares en una serie de neoplasias melanocíticas cutáneas que presentaban regresión en el estudio histológico.

2.1.1. Estudio clínico-patológico:

En primer lugar se ha realizado un estudio retrospectivo en el que se han revisado diversas características clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas de todas las neoplasias melanocíticas cutáneas que presentaron regresión en el estudio histológico, diagnosticadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia en el período de tiempo que abarca desde el 1 de enero de 2002 al 31 de diciembre de 2009.

Todas las muestras analizadas habían sido recibidas y registradas de forma consecutiva, y se seleccionaron utilizando la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica, empleando las palabras clave “melanoma”, “nevus melanocítico” y “regresión”.

Hemos considerado la existencia de regresión histológica cuando existía una sustitución de la población celular tumoral por un estroma fibroso, con grados variables de melanófagos, linfocitos, y vasos neoformados, como han sugerido otros autores^{27,65,81}. En las fases iniciales o activas de la misma predominaba la inflamación, mientras que la fibrosis era el evento predominante en la conclusión del proceso.

Tras revisar las historias clínicas, en ninguna de las lesiones estudiadas se documentó la existencia de antecedentes de traumatismos, reacciones inflamatorias o infecciosas, ni tratamientos previos que pudieran justificar el desarrollo de la regresión.

El estudio incluye un total de 163 muestras tumorales: 39 nevos melanocíticos sin displasia, 77 nevos melanocíticos displásicos (25 de los cuales tenían displasia severa) y 47 melanomas cutáneos primarios. Para estudiar las relaciones entre las distintas variables se ha realizado una agrupación de categorías en base a su coherencia clínica, juntando por un lado los nevos melanocíticos, y por otro todos los melanomas.

2.1.2. Estudio molecular:

En segundo lugar se ha efectuado un estudio de hibridación *in situ* con fluorescencia o FISH (*fluorescence in situ hybridization*), también retrospectivo, para evaluar la longitud de los telómeros en las células de 68 tumores melanocíticos, de los que 54 tenían signos histológicos de regresión y eran casos que se escogieron al azar entre los que se había realizado con anterioridad el estudio clínico-patológico (15 nevos comunes, 10 nevos displásicos, 10 nevos con displasia severa y 19 melanomas), mientras que los 14 casos restantes correspondían a melanomas sin regresión, que han servido como controles y que también se seleccionaron de forma aleatoria.

El análisis de la longitud telomérica en los melanomas y nevos melanocíticos seleccionados se ha efectuado en secciones tisulares de muestras incluidas en parafina de 3 micras de espesor, mediante sondas comercializadas.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Estudio clínico-patológico:

2.2.1.1. Variables clínicas:

Los datos clínicos se obtuvieron a partir de la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica y de la revisión de las historias clínicas del archivo del Hospital Clínico Universitario de Valencia.

Las variables clínicas que se han estudiado son:

- Edad del paciente: expresada en años en el momento del diagnóstico.
- Sexo del paciente: femenino o masculino.
- Localización de la lesión: cabeza y cuello, tórax, espalda, abdomen, brazos, piernas, genitales.

2.2.1.2. Variables histológicas:

El examen histológico se realizó sobre muestras de tejido fijadas en formaldehído tamponado al 10%, que fueron procesadas en alcoholes a concentraciones crecientes (deshidratación) y en xiloles para, a continuación, ser incluidas en parafina. Se realizaron secciones de 3 micrómetros y se montaron en portaobjetos con Poly-L-Lysina para su estudio microscópico mediante tinción con hematoxilina-eosina.

Tinción con hematoxilina-eosina:

- 1- Se incubaron las muestras a 60°C antes de desparafinar, aproximadamente 20 minutos.
- 2- Se desparafinaron las muestras en xilol durante 5 minutos.
- 3- Se hidrataron las muestras con pases de etanol a concentraciones decrecientes.
- 4- Se realizó la tinción nuclear con hematoxilina durante 5 minutos.
- 5- Se enjuagó con agua destilada durante 2 minutos.
- 6- Se sumergieron las muestras en ácido clorhídrico al 0,5% para decolorar (un pase rápido).
- 7- Se lavaron con agua corriente, posteriormente con hidróxido de amonio, y nuevamente se realizó otro lavado rápido con agua corriente.
- 8- Para la tinción citoplasmática, se sumergieron las muestras en eosina durante 4 minutos y se lavaron con agua corriente.
- 9- Se deshidrataron las muestras con pases de etanol a concentraciones crecientes.
- 10- Se aclararon con xilol durante 1 minuto.
- 11- Finalmente se montaron con Entellan[®] (un medio de inclusión para microscopía, de Merck) y un cubreobjetos.

Las variables histológicas estudiadas han sido:

- **Diagnóstico de lesión melanocítica**
 - o Nevo melanocítico
 - Diagnóstico
 - Nevo melanocítico

- Nevo de Spitz
 - Halo nevo
 - Regresión completa de nevo
 - Grado de displasia
 - Nevo sin displasia
 - Nevo con displasia “convencional”
 - Nevo con displasia “severa”
 - Localización del componente celular
 - Unión
 - Compuesto
 - Displásico
 - Melanoma
 - Tipo histológico de melanoma
 - Melanoma de extensión superficial
 - Melanoma de tipo léntigo maligno
 - Melanoma lentiginoso acral
 - Melanoma nodular
 - Melanoma no tipificable
 - Fase de crecimiento
 - Radial
 - Vertical
 - Índice de Breslow
- **Parámetros histológicos evaluados**
- Fibrosis:
 - Intensidad
 - Leve
 - Moderada
 - Extensa
 - Tipo
 - Laminar
 - Compacta

- Indeterminada
 - Delicada
 - Fibroplasia florida o de tipo esclerosis
- Localización
 - Acentuación subepidérmica o superficial
- Infiltrado inflamatorio:
 - Densidad
 - Tipo
 - Parcheado
 - Difuso
 - Localización
 - Intratumoral
 - Peritumoral
- Melanófagos:
 - Densidad
- Neovascularización:
 - Densidad
- Pérdida de melanocitos neoplásicos:
 - Leve
 - Moderada
 - Intensa
 - Total
- Apoptosis de células tumorales:
 - Ausente
 - Escasa
 - Intensa
- Atrofia epidérmica:
 - Ausente
 - Presente

Recogida y análisis de los datos histológicos.

La evaluación histopatológica ha sido realizada en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia, utilizando un microscopio Olympus® multicabezal. De cada lesión se estudiaron entre 2 y 5 laminillas, y los parámetros histológicos fueron valorados por dos observadores (JMM y CM) de forma simultánea y de común acuerdo, sin el conocimiento de los datos clínicos ni de otras variables de este estudio.

Los valores cuantitativos (densidad de linfocitos, de melanófagos y de vasos) se evaluaron utilizando el objetivo de 40 aumentos, efectuándose el recuento del número máximo de células o del parámetro estudiado por campo. Para ello se revisaron las distintas laminillas de las que disponíamos de cada caso, y se seleccionaron las áreas más representativas del parámetro que pretendíamos revisar, en las que éste era más abundante.

Los valores cualitativos (excepto los dicotómicos) se valoraron en función de la extensión, medida en el eje horizontal, que ocupaba el parámetro estudiado sobre el total del área tumoral, que fue estimada mediante escalas semicuantitativas, diferentes en función de cada parámetro (se describe posteriormente).

2.2.1.2.1. Definición de los diferentes tipos de lesiones melanocíticas estudiadas:

Diagnóstico de lesión melanocítica:

La distinción entre los distintos tipos de lesiones melanocíticas estudiadas, en especial entre los nevos con displasia “convencional” y los nevos con displasia “severa”, se ha realizado de forma similar a la propuesta por otros autores¹⁹³⁻¹⁹⁵ (**tabla 2.1**).

a. Nevos melanocíticos:

- **Nevo melanocítico:** los nevos melanocíticos están constituidos por una proliferación de melanocitos que tienden a agruparse en nidos o tecas. En función de la localización de dicha proliferación se clasifican como nevos de unión, compuestos o intradérmicos.

- **Halo nevo:** Se caracteriza histológicamente por un infiltrado linfocitario denso, en banda, simétrico, que se acompaña de una progresiva degeneración y desaparición de los melanocitos. El infiltrado es inicialmente muy prominente y va disminuyendo gradualmente. Las células supervivientes están inmersas en ese infiltrado inflamatorio, y pueden estar discretamente tumefactas, con variación en tamaño, y mostrar cierto grado de atipia ¹⁹⁶. La evolución biológica del halo nevo se caracteriza por la desaparición de las células névicas sin fibrosis significativa, a diferencia de lo que sucede en la regresión del melanoma, en el que la desaparición de las células se acompaña de fibroplasia de la dermis en la última fase ^{10,13}.

- **Nevo de Spitz:** Se trata habitualmente de lesiones pequeñas, simétricas y bien circunscritas. La lesión está constituida por nidos juncutales que tienden a disponerse verticalmente y que, aunque son grandes, el tamaño y la forma no varían demasiado y no se advierte confluencia. Entre los rasgos citológicos importantes se observan dos tipos de melanocitos: unos son grandes y epitelioideos, con abundante citoplasma y nucléolos prominentes, y otros son grandes y fusiformes. Estas células pueden estar entremezcladas, o con predominio de uno u otro tipo. También se observan en la variedad pagetoide células névicas salpicadas en capas altas de la epidermis, lo que plantea el diagnóstico diferencial con el melanoma “in situ”. Los denominados cuerpos de Kamino, que consisten en esferas homogéneas de material eosinofílico y que están constituidas por membrana basal, son un hallazgo útil para el diagnóstico del nevo de Spitz.

- **Regresión completa de nevo:** Se consideró que la regresión era completa cuando en el examen histológico se demostró la ausencia completa de celularidad melanocítica en la epidermis o en la dermis, confirmada mediante técnicas de inmunohistoquímica (Melan-A y proteína S-100), junto con la presencia de infiltrado linfocitario, melanofagia y proliferación vascular en un grado variable. La proteína S-100 y el Melan-A se utilizaron para comprobar si existía algún nido o hiperplasia lentiginosa residual.

Grado de displasia:

- **No displasia:** Las células suelen formar nidos bien definidos. Se considera que la maduración citológica de las células y la arquitectural de los nidos, que se manifiesta como una disminución gradual del tamaño de ambos en profundidad, donde adoptan frecuentemente morfología linfocitoide o fusocelular, son generalmente indicativos de benignidad.

- **Displasia:** En lo que se refiere a la arquitectura, una circunstancia habitual en el nevo displásico es la proliferación lentiginosa de las células névicas de la epidermis. Se observa elongación y distorsión de los nidos de melanocitos, fibrosis eosinofílica laminar alrededor de las crestas y de los nidos, y habitualmente un infiltrado linfocitario leve o moderado.

En lo que respecta a la citología, además de hiperplasia lentiginosa de los melanocitos se advierte atipia, que se traduce en núcleos grandes, irregulares e hiper cromáticos. Los melanocitos atípicos son una minoría (atipia salpicada o distribuida “al azar”), y se disponen de forma aislada o en pequeños grupos^{196,197}.

- **Displasia severa:** Existe alteración arquitectural, fundamentalmente en forma de tecas irregulares de células névicas, que tienden a ser confluentes en algunas áreas, observándose fusión de los mismos en crestas epidérmicas adyacentes. Las tecas predominan sobre las células individuales, aunque en el centro de la lesión puede existir cierta migración de células individuales. No obstante, no debe existir migración de células névicas individuales en la epidermis situada en la periferia de la lesión, que debe estar bien delimitada. Es habitual encontrar fibrosis eosinofílica en la dermis, asociada con la distorsión de las crestas epidérmicas.

Frecuentemente, existe una mezcla de células con núcleos atípicos junto a otras de núcleos más pequeños con cromatina dispersa. Los melanocitos atípicos son más numerosos que en los nevos con displasia convencional, y no existe la atipia confluyente habitual en el melanoma. Pueden hallarse figuras de mitosis en el componente juntural pero no en la parte profunda del componente dérmico¹⁹⁶⁻

¹⁹⁸.

Localización del componente celular:

- **Unión:** Hay células névicas o nidos en la unión dermoepidérmica, pero no en la dermis. Las células tienen una morfología variable entre oval y cuboidal, y pueden contener melanina en granos finos y dispersos por el citoplasma.
- **Compuesto:** Se aprecian nidos tanto en la zona de la unión dermoepidérmica como en la dermis. El componente de unión suele estar constituido por células cuboideas, mientras que en el componente dérmico se aprecian habitualmente melanocitos que recuerdan a linfocitos, porque son células más pequeñas, con escaso citoplasma y un núcleo redondo e hiper cromático.
- **Intradérmico:** Los nevos melanocíticos intradérmicos se caracterizan por carecer de nidos de unión y por presentar melanocitos en la dermis, que se disponen en nidos, cordones o trabéculas, aunque raramente pueden estar aislados. Los melanocitos localizados en las áreas más profundas de la dermis suelen adoptar una morfología fusiforme, y se agrupan con frecuencia en estructuras que recuerdan a pequeñas fibras nerviosas.

b. Melanomas

Melanoma: Los criterios histopatológicos de ayuda en el diagnóstico de la mayoría de subtipos de melanoma pueden dividirse en estructurales (crecimiento irregular y asimétrico, extensión pagetoide o lentiginosa periférica epidérmica, e invasión dérmica) y citológicos (pleomorfismo celular, ausencia de maduración en profundidad, y marcada actividad proliferativa en toda la lesión).

Arquitecturalmente, el melanoma se caracteriza por ser una lesión asimétrica y presenta en la mayoría de casos una mala delimitación en sus bordes laterales, donde con frecuencia se observan melanocitos aislados extendiéndose lateralmente en la epidermis, con un patrón pagetoide o lentiginoso.

En el seno de la lesión, en las fases iniciales se observan melanocitos atípicos aislados, que predominan sobre los nidos o tecas de melanocitos. Estos melanocitos no tienen una distribución periódica y ordenada. Cuando las células neoplásicas forman nidos, éstos no son equidistantes unos de otros y muestran una morfología y tamaño variable.

En cuanto al componente dérmico, el melanoma puede adoptar casi cualquier patrón, desde una dispersión difusa de células únicas o nidos, hasta una invasión micro o macronodular. Dado que el melanoma es un tumor genéticamente inestable, es frecuente que proliferen en contigüidad varios subclones de células, por lo que este patrón puede ser heterogéneo dentro del tumor. En la dermis es frecuente observar cambios reactivos como la presencia de infiltrado inflamatorio, fibrosis, desmoplasia y proliferación vascular irregular.

De los criterios citológicos, el más llamativo es el pleomorfismo nuclear de los melanocitos neoplásicos. Una clave importante en el diagnóstico citológico del melanoma es la transición abrupta entre los distintos grupos de células. La presencia de mitosis dérmicas, y/o áreas de necrosis también resultan de mucha utilidad para el diagnóstico. Del mismo modo, la ausencia de maduración arquitectural y citológica, y la distribución asimétrica y heterogénea del pigmento melánico y del infiltrado inflamatorio a lo largo de la lesión, también apoyarían el diagnóstico de melanoma.

Aunque cada tipo de melanoma tiene sus peculiaridades, los criterios histológicos básicos para su diagnóstico se fundamentan en algunos datos relevantes^{175,196-198}:

- Es un tumor asimétrico y mal delimitado.
- Predominan los melanocitos aislados, más que formando nidos, situados por encima de la unión dermoepidérmica y extendiéndose lateralmente en la periferia y hacia las capas más altas de la epidermis.
- Existe generalmente una ausencia de maduración en las capas más profundas de la dermis, es decir, no muestra una disminución progresiva de la pigmentación y de la actividad proliferativa, características clásicamente observadas en los nevos melanocíticos.
- Son también características las figuras de mitosis en la dermis profunda y la marcada atipia citológica.

Tipo histológico de melanoma:

- **Melanoma de extensión superficial:** Es la forma más frecuente de melanoma, ya que corresponde aproximadamente al 70% de los mismos. Puede aparecer en cualquier parte del cuerpo y a cualquier edad, aunque es más frecuente en la parte inferior de las piernas en la mujer y en el tronco en el hombre.

Histológicamente, los rasgos arquitecturales más importantes son los márgenes imprecisos y la asimetría. La epidermis muestra engrosamiento y adelgazamiento irregular, con melanocitos redondeados, grandes, diseminados en un patrón pagetoide. Estas células se agrupan en nidos en la parte inferior de la epidermis, y tienen tamaños y formas variadas, aunque tienden a confluir. La dermis muestra en ocasiones melanófagos y un infiltrado linfocitario generalmente denso y distribuido “en banda”, en particular en las lesiones invasoras, a diferencia de la disposición perivascular y parcheada del infiltrado característica de los nevos displásicos ¹⁹⁹. En lo que se refiere a la citología, las células son bastante homogéneas y poseen núcleos hipercromáticos y abundante citoplasma con partículas de melanina. Esta atipia uniforme tiene gran relevancia diagnóstica y contrasta con la atipia “al azar” de los nevos displásicos.

- **Melanoma sobre léntigo maligno:** Se observa en piel con marcado daño actínico, por lo que es más frecuente en la cara, y suele presentarse en la séptima u octava década de la vida. Su lesión precursora, el léntigo maligno, es una mácula irregular heterocrómica que crece lentamente, dado que presenta una fase de crecimiento radial prolongada. Cuando empieza la fase de crecimiento vertical, la lesión aumenta de grosor y aparecen nódulos en la superficie.

Histológicamente, los melanocitos neoplásicos proliferan mayoritariamente en el estrato basal en forma continua.

En lo que respecta a la arquitectura, en el estadio inicial puede observarse sólo hiperpigmentación periférica y proliferación leve de los melanocitos, sobre todo en la capa basal. Hacia el centro de la lesión, los melanocitos aumentan notablemente y su disposición es algo irregular. La epidermis suele ser atrófica.

La dermis superficial casi siempre revela una acentuada elastosis y contiene melanófagos y un infiltrado inflamatorio considerable, a menudo distribuido en banda.

Desde un punto de vista citológico, los melanocitos epidérmicos de las lesiones bien desarrolladas son numerosos y contactan entre sí. En algunas áreas superan a los queratinocitos basales. Muchos son fusiformes. Los núcleos son atípicos, grandes, hipercromáticos y pleomórficos.

Melanoma lentiginoso acral: Es particularmente frecuente en la raza negra y asiática, mientras que en la raza blanca constituye menos del 5% de todos los melanomas. Las localizaciones más frecuentes son las plantas y las palmas, y no se asocia generalmente a nevos melanocíticos.

Histológicamente es similar al léntigo maligno pero con una mayor proporción de melanocitos dendríticos. Las lesiones se denominan lentiginosas por el patrón predominantemente lineal y desordenado de células aisladas, preferentemente localizadas en las capas más basales de la epidermis. No obstante, algunas células pueden ocupar estratos superiores de la epidermis. A menudo, la pigmentación es acentuada y se advierten melanófagos en la dermis papilar y agregados de melanina en el grueso estrato córneo.

- **Melanoma nodular:** Supone un 10-15% de los melanomas. Habitualmente aparece *de novo* sobre una piel normal y puede manifestarse en cualquier localización, aunque es más frecuente en el tronco. Es la forma de melanoma que tiene un mayor riesgo de metastatizar, porque en el momento del diagnóstico suele presentar un espesor elevado.

Histopatológicamente se define por la presencia de fase vertical en ausencia de fase radial. Desde un punto de vista arquitectónico se advierte que la proliferación de los melanocitos atípicos dérmicos es contigua y a menudo configura una masa tumoral voluminosa. En general, la masa tumoral ocupa y expande la dermis papilar o se dispone entre las fibras colágenas de la dermis reticular.

Típicamente, la extensión pagetoide ascendente de las células tumorales, si está presente en el melanoma nodular, se limita a la porción suprayacente a la lesión

dérmica, por lo que el componente epidérmico no se extiende más allá del nivel de invasión dérmica.

En lo que se refiere a la citología, los núcleos atípicos de las células que constituyen los nódulos son más grandes que los de los melanocitos normales, y tienen bordes irregulares, cromatina hipercromática y nucléolos prominentes, de tamaño, forma y número variable e irregular.

- **Melanoma no tipificable:** es aquel que a pesar de reunir los criterios histológicos esenciales para el diagnóstico de melanoma, no cumple los criterios que permitan englobarlo en ninguno de los subtipos histológicos citados anteriormente.

Fases de crecimiento en el melanoma: Los melanomas crecen siguiendo una forma característica de progresión tumoral en dos fases: una fase de crecimiento radial, en la que el potencial metastásico es prácticamente nulo, y una fase de crecimiento vertical, en la que el tumor adquiere la capacidad de metastatizar.

En la fase de crecimiento radial u horizontal, las células de melanoma se localizan en la epidermis, o en ésta y en la dermis papilar, sin generar una masa tumoral (melanoma microinvasor). Después de un período de tiempo variable puede o no aparecer la fase de crecimiento vertical, con invasión de la dermis y formación de masa tumoral.

- **Crecimiento radial:** es la fase de crecimiento correspondiente a una neoplasia constituida por melanocitos atípicos de localización intraepidérmica y, de forma limitada en la dermis papilar, acompañada con frecuencia por una respuesta inflamatoria del huésped. Las células neoplásicas se expanden con un patrón pagetoide, lentiginoso o ambos, en ausencia de masa tumoral en la dermis (ningún acúmulo profundo más grande que los suprayacentes) y ausencia de mitosis en el componente dérmico.
- **Crecimiento vertical:** corresponde a un crecimiento tumoral en masa en la dermis. Se aprecia una masa de células de melanoma en la dermis, consistente en por lo menos en un acúmulo celular o nido más grande que los suprayacentes de mayor tamaño, y/o de mitosis en el componente dérmico.

Índice de Breslow: representa la distancia en milímetros desde la capa más superficial del estrato granuloso hasta la célula tumoral más profunda del melanoma. Es el factor pronóstico más importante del melanoma localizado, ya que existe una relación estrecha entre el índice de Breslow, la aparición de metástasis y la supervivencia del paciente.

Tabla 2.1. Resumen de las principales características histológicas consideradas para establecer el diagnóstico del grado de atipia de las lesiones melanocíticas estudiadas ^{193,194,198}.

CARACTERÍSTICA HISTOLÓGICA	Nevus sin displasia	Nevus displásico	Nevus con displasia severa	Melanoma
Delimitación lateral	Buena	Buena	Moderada	Mala
Simetría	Conservada	Conservada	Asimetría ligera	Asimétrica
Distorsión de nidos de unión	Ocasional	Moderada	Marcada	Marcada
Atipia celular	Mínima	Focal	Moderada	Generalizada
Migración pagetoide	Ocasional	Ocasional	Frecuente	Constante (MES)
Mitosis dérmicas	Muy escasas, superficiales	Muy escasas, superficiales	Muy escasas, superficiales	Superficiales y profundas

2.2.1.2.2. Definición de los parámetros histológicos evaluados.

Fibrosis

Con frecuencia, las lesiones melanocíticas muestran unas alteraciones en el colágeno que se producen como consecuencia de la respuesta que genera el huésped ante las mismas. En la fibrosis se produce un incremento de fibroblastos y colágeno en la dermis. Pueden apreciarse diversos tipos de cambio colágeno, y no es raro que se mezclen distintos tipos de patrones.

En este estudio hemos cuantificado la intensidad de la fibrosis en función de su extensión en el eje horizontal sobre el área total de la lesión melanocítica estudiada.

- Intensidad de la fibrosis:

- **Leve:** ocupa $<1/3$ del área total de la lesión estudiada medida en su eje horizontal.
- **Moderada:** ocupa $>1/3$ y $\leq 2/3$ del área total de la lesión estudiada medida en su eje horizontal.
- **Extensa:** ocupa $>2/3$ del área total de la lesión estudiada medida en su eje horizontal (**figura 2.1**).

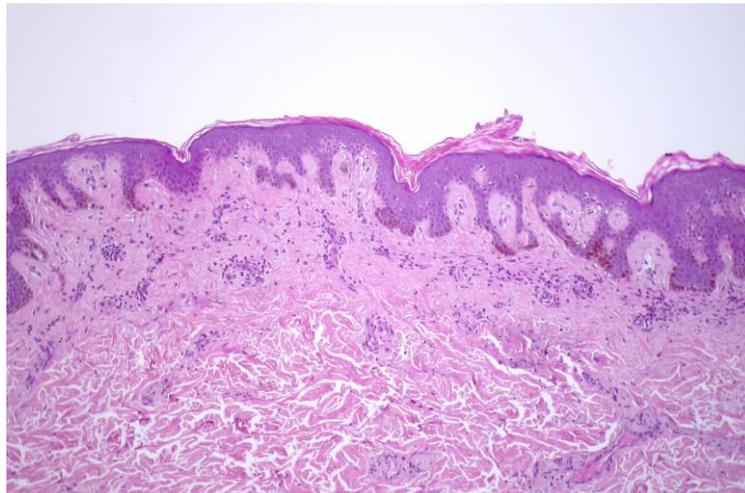


Figura 2.1. Ejemplo de fibrosis extensa, que abarca $>2/3$ de la extensión de la lesión en su eje horizontal. Hematoxilina-eosina, x 25.

Los distintos tipos de cambio colágeno que se han considerado se desglosan a continuación y se ilustran en la **figura 2.2**.

- **Tipos de fibrosis:**

○ **Laminar**

Consiste en la presencia de un colágeno fino, dispuesto en capas o láminas paralelas, generalmente subyacente a las puntas de las crestas, y con fibroblastos distribuidos a lo largo de dichas láminas según un patrón lineal. Se trataría por tanto de fibras colágenas delgadas y horizontales. También se denomina fibroplasia lamelar.

○ **Compacta**

Es una fibrosis eosinofílica que se produce por la compactación de un colágeno denso y acelular, que generalmente se localiza alrededor de las crestas epidérmicas.

○ **Delicada**

La fibrosis delicada es una peculiar variedad de fibroplasia constituida por haces extremadamente finos de colágeno, no ordenados, con mínima celularidad y sin signos de actividad significativa, que se localiza esencialmente en la dermis papilar.

○ **Esclerosis o fibroplasia florida**

Se trata de una forma extrema tanto cuantitativa como cualitativamente de fibrosis compacta. Se produce cuando hay un marcado incremento del colágeno de la dermis, que aparece constituido por haces gruesos, eosinofílicos y homogéneos (hialinización), acompañados de una disminución en el número de fibroblastos. En muchas ocasiones, representa un estadio tardío de la fibrosis. Hemos usado los mismos criterios que otros autores (fibrosis exagerada, cética, con una configuración en placa y que tiene una orientación horizontal)²⁰⁰.

○ **Indeterminada**

Denominamos fibrosis de tipo indeterminado a aquella que no se ajusta al resto de subtipos citados con anterioridad.

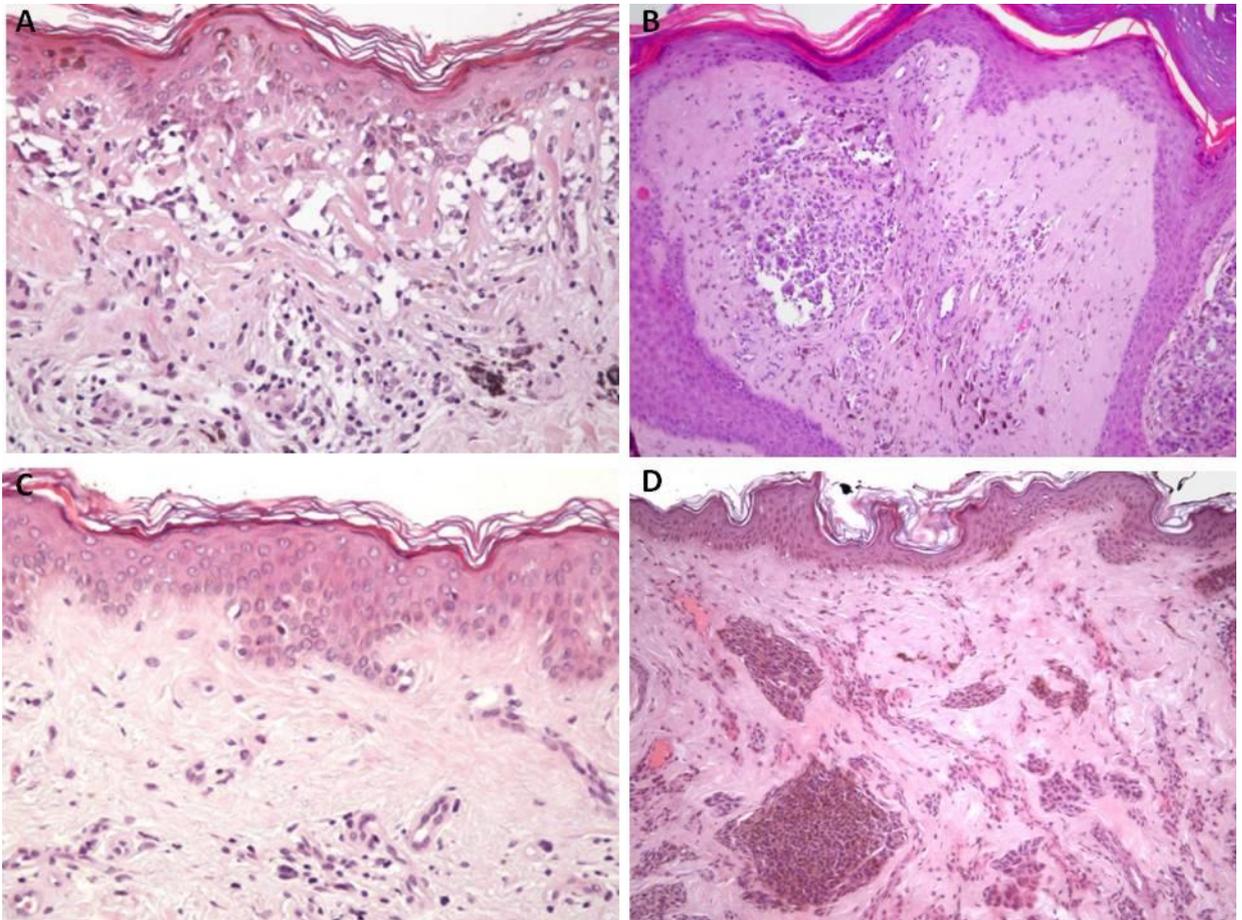


Figura 2.2. A: Fibrosis de tipo laminar predominantemente localizada en la dermis papilar. Hematoxilina-eosina, x 200. B: Melanoma con áreas de fibrosis compacta y zonas de regresión activa en la parte izquierda. C: Ejemplo de fibrosis delicada, constituida por haces extraordinariamente finos de colágeno. Hematoxilina-eosina, x 200. D: Fibroplasia florida o fibrosis de tipo esclerosis en un nevo con displasia severa. Hematoxilina-eosina, x 100.

- **Localización de la fibrosis**

○ **Superficial o subepidérmica**

Aunque en todos los casos la fibrosis se localiza en el espesor de la dermis papilar o de la reticular, consideramos que la fibrosis tiene una localización superficial o acentuación subepidérmica cuando se observa inmediatamente por debajo de la epidermis, subyacente a las crestas (**figura 2.3**).

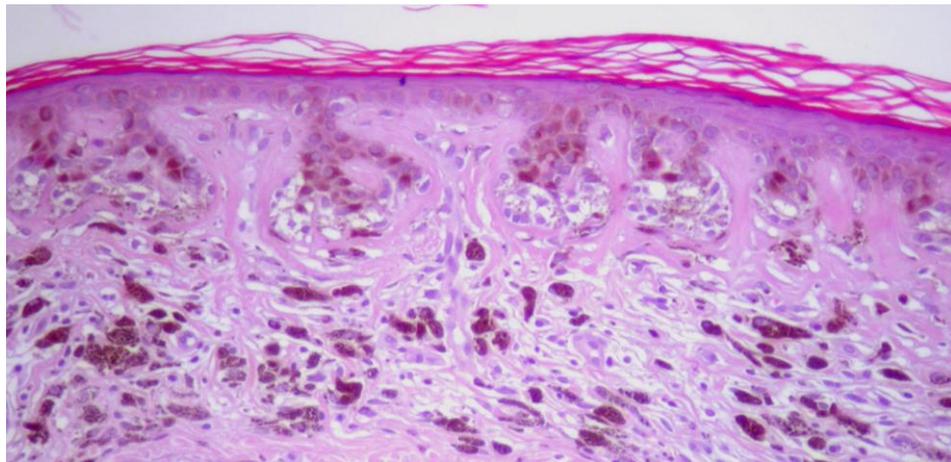


Figura 2.3. Detalle de la acentuación subepidérmica de la fibrosis. Hematoxilina-eosina, x 200.

Infiltrado inflamatorio

La presencia de infiltrado inflamatorio es un hallazgo muy habitual en los nevos displásicos y en los melanomas. Estos infiltrados varían desde escasos linfocitos y de localización perivascular a infiltrados densos, distribuidos a modo de banda, que pueden ocupar la totalidad de la dermis papilar.

Se ha estudiado la densidad del infiltrado inflamatorio, así como diversas características asociadas al tipo y distribución de los mismos.

- **Densidad**

- Se ha contado el número máximo de linfocitos por campo, usando el objetivo de 40 aumentos.

- **Tipo**

○ **Parcheado**

Se consideró la presencia de un infiltrado parcheado cuando se distribuía a modo de islotes en la dermis, dejando zonas libres de infiltración (figura 2.4).

○ **Difuso**

Se consideró la presencia de un infiltrado difuso cuando se distribuía de forma continua en la dermis, a modo de banda, sin dejar ninguna solución de continuidad de infiltración linfocitaria en el eje horizontal (figura 2.4).

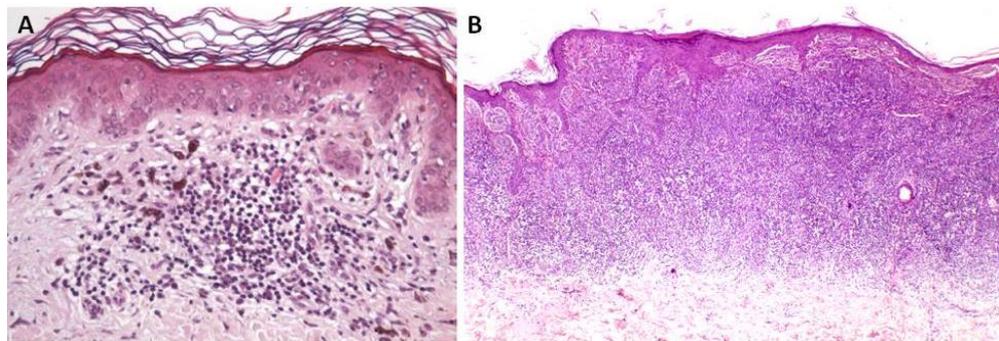


Figura 2.4. A: Infiltrado inflamatorio parcheado constituido mayoritariamente por linfocitos. Hematoxilina-eosina, x 200. B: Infiltrado inflamatorio difuso en un halo nevo. Hematoxilina-eosina, x 40.

- **Localización**

○ **Intratumoral**

Se consideró la presencia de un infiltrado intratumoral cuando se distribuía en el interior de la lesión melanocítica estudiada.

○ **Peritumoral**

Se consideró la presencia de un infiltrado peritumoral cuando se distribuía alrededor de la lesión melanocítica.

Melanofagia

Corresponde a la presencia de melanófagos situados en la dermis (**figura 2.5**). Suele observarse en zonas de regresión tumoral, aunque también puede corresponder a incontinencia pigmentaria postinflamatoria por daño epidérmico.

- Densidad

- Se ha contabilizado el número máximo de melanófagos por campo utilizando el objetivo de 40 aumentos.

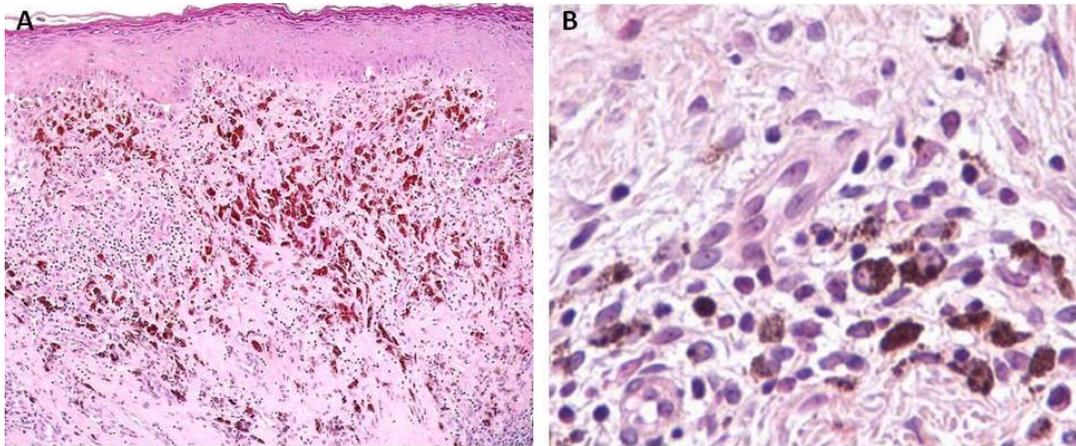


Figura 2.5. A: Numerosos melanófagos distribuidos de forma dispersa en todo el espesor de la dermis. Hematoxilina-eosina, x 200. B: Detalle a gran aumento de la presencia de melanófagos. Hematoxilina-eosina, x 400.

Proliferación vascular

La formación de nuevos vasos sanguíneos resulta fundamental para que se produzca la expansión de la masa tumoral, ya que deben aportar oxígeno y nutrientes en la medida adecuada. En el melanoma es frecuente la neoangiogénesis. Se trata habitualmente de vasos perpendiculares a la epidermis.

- Densidad

- Se ha determinado el número máximo de vasos por campo empleando el objetivo de 40 aumentos (**figura 2.6**).

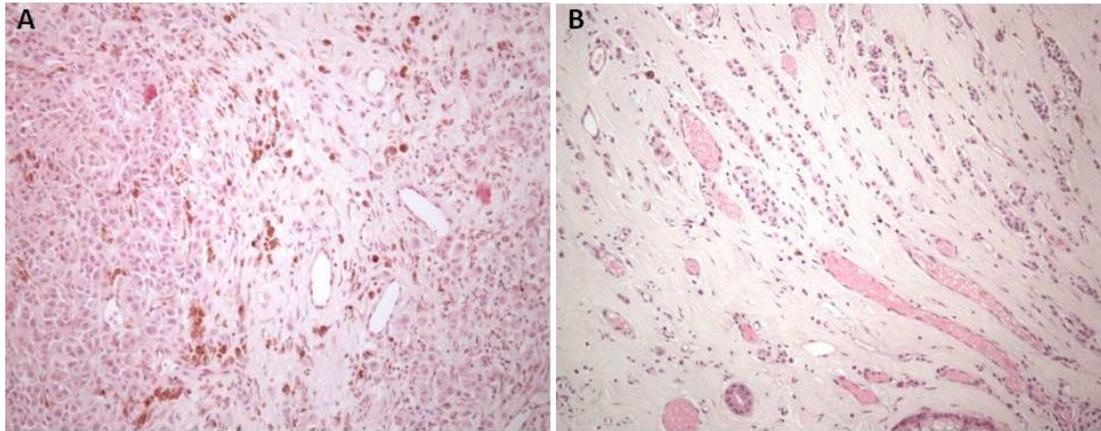


Figura 2.6. A: Numerosos vasos entremezclados con melanófagos. Hematoxilina-eosina, x 200. B: Vasos e infiltrado inflamatorio de tipo parcheado en la dermis papilar. Hematoxilina-eosina, x 200.

Pérdida de melanocitos

La pérdida de melanocitos es consecuencia de la destrucción de los mismos por la respuesta linfocitaria.

Hemos cuantificado la pérdida de melanocitos en función de su extensión en el eje horizontal sobre el área total de la lesión melanocítica estudiada:

- **Leve:** ocupa $<1/3$ del área total de la lesión estudiada.
- **Moderada:** ocupa $>1/3$ y $\leq 2/3$ del área total de la lesión estudiada (**figura 2.7**).
- **Intensa:** ocupa $>2/3$ y $<3/3$ del área total de la lesión estudiada.
- **Total:** ocupa el 100% del área total de la lesión estudiada.

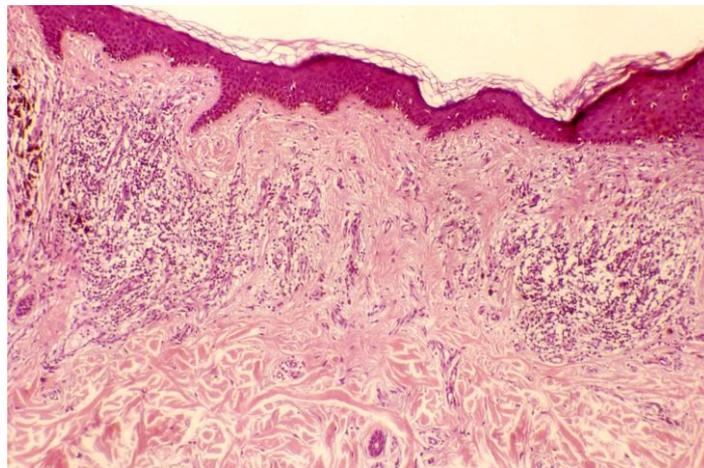


Figura 2.7. Ejemplo en el que se muestra pérdida moderada de melanocitos.

Apoptosis

La apoptosis de células tumorales es un hallazgo propio de las fases iniciales o activas de la regresión, y se debe a los numerosos linfocitos peri e intratumorales que se mezclan con las células neoplásicas, que provocan la fragmentación del tumor en pequeños nidos. Corresponde a células tumorales degeneradas, destruidas por el sistema inmune, y suele manifestarse como degeneración vacuolar o como pequeños cuerpos eosinófilos. En nuestro estudio hemos cuantificado la apoptosis en:

- **Ausente:**
 - No se apreciaba apoptosis en ninguna célula tumoral.
- **Escasa:**
 - Se apreciaban ≤ 2 células apoptóticas tumorales por campo utilizando el objetivo de 40 aumentos.
- **Intensa:**
 - Se apreciaban >2 células apoptóticas tumorales por campo utilizando el objetivo de 40 aumentos (**figura 2.8**).

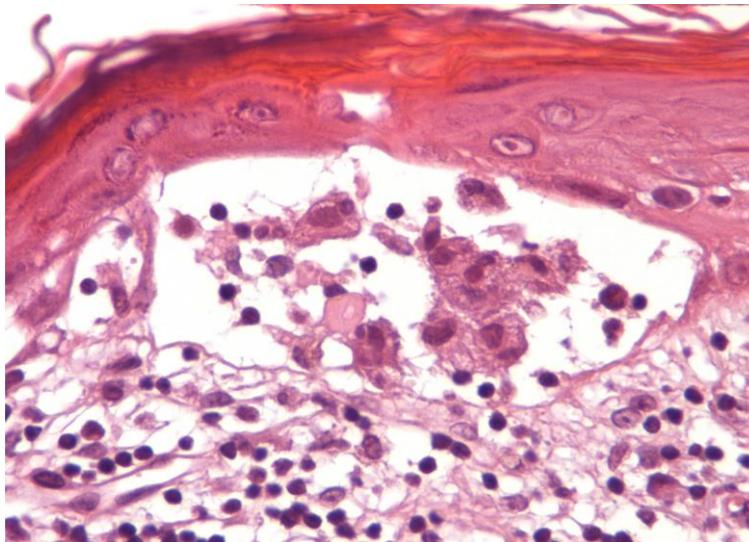


Figura 2.8. Detalle a gran aumento de la epidermis, que muestra números melanocitos en apoptosis. Hematoxilina-eosina, x 400.

Atrofia

Es un hallazgo propio de las fases tardías de la regresión y suele apreciarse en la epidermis suprayacente al área de regresión, que está adelgazada y ha perdido su red de crestas (**figura 2.9**).

- Se valoró la presencia o ausencia de la misma.

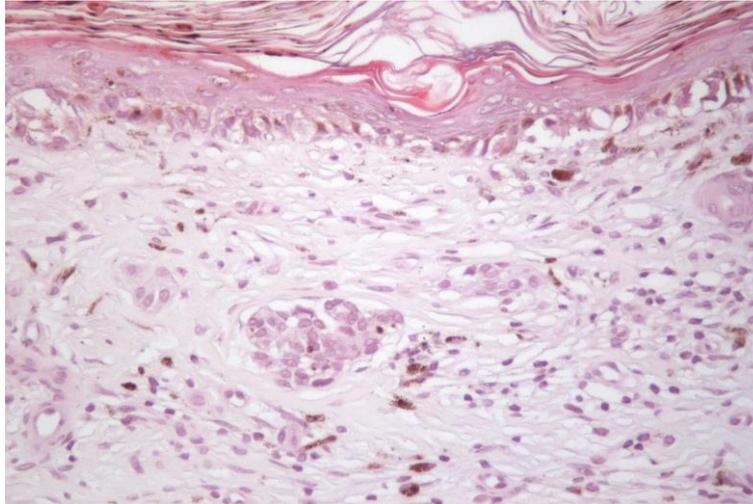


Figura 2.9. Ejemplo en el que se muestra una epidermis con atrofia, que está adelgazada y ha perdido su red de crestas. Hematoxilina-eosina, x 100.

2.2.1.3. Variables inmunohistoquímicas:

2.2.1.3.1. Introducción a la técnica inmunohistoquímica.

La inmunohistoquímica constituye en la actualidad una herramienta diagnóstica fundamental en dermatopatología, ya que ayuda en el diagnóstico, diagnóstico diferencial y pronóstico de muchos procesos inflamatorios y neoplasias cutáneas, y es especialmente útil para determinar el origen de un tejido o la diferenciación de las células neoplásicas.

Se trata de un grupo de técnicas de inmunotinción que permiten demostrar diversos antígenos tisulares o celulares mediante su unión con anticuerpos específicos marcados por un enzima. La reacción antígeno-anticuerpo se hace visible si el anticuerpo está

marcado con una sustancia que absorbe o emite luz, o bien produce coloración, al originar un precipitado insoluble y coloreado.

En las técnicas de inmunoperoxidasa se utilizan como marcadores enzimas capaces de modificar de color un sustrato incoloro. Las enzimas más frecuentemente utilizadas son la peroxidasa y la fosfatasa alcalina, y los cromógenos más comunes son la diaminobenzidina (color marrón), el aminoetilcarbazol (color rojo) y el nitroazul de tetrazolio (color azul). Estos marcadores pueden unirse directamente al anticuerpo primario, o conjugarse indirectamente mediante otros anticuerpos secundarios o sustancias como la biotina o la proteína A. Cuando se trata de la técnica con anticuerpos marcados indirectamente, el anticuerpo secundario se une al primario, que a su vez ya se ha unido al antígeno específico en estudio.

En las técnicas de inmunofluorescencia se utilizan como marcadores compuestos fluorescentes que bajo luz ultravioleta emiten luz de longitud de onda visible, que depende de la naturaleza del compuesto. Estas técnicas necesitan muestras en fresco y congeladas, sin fijación convencional, ya que los antígenos están presentes en superficies celulares y son muy lábiles a la fijación en formol. La inmunofluorescencia directa, es decir con anticuerpos conjugados con el marcador fluorescente, se utiliza frecuentemente en el diagnóstico de enfermedades cutáneas como las enfermedades ampollosas, las mesenquimales o las vasculitis, en donde tiene indicaciones y utilidades muy precisas. Esta técnica, pese a ser muy sensible, presenta inconvenientes como la pérdida progresiva de la fluorescencia, requiere de un microscopio de luz ultravioleta, y el detalle morfológico es pobre. Además, para documentar cada caso, es preciso fotografiar la reacción ²⁰¹.

2.2.1.3.2. Técnica empleada

Una vez revisados los parámetros histológicos de los casos estudiados se procedió al estudio inmunohistoquímico, para lo cual preparamos matrices tisulares (*tissue microarrays* o TMA) a partir de los bloques en parafina.

Se trata de una técnica que en la actualidad tiene gran aceptación, debido a que permite el estudio simultáneo de múltiples muestras tisulares en una misma sección. Consiste en colocar minuciosamente un número elevado de pequeñas muestras cilíndricas de

tejido tumoral en un único bloque de parafina, circunstancia que permite el procesamiento de todos los tumores bajo las mismas condiciones técnicas. Además de la ventaja que supone poder estudiar a la vez varias muestras del tumor, se requieren pequeñas cantidades de reactivos, mínimo personal de laboratorio y es un método que proporciona una extrema eficacia en relación a su coste.

Para este trabajo construimos 6 matrices tisulares que contenían un total de 317 fragmentos de lesiones melanocíticas.

Posteriormente se efectuó el estudio inmunohistoquímico por técnica convencional mediante 6 anticuerpos comerciales frente a: CD4, CD8, CD25, FoxP3, Granzima B y L-Fas.

2.2.1.3.3. Construcción de las matrices tisulares:

Recogida de bloques y preparaciones: se escogieron los bloques más representativos de todas las lesiones incluidas en el estudio.

Selección del área a incluir en la matriz: tras revisar las laminillas teñidas con hematoxilina-eosina correspondientes a los diferentes bloques, para la construcción de los TMA se seleccionaron las 2 o 3 áreas más representativas de cada laminilla, preferentemente aquellas en las que se apreció infiltrado inflamatorio prominente, y se marcaron con un rotulador de tinta indeleble. A continuación, se enfrentó el portaobjetos con el bloque correspondiente para identificar las áreas señaladas.

Diseño de la matriz: Se diseñaron 6 matrices tisulares de filas y columnas, que estaban constituidas por entre 7 y 8 filas, y entre 8 y 10 columnas. Cada matriz contenía entre 46 y 55 cilindros tumorales, que correspondían a un número de lesiones melanocíticas que oscilaban entre 15 y 20. Así mismo, en cada matriz se añadieron 2 controles externos de otro tumor con inmunofenotipo conocido, que sirvieron para validar que la inmunotinción era correcta y también como control de posición.

Se confeccionaron seis plantillas para poder identificar la posición exacta de cada muestra en el mismo orden en que estaba dispuesta en la matriz (**figura 2.10**).

07B23816	07B23816	08B1961	08B1961	07B21342	07B21342				
07B22067	07B22067	07B22183	07B22183	07B22743	07B22743	07B23470	07B23470	07B23639	07B23639
	07B20912	07B20912	07B21515	07B21515	07B21515	07B21944	07B21944	07B22065	07B22065
07B18505-1	07B18505-1	07B18923	07B18923	07B19214	07B19214	07B19902	07B19902	07B20537-2	07B20537-3
07B17135-4	07B17135-3	07B17424-2	07B17424-2	07B17674	07B17674	07B17846-3	07B17846-2	07B18264	07B18264
07B3870	07B 3870	07B5030-2	07B 5030-1	07B7582	07B 7582	07B10906	07B10906	07B13902	07B13902
CONTROL	CONTROL								

Figura 2.10. Representación de una plantilla usada en la confección de los *arrays*.

Construcción de la matriz: Para confeccionar los bloques con el material que luego se empleó en el estudio inmunohistoquímico se utilizó el aparato MTA-1 (*Manual Tissue Arrayer, Beecher Instruments, Inc., Sun Prairie, WI, USA*).

Este dispositivo consiste en un sistema manual de extracción y posterior inserción de cilindros de tejido, que permite agrupar numerosas muestras tisulares en un único bloque de parafina (**figura 2.11**).

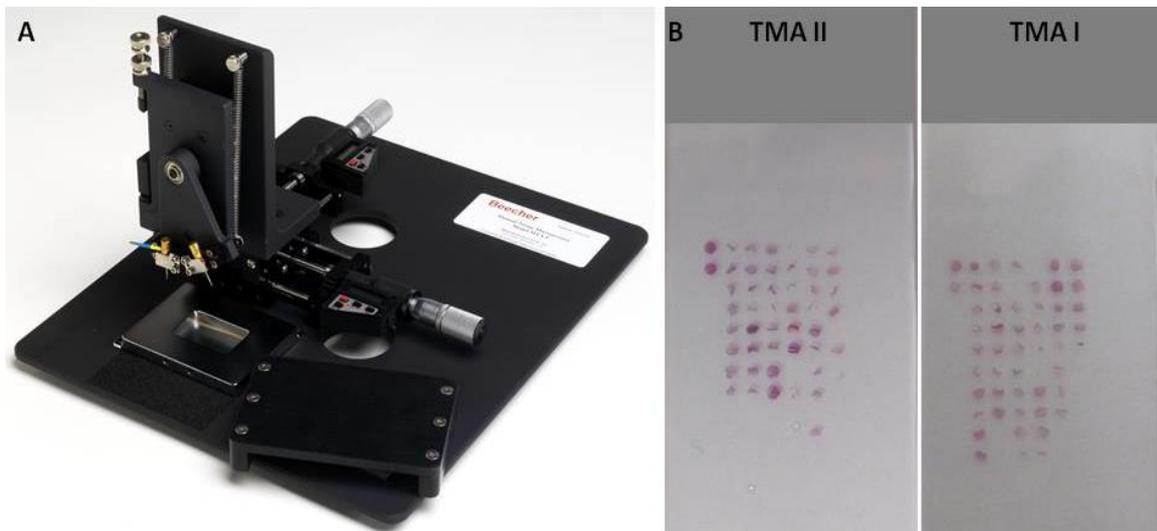


Figura 2.11. A: Imagen del aparato MTA-1 empleado para la confección de las matrices tisulares. B. Ejemplo de laminillas obtenidas para el estudio inmunohistoquímico tras la confección de los *arrays*.

Los bloques matrices se construyeron de la siguiente manera:

- En primer lugar, se desgastó ligeramente la parafina con el micrótopo, con la finalidad de que todos los cilindros tuvieran el mismo ángulo. Posteriormente, se colocó y se fijó el bloque receptor en la base del instrumento y se situó el tejido que sirve como testigo de acuerdo a la ubicación de la plantilla.
- Para confeccionar los bloques se usaron dos agujas de 1 mm de diámetro, una para crear una matriz regular de agujeros en un bloque de parafina receptor, y otra para extraer los fragmentos tisulares de las áreas previamente seleccionadas en los bloques de tejido donantes. Se situó a la izquierda la que extrae el cilindro del tejido del bloque donante y a la derecha la que realizaba el agujero en el bloque receptor.
- Se ajustaron a cero los micrómetros que marcan la alineación de las filas y columnas en los cilindros.
- Se realizó el agujero en el bloque receptor, rotando el émbolo de la aguja para profundizar unos 3 mm.
- Se colocó el bloque con el tejido donante sobre el puente del aparato, se cambió de aguja, y se extrajo el tejido tumoral marcado previamente.
- Se retiró el puente con el bloque donante y se colocó el cilindro de tejido sobre el agujero hecho en la parafina del bloque receptor, pero sin hundirlo.
- Se colocó encima un portaobjetos para alisar la superficie del cilindro y poder nivelarla con la parafina.
- Se cambió la medida del micrómetro a la posición siguiente para realizar el agujero con la respectiva aguja, realizándose desplazamientos laterales de 2 mm cada vez.
- Se repitió el mismo proceso de forma sucesiva hasta completar todos los casos.
- Como ya se ha mencionado, de cada caso se escogieron entre 2 y 3 cilindros de aquellas áreas más representativas del tumor, especialmente en aquellas en las que el infiltrado inflamatorio era más prominente.

Conservación de la matriz: Una vez construidas estas matrices se introdujeron en una estufa a 37°C durante 12 horas para llevar a cabo la homogeneización y consolidación de las mismas, al mezclarse la parafina de los cilindros de tejido tumoral con la parafina del bloque receptor.

Posteriormente se realizaron un mínimo de 12 secciones de 2 micras de grosor de cada matriz tisular, que se fijaron en un portaobjetos de Dako (ref. K.8020), y se procesaron para los estudios inmunohistoquímicos.

Finalmente se almacenaron todas las muestras protegidas con una capa de parafina líquida.

2.2.1.3.4. Protocolos empleados en las técnicas de inmunotinción:

Se llevó a cabo el estudio inmunohistoquímico de 6 anticuerpos (**CD4, CD8, CD25, FoxP3, Granzima B y L-Fas**) usando las matrices tisulares.

La técnica de inmunohistoquímica se realizó siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

a. Desparafinación

- Se calentaron las preparaciones histológicas a 65°C durante 30 minutos
- Se incubaron en un primer xilol durante 15 minutos y luego se realizaron pases rápidos por xilol limpio.

b. Rehidratación

- Se lavaron con alcohol absoluto.
- Se lavaron con alcohol al 70%.
- Se lavaron con alcohol al 50%.
- Se lavaron bien con agua y agua destilada.

c. Desenmascaramiento antigénico

- Los anticuerpos **CD4, CD8 y Granzima B** se incubaron en tampón comercial de Dako con pH alto, durante 3 minutos, a 1,5 atmósferas de presión en autoclave.

- (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (DM828)* código K800; tampón Tris/EDTA concentrado 50 veces, pH 9; para su uso se realizó una dilución 1:50 con agua destilada).
- Los anticuerpos **CD25 y Fas-L** se incubaron en tampón comercial de Dako con pH bajo, durante 3 minutos, a 1,5 atmósferas de presión en autoclave.
 - (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, Low pH (50x) (código K8005)*); tampón de citrato concentrado 50 veces, pH 6,1; para su uso se realizó una dilución 1:50 con agua destilada).
- Por último, el anticuerpo **FoxP3** se incubó en baño termostatzado a 99°C, durante 40 minutos, con tampón TRIS-EDTA con pH 9.

d. Bloqueo de peroxidasa endógena

- Una vez realizada la descompresión del autoclave se dejaron enfriar las preparaciones en los respectivos tampones y después se lavaron con agua, agua destilada y por último con TBS comercializado por Dako
 - (*EnVision™ FLEX Wash Buffer (20x) (DM831)*); solución salina tamponada con Tris que contiene *Tween 20*, concentrada 20 veces, pH 7,6 ($\pm 0,1$); para su uso se realizó una dilución 1:20 con agua destilada).
- Se incubaron las preparaciones en solución de bloqueo de peroxidasa comercializada por Dako durante 10 minutos, que es una solución tamponada que contiene peróxido de hidrógeno y conservante (Ref. S2023).
- No hemos bloqueado el colágeno para evitar la tinción de fondo inespecífica, ya que gracias a la presencia de proteínas estabilizantes en los reactivos de Dako utilizados no es necesario (según la información aportada por la casa comercial).

e. Anticuerpo primario

- Se lavaron 3 veces con TBS.
- Se diluyeron los anticuerpos puros en diluyente de anticuerpo comercializado por Dako.
 - o (*EnVision™ FLEX Antibody Diluent Ref. K8006*; Tampón Tris, pH 7,2 que contiene 15 mmol/L de NaN₃ y proteína).
- Las concentraciones para cada uno de los anticuerpos se especifican en la (**tabla 2.2**).
- Se incubó una hora a temperatura ambiente.

f. Sistema de visualización

- Se lavaron 3 veces con TBS.
- Incubación de los anticuerpos:
 - o En el caso de los anticuerpos **CD8, CD4, y Fas-L** se realizó una incubación con *EnVision* durante 30 minutos.
 - (*Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV) Ref. K5007*); se trata de dextrano unido a moléculas de peroxidasa y moléculas de anticuerpo secundario de cabra frente a inmunoglobulinas de conejo y ratón en solución tamponada, que contiene proteína estabilizante y conservante. Este reactivo es un polímero conjugado con peroxidasa, que también está recubierto de anticuerpos frente a las inmunoglobulinas de conejo y de ratón. Se compone de un esqueleto de dextrano al que se han unido un gran número de moléculas de peroxidasa (HRP) y moléculas de anticuerpo secundario. Para la reacción de unión se ha utilizado una química única, que permite la unión de hasta 100 moléculas de HRP y hasta 20 moléculas de anticuerpo por esqueleto.
El anticuerpo secundario unido al esqueleto de dextrano se ha obtenido de cabras, y reacciona igualmente bien con

inmunoglobulinas de conejo y ratón; por tanto, sólo se necesita un reactivo de detección para los anticuerpos primarios de conejo y ratón).

- Para el anticuerpo **Granzima B** se utilizó también *EnVision*, pero añadiendo una incubación posterior al anticuerpo primario y anterior al *EnVision* con *Linker Mouse* durante 30 minutos. Este reactivo se utilizó para obtener una amplificación de señal del anticuerpo primario de ratón. Al usar *EnVision™ FLEX+ Mouse* (código K8002) la amplificación de señal aumenta 4–5 veces. Se trata de una solución tamponada que contiene proteína estabilizante y un antibiótico.
- Por último, para los anticuerpos **FoxP3 y CD25** se utilizó el sistema de visualización LSAB.

- (*Dako LSAB+ System-HRP Código K0690*, para su uso con anticuerpos primarios de conejo, ratón y cabra. El kit utiliza una técnica avidina-biotina en la que el anticuerpo secundario biotinado reacciona con diversas moléculas conjugadas de estreptavidina. Para ello se realizan incubaciones secuenciales con anticuerpo de enlace biotinado y estreptavidina marcada con peroxidasa. El anticuerpo de enlace contiene inmunoglobulinas biotinadas contra anticuerpos de conejo, ratón y cabra en solución tampón salina fosfato (PBS, por sus siglas en inglés) que contiene proteína estabilizadora y 0,015 mol/L de azida sódica. El reactivo estreptavidina peroxidasa contiene estreptavidina conjugada con peroxidasa en PBS, que posee proteína estabilizadora y un agente antimicrobiano).

Primero se incubaron las preparaciones en el reactivo de enlace (*biotinylated link universal*) durante 20 minutos. Pasado ese tiempo se lavaron las preparaciones con TBS y luego se incubaron con estreptavidina peroxidasa (*streptavidin-HRP*) durante 20 minutos más.

- Se lavaron 3 veces con TBS en todos los casos
- Se lavaron con agua destilada
- Se visualizó la reacción
 - Para la visualización de la reacción se incubaron las preparaciones durante 5 minutos en DAB (*Substrate Working Solution*) suministrada por el kit Dako REAL™.
 - (*EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse (Código K5007)*). El kit contiene un Frasco B (*Dako REAL™ Substrate Buffer*) con 250 mL de solución tamponada que contiene peróxido de hidrógeno y conservante, y un Frasco C (*Dako REAL™ DAB+ Chromogen*) con 5 mL de 3,3' diaminobenzidina en solución de cromógeno. La solución *Substrate Working Solution*, que contiene DAB (CHROM), se prepara mezclando bien 20 µL de *Dako REAL™ DAB+ Chromogen* (frasco C) y 1 mL de *Dako REAL™ Substrate Buffer* (frasco B). El sistema de sustrato produce un producto final marrón claro en el lugar del antígeno diana).
- Se paró la reacción lavando con agua destilada.

g. Tinción de contraste

- Se utilizó tinción de Giemsa durante 10 minutos
- Se lavaron las preparaciones con agua destilada

h. Deshidratación

- Se realizó con pases en alcoholes de graduación creciente hasta etanol absoluto.

i. Aclarado

- Se realizó mediante pases en Xilol.

j. Montaje

- Se cubrieron las preparaciones con cubreobjetos y Entellan®.

Tabla 2.2. Relación de anticuerpos evaluados en este trabajo de tesis:

ANTICUERPO	CASA COMERCIAL	CLON	PRETRATAMIENTO	DILUCIÓN	SISTEMA DE VISUALIZACIÓN
CD8 (Anticuerpo monoclonal)	NOVOCASTRA	1A5	Autoclave 3 minutos a 1,5 atmósferas con tampón comercial de Dako de pH alto	1/50	ENVISION (DAKO K5007)
FOXP3 (Anticuerpo monoclonal)	AbCAM	236A/E7	40 minutos en baño a 99°C con tampón Tris-EDTA pH 9	1/100	LSAB (DAKO K0690)
CD25 (Anticuerpo monoclonal)	NOVOCASTRA	4C9	Autoclave 3 minutos a 1,5 atmósferas con tampón comercial de Dako de pH bajo	1/200	LSAB (DAKO K0690)
FAS-L (Anticuerpo monoclonal)	NOVOCASTRA	5D1	Autoclave 3 minutos a 1,5 atmósferas con tampón comercial de Dako de pH bajo	1/10	ENVISION (DAKO K5007)
GRANZIMA B (Anticuerpo monoclonal)	DAKO	GrB-7	Autoclave 3 minutos a 1,5 atmósferas con tampón comercial de Dako de pH alto	1/50	ENVISION (DAKO K5007)
CD4 (Anticuerpo monoclonal)	NOVOCASTRA	1F6	Autoclave 3 minutos a 1,5 atmósferas con tampón comercial de Dako de pH alto	1/10	ENVISION (DAKO K5007)

2.2.1.3.5. Evaluación de la inmunoreactividad:

Se consideró una reacción positiva ante el anticuerpo cuando la célula tumoral mostró tinción a nivel del compartimento diana para cada anticuerpo: nuclear (FoxP3), membrana citoplasmática (CD4, CD8, CD25, L-Fas y granzima B) (**figura 2.12**).

Todas las matrices tisulares fueron evaluadas sin conocimiento de los datos clínicopatológicos, de forma simultánea y de común acuerdo por el autor de este trabajo de tesis (J.M.M) y por uno de los directores del mismo (C.M).

La valoración de la inmunotinción ha sido realizada en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia utilizando un microscopio Olympus[®] multicabezal. De cada lesión se estudiaron entre 2 y 3 cilindros tumorales, y los datos obtenidos fueron pasados a una base de datos.

El número de células tumorales con reactividad positiva para CD4, CD8, CD25, Granzima B y FoxP3 fue estimado considerando el número máximo de células positivas que se apreciaba por campo, utilizando el objetivo de 40 aumentos.

El número de células tumorales inmunoreactivas para L-Fas fue estimado como minoritario si se expresaba en $\leq 50\%$ de los linfocitos, o mayoritario si lo hacía en $> 50\%$ de los mismos.

Al realizar el estudio inmunohistoquímico se excluyeron los casos en los que el tejido tumoral incluido en la matriz tisular (TMA) fue insuficiente para la evaluación de la población linfocitaria.

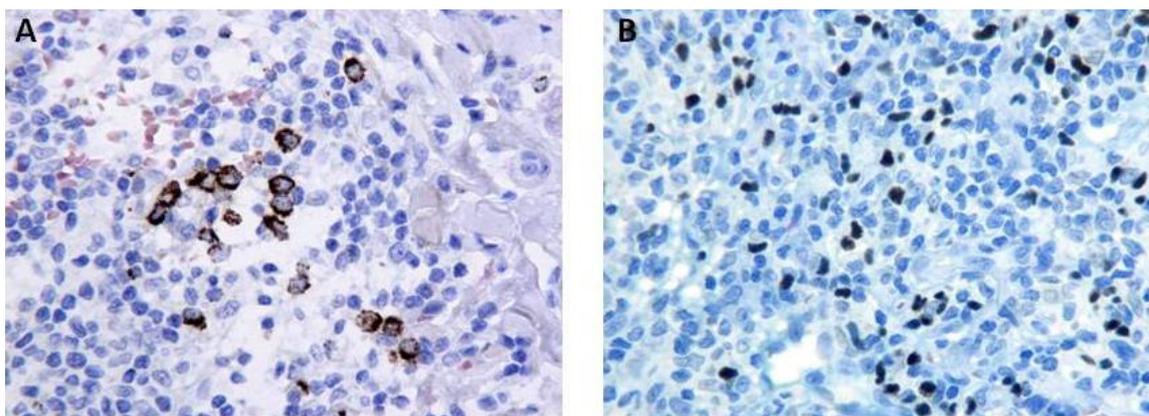


Figura 2.12. A: Inmunotinción positiva en la membrana citoplasmática de las células con granzima B. B: Inmunotinción positiva nuclear para FoxP3. Inmunoperoxidasa, x 400.

2.2.1.3.6. Marcadores inmunohistoquímicos empleados:

Los marcadores inmunohistoquímicos (anticuerpos) que hemos empleado han sido los siguientes (**figura 2.13**):

CD4

El CD4 o *cluster of differentiation 4* es una molécula que se expresa en la superficie de algunas células T y en las células dendríticas. Es una glucoproteína monomérica de 59 kDa que contiene cuatro dominios (D1, D2, D3, D4) de tipo inmunoglobulina.

Participa en la adhesión de las células T a las células diana, y está implicado también en la maduración tímica y en la transmisión de señales intracelulares durante la activación del HLA II. El anticuerpo monoclonal anti-CD4 es uno de los marcadores más frecuentemente utilizados en el estudio de infiltrados de linfocitos T, y confiere a la célula un papel colaborador o *helper*.

Por otro lado, en respuesta a antígenos solubles o células autólogas no T, provoca la proliferación de células T, lo que genera la señal adecuada para la proliferación y diferenciación de las células B en células secretoras de inmunoglobulinas²⁰¹.

CD8

El CD8 o *cluster of differentiation 8* es una molécula que se expresa en la superficie de algunas células T. Es una glucoproteína dimérica de 65-70 kDa que cruza la membrana y participa como coreceptor en la estabilización de la adhesión del receptor de linfocitos T a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHC I). También está implicado en la maduración tímica de linfocitos T y en la transmisión de señales intracelulares durante la activación del HLA I.

El anticuerpo monoclonal anti-CD8 es, al igual que el CD4, uno de los marcadores más frecuentemente utilizados en el estudio de infiltrados de linfocitos T. En este caso, se trata de un marcador de células citotóxicas y de algunas asesinas naturales o “*natural killer*”²⁰¹.

CD25

El CD25 es un marcador de la subunidad α del receptor de la interleucina 2 (IL-2). El antígeno CD25 es una glucoproteína transmembrana de cadena simple, con una masa molecular de 55kD, que está presente en los linfocitos T y B activados, algunos timocitos, células precursoras mieloides y en oligodendrocitos.

El CD25, que es crucial en la regulación de la proliferación de células T, se considera un marcador de estimulación reciente antigénica ya que se sintetiza y secreta con rapidez.

Las células CD4⁺ CD25⁺ son células T reguladoras, conocidas también como Treg, entre cuyas funciones se encuentran la supresión de la activación de células T autoreactivas y prevenir la autoinmunidad²⁰².

FOXP3

FoxP3 pertenece a la subfamilia FoxP, y se trata de un gen regulador clave, fundamental para la generación y función de las células T reguladoras (Treg), las cuales expresan marcadores CD4 y CD25, y como se ha comentado con anterioridad constituyen una subpoblación de células T con efectos sobre la inhibición o activación de algunos genes con importancia en la regulación inmune. Por tanto, están especializadas en mantener el equilibrio entre la inmunidad y la tolerancia. FoxP3 se considera el marcador más específico de la población Treg.

El gen FoxP3 humano está localizado en la región cromosómica Xp11.23. Está formado por 11 exones que codifican una proteína de 431 aminoácidos. Además de en las células CD4⁺ CD25⁺, el gen también se expresa en tejidos linfoides como el timo, el bazo y los ganglios linfáticos.

Bajo la estimulación del receptor de células T, las células Treg suprimen tanto la proliferación como la activación de otros linfocitos CD4 y CD8.

En algunas neoplasias sólidas las células Treg también suprimen la respuesta de los linfocitos citotóxicos frente a los antígenos tumorales, por lo que al frenar la respuesta inmune pueden inducir la progresión de la neoplasia²⁰³.

GRANZIMA B

Las granzimas son una familia de serinproteasas que se localizan en los gránulos citoplasmáticos de los linfocitos T citotóxicos. Se liberan en respuesta a la interacción de éstos con las células diana.

La granzima es un mediador inmunológico de apoptosis que, una vez se ha sintetizado y liberado por linfocitos citotóxicos activados, entra en la célula diana e inicia los mecanismos apoptóticos implicados en diferentes niveles de las vías apoptóticas.

Existen varios tipos de granzimas (A, B, H, K y M), que tienen actividad serina esterasa y que se encuentran específicamente en los gránulos de los linfocitos citotóxicos. Las granzimas penetran en la célula diana a través de los poros generados por las perforinas, y activan la procaspasa 3 y 8 en la célula diana.

El papel de las granzimas en los procesos de citotoxicidad y otras respuestas inmunes no está completamente esclarecido, pero sus efectos parecen mediarse por la hidrólisis de sustratos localizados tanto extra como intracelularmente. De este modo, algunas granzimas son capaces de hidrolizar determinados receptores y desencadenar sus cascadas metabólicas, mientras que otras, una vez internalizadas a través de los poros originados por la perforina, pueden hidrolizar sustratos nucleares.

La granzima B constituye el tipo de granzima más estudiada e induce apoptosis a través de la activación secuencial de las caspasas 3 y 9, implicando a la vía mitocondrial. Por otro lado también induce apoptosis a través de la generación de radicales libres, implicando también a la mitocondria, pero sin activación de caspasas. Finalmente activa mecanismos alternativos de inducción de muerte celular que no dependen de las vías descritas hasta el momento ²⁰⁴.

L-FAS

El ligando de Fas (L-Fas o CD95L) es una proteína transmembrana de tipo II que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Se trata de una glicoproteína con un peso aproximado de 40 kDa. Es capaz de activar el programa de apoptosis en células que expresan el receptor Fas y que poseen la maquinaria genética necesaria. Así mismo, las interacciones entre el L-Fas y su receptor juegan un importante papel en la regulación del sistema inmune y en la progresión del cáncer.

En contraste con el receptor Fas, que se expresa constitutivamente en un gran número de tipos celulares, la expresión de su ligando está restringida²⁰⁵. L-Fas se expresa en linfocitos T activados, en células NK, en neuronas y en astrocitos, y es la molécula efectora más importante de los linfocitos T citotóxicos.

Tras la activación del receptor Fas por su ligando soluble o asociado a la célula, la proteína transmembrana Fas trimeriza formando microagregados, e interactúa con un factor intermedio denominado FADD (*factor associated death domain*), que pone en marcha el complejo cisteinil-aspartato proteasas (caspasas), y que culmina con el fraccionamiento del ADN y la muerte celular por apoptosis.

La apoptosis desencadenada por la unión de Fas a su ligando L-Fas juega un papel fundamental en la regulación del sistema inmune. Sus funciones incluyen:

- **Homeostasis de células T:** la activación de células T conduce a la expresión del ligando de Fas. Las células T son inicialmente resistentes a la apoptosis mediada por Fas durante la expansión clonal, pero se vuelven progresivamente más sensibles a medida que son activadas, resultando en última instancia en la activación de la muerte celular inducida. El proceso es necesario para prevenir una respuesta inmune excesiva y eliminar células T autoreactivas. Los humanos con mutaciones de Fas o ligando de Fas desarrollan una acumulación de células T aberrantes, que pueden conducir al desarrollo de adenopatías, esplenomegalia o lupus eritematoso.
- **Actividad citotóxica T:** La apoptosis inducida por Fas y la vía de las perforinas son los dos principales mecanismos por los cuales los linfocitos T citotóxicos inducen la muerte celular en células que expresan antígenos que se reconocen como extraños.
- **Privilegio inmune:** las células en áreas de privilegio inmune como la córnea o los testículos expresan ligando de Fas e inducen la apoptosis de linfocitos infiltrantes. Este es uno de los principales mecanismos que el organismo emplea en establecer y mantener el privilegio inmune.

- **Contraataque tumoral:** Ciertos tumores pueden sobreexpresar ligando de Fas e inducir la apoptosis de los linfocitos que los infiltran, permitiendo al tumor escapar de los efectos de la respuesta inmune ^{206,207}. La sobreexpresión de ligando de Fas ocurre a menudo tras quimioterapia, y es un mecanismo por el cual los tumores pueden adquirir resistencia a la quimioterapia.

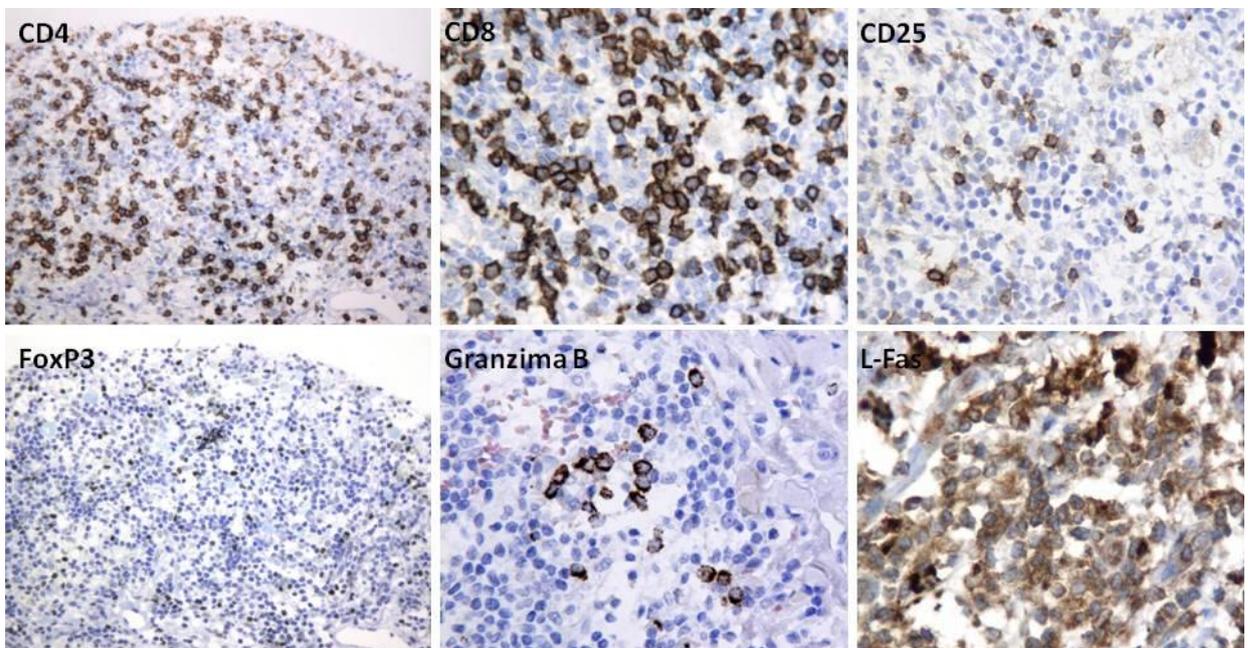


Figura 2.13. Ejemplos de tinción de los linfocitos con los distintos marcadores inmunohistoquímicos empleados. Inmunoperoxidasa.

2.2.2. Estudio molecular:

2.2.2.1. Introducción a la técnica de FISH.

Se trata de una técnica citogenética basada en las técnicas de hibridación “in situ”. Consiste en la detección de secuencias concretas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) mediante el empleo de sondas específicas marcadas por un fluorocromo, lo que permite que se puedan visualizar con un microscopio de fluorescencia.

Los dos componentes principales de la técnica de FISH convencional son la sonda de ADN marcada con fluorescencia y la secuencia diana en la muestra tumoral.

La FISH permite detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos en cromosomas, bien sea en la metafase cromosómica o en el núcleo en interfase. Permite trabajar en tejido en fresco, muestras congeladas, o tejidos incluidos en parafina, lo que hace que esta técnica sea muy útil en estudios retrospectivos de tumores sólidos. Tiene alta sensibilidad y especificidad, es una técnica rápida ya que pueden ser analizadas un gran número de células en poco tiempo, y también tiene la ventaja de que se obtienen resultados fiables cuando la cantidad de tejido disponible es escasa.

La clave del éxito de la FISH radica en usar un protocolo eficiente que exponga la secuencia diana de los genes y permita la penetración de la sonda, pero que mantenga simultáneamente la morfología y la estabilidad de la célula.

Los pasos fundamentales en la realización de la técnica son ²⁰⁸:

Realización del corte: Las secciones se deben realizar a 3 micras. Es necesario que el corte sea homogéneo para que la técnica funcione de forma correcta.

Fijación: Se realiza a través de fijadores y permite detener el metabolismo celular e inactivar enzimas lisosómicas como ARNasas endógenas, para conservar la morfología y la integridad de los ácidos nucleicos. Fijadores como el formol actúan formando puentes de metileno entre los grupos amino del ADN o de las proteínas. Esto ayuda a preservar la integridad de los tejidos pero reduce la penetración de las sondas. El tiempo de fijación afecta directamente a la hibridación y a la eficacia de la fluorescencia.

Pretratamiento: El objetivo de los pretratamientos es permitir la accesibilidad de la sonda al ácido nucleico diana. La asociación del ADN con las proteínas, reforzada por la fijación, dificulta el acceso de la sonda por lo que es necesario un pretratamiento que desenmascare el ADN. Mediante un agente químico y el calor se destruyen estos puentes. Posteriormente, deben eliminarse las proteínas y los restos citoplasmáticos mediante una enzima proteolítica, que posibilita de este modo la accesibilidad de la sonda al ADN.

Desnaturalización: Consiste en la separación de las dos hebras del ADN. El aumento de temperatura debilita y rompe los enlaces covalentes (puentes de hidrógeno). La temperatura de desnaturalización variará dependiendo fundamentalmente del contenido de bases G-C, que son las que confieren una mayor estabilidad. La temperatura es condicionante de la técnica FISH. Las señales de hibridación más nítidas se obtienen a una temperatura de 99°C durante 10 minutos, seguido de enfriamiento durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Hibridación: Es el paso en el que la sonda se une al ADN en base al grado de complementariedad que presente con la secuencia diana. Se produce una renaturalización del ADN con su secuencia diana a una temperatura entre 37-45°C.

Lavados: Tienen como finalidad eliminar la hibridación inespecífica que produce fondo y enmascara la hibridación específica. Permite controlar la especificidad con la que se va a llevar a cabo una reacción. El rigor con el que se realiza la hibridación determina la fidelidad de la misma, o sea, el porcentaje de nucleótidos correctamente apareados. Para ello es preciso tener en cuenta la temperatura y la concentración iónica. La concentración de sal es inversamente proporcional a la estabilidad de los híbridos. Los lavados en concentraciones decrecientes de Na⁺ provocan la disociación de los híbridos según su estabilidad: los menos estables serán desnaturalizados antes que los más estables. Al aumentar la temperatura progresivamente sólo permanecerán unidos los híbridos con mayor estabilidad.

Detección: Según el marcador empleado, en este caso un fluorocromo, se produce una detección directa al microscopio óptico con los filtros añadidos.

Sondas: Una sonda es una cadena de nucleótidos cuyo contenido (secuencia de bases nitrogenadas) es conocido y complementario de la secuencia que se quiere detectar, denominada “secuencia diana”. La sonda reconoce y se une a través de las bases nucleicas a la secuencia complementaria de ADN (diana) presente en la muestra. Es decir, se dispone de sondas específicas tanto para cromosomas individuales como para regiones cromosómicas, que permiten identificar reordenamientos particulares, obtener un diagnóstico de la existencia de un número anormal de cromosomas, o estudiar la longitud de los telómeros como sucede en este caso.

Las sondas FISH pueden estar directamente marcadas con fluorocromos que no necesitan anticuerpos para su detección (sondas directas), o con moléculas marcadoras que sí necesitan anticuerpos para su detección (sondas indirectas). Se obtienen a partir de ADN clonado de las regiones cromosómicas que se quieren examinar o mediante PCR, y reciben el nombre de sondas convencionales. Si se desarrollan por medio de una síntesis química de nucleótidos se denominan sondas sintéticas, y son en general más cortas que las anteriores. En nuestro caso se ha utilizado una sonda sintética de PNA (péptido de ácido nucleico). Las secuencias de bases de las pruebas de PNA dictan la especificidad de la unión a las secuencias complementarias de ADN o ARN, por lo que se pueden unir a regiones distintas del cromosoma en función de su diseño. Desde que se descubrieron sus capacidades de unión, los PNA se han empleado en una amplia variedad de aplicaciones biomédicas, incluyendo la investigación genética, el diagnóstico y la terapéutica experimental²⁰⁹⁻²¹³.

2.2.2.2. Técnica empleada

Para la realización de la técnica FISH se usó la sonda comercializada por Dako “*Telomere PNA FISH Kit/ Code K5326*”. Estos kits se utilizan para la detección de secuencias teloméricas de humanos (u otros vertebrados) por hibridación “in situ” con fluorescencia, usando como sonda una prueba PNA (péptido de ácido nucleico) fluorocromo Cy3 conjugada que aporta el kit. Cada kit contiene reactivos para 20 pruebas y permite la detección rápida de las secuencias de telómeros en cromosomas en metafase y en núcleos en interfase, ya que emplean sondas complementarias a las mismas.

La prueba no reconoce secuencias subteloméricas permitiendo la medición exacta de la longitud del telómero. El método es óptimo para cuantificar, mediante intensidades de fluorescencia, las longitudes teloméricas promedio de los extremos cromosómicos en células individuales ²¹⁴, ya que la intensidad fluorescente de las manchas se relaciona directamente con la longitud de las secuencias teloméricas, constituídas por ADN altamente repetitivo, que están localizadas en las terminaciones de cada cromosoma ²¹⁵.

Protocolo empleado en la preparación de las muestras para FISH:

1. Desparafinar durante 30 minutos en estufa a 65°C.
2. Lavar con xilol para eliminar los restos de parafina.
3. Deshidratar con alcohol a 99°C durante 3 minutos.
4. Lavar en *buffer* o TBS durante 2 minutos.
5. Desenmascaramiento enzimático o recuperación antigénica a temperatura de 99°C con una solución de ácido etanosulfónico.
6. Lavar con *buffer*.
7. Introducir en TBS o *buffer* durante 1 minuto.
8. Introducir en formaldehído al 3,7% durante 2 minutos.
9. Realizar 2 lavados de 5 minutos con TBS.
10. Digestión enzimática o pretratamiento durante 10 minutos a temperatura ambiente, utilizando pepsina (proteínasa K) a 37°C.

11. Realizar 2 lavados de 5 minutos con TBS.
12. Deshidratar en alcoholes a concentración creciente (70°C, 85°C y 96°C) durante 2 minutos en cada uno.
13. Dejar secar al aire.
14. Desnaturalización a 80°C durante 5 minutos con Hibridizer® de Dako.
15. Hibridación usando 10 µl de sonda PNA a temperatura ambiente durante 120 minutos.
16. Lavar con *RINSE solution* a temperatura ambiente durante 5 minutos.
17. Lavado de astringencia con *Wash solution* durante 5 minutos a 65°C.
18. Deshidratar en alcoholes a concentración creciente (70°C, 85°C y 96°C) durante 2 minutos en cada uno.
19. Secar al aire 5 minutos.
20. Aplicar 15µl de DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol), que es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina, y sirve de referencia ya que tiñe el núcleo de azul. Se aplicó sobre el portaobjetos con una pipeta y se colocó encima un cubreobjetos para que se esparciera bien, ya que se trata de un medio muy espeso.
21. Guardar en la nevera, aunque se pueden congelar si es preciso.

2.2.2.3. Metodología utilizada para cuantificar la longitud de los telómeros.

La cuantificación de la señal fluorescente de los telómeros fue realizada utilizando un algoritmo semiautomático de un paquete de software de análisis de imagen *Image-Pro Plus 7.0* (Media Cybernetics, Inc. Rockville, USA). En cada caso, se analizaron entre 6 y 8 campos de 91802,620 µ². De cada campo disponíamos de una foto para la señal fluorescente de los telómeros y de otra foto con la señal de los núcleos teñidos con DAPI. Inicialmente se captaba y se calibraba la imagen, y posteriormente seguíamos los siguientes pasos (**figura 2.14**):

- 1.- Transformación de la imagen a escala de grises, extrayendo los colores rojo y azul y utilizando únicamente el verde.

2.- Procesamiento de la imagen donde eliminábamos el fondo y utilizábamos el filtro de Lo Pass, que suaviza los bordes de las señales y permite captarlas mejor.

3.- Segmentación manual de la imagen: para ello utilizamos una escala de grises donde el zoom en el histograma estaba comprendido entre 102 y 254, aunque en algunos casos, para ajustarse a los objetos, era necesario modificar estos límites.

4.- Análisis automático de la imagen: cuantificábamos por un lado las señales fluorescentes de los telómeros existentes en todo el campo, determinando en cada caso el número de señales, el área y la intensidad media de cada señal. Para eliminar el ruido de fondo y evitar que hubiera varias señales agrupadas utilizábamos el filtro del área, dejando el límite inferior en 0,27 y el superior en $4 \mu^2$. Así mismo, se contaron el número de núcleos existentes en ese mismo campo. En este caso el filtro del área estaba comprendido entre 360 y $100.000 \mu^2$. Estos datos se trasladaron a una tabla de Excel, dividiéndose la intensidad de las señales fluorescentes teloméricas entre el número de señales DAPI, y determinando de este modo la intensidad de las señales que tenía cada célula por término medio.

En cuanto a las señales fluorescentes de los telómeros, únicamente se midieron los puntos que aparecían nítidos, descartándose los difusos. No se midieron los puntos que, aunque nítidos, no coincidían con la presencia de una célula identificable con el DAPI. Si dos puntos estaban pegados, sólo se contaba uno.

Respecto a los núcleos marcados con DAPI, se descartaron los núcleos y sus telómeros que sólo mostraron una pequeña parte. Por otro lado, sólo se cuantificaron los núcleos con señal fluorescente para telómeros, excluyéndose los que no tenían.

Se ha realizado un recuento de la intensidad de las señales en un mínimo de 30 células neoplásicas y de 30 células epidérmicas adyacentes al tejido tumoral, que han servido como control interno en cada caso.

2.2.2.4. Variables evaluadas en el estudio molecular:

La intensidad de la señal fluorescente se relaciona directamente con la longitud de los telómeros de cada cromosoma. Dado que la prueba no reconoce secuencias subteloméricas permite la medición exacta de la longitud del telómero.

Se determinó la intensidad de las señales teloméricas en células tumorales, en células epidérmicas adyacentes, el cociente entre ambas, y el coeficiente de variación de la longitud de los telómeros, reflejo de la heterogeneidad de los mismos.

- Intensidad media de las señales teloméricas:
 - En las células tumorales (en un mínimo de 30 células).
 - En las células epidérmicas (en un mínimo de 30 células).
 - Cociente entre la intensidad media de las señales en las células tumorales y en las epidérmicas: se realizó para corregir la variabilidad de la hibridación, ya que las células epidérmicas sirvieron como control interno en cada caso.

- Coeficiente de variación de las señales teloméricas:
 - Se ha utilizado el coeficiente de variación para medir la dispersión de las intensidades de las señales de los telómeros respecto a la media.
 - La fórmula matemática que define el coeficiente de variación es el cociente entre la desviación típica y la media.
 - Un coeficiente de variación elevado se relacionaría con una mayor heterogeneidad de la variable, en este caso la longitud de los telómeros, mientras que un coeficiente de variación reducido, con la homogeneidad de los mismos.
 - Se realizó exclusivamente en las células tumorales.

2.2.2.5. Visualización de los resultados con el microscopio

Los resultados son visibles con un microscopio de fluorescencia. En nuestro caso se empleó:

- Un microscopio de fluorescencia Olympus[®] U-25ND6.
- Los filtros de excitación/emisión de fluorescencia usados fueron: (*Chroma Technology Co*[®]: *Cy3 excitation, 546nm/10nm BP; emission, 580 nm LP and DAPI excitation, 330 nm; emission, 400 nm*).
- En cada caso estudiado se observó, en primer lugar, una sección teñida con hematoxilina-eosina, para localizar con más facilidad la zona a visualizar. Posteriormente se colocó en el microscopio la laminilla preparada para el FISH, y una vez seleccionados los campos, se fotografiaron con el objetivo de 100 X de inmersión. Se realizaron un mínimo de 3 fotografías para cada componente: tumor y epidermis adyacente.

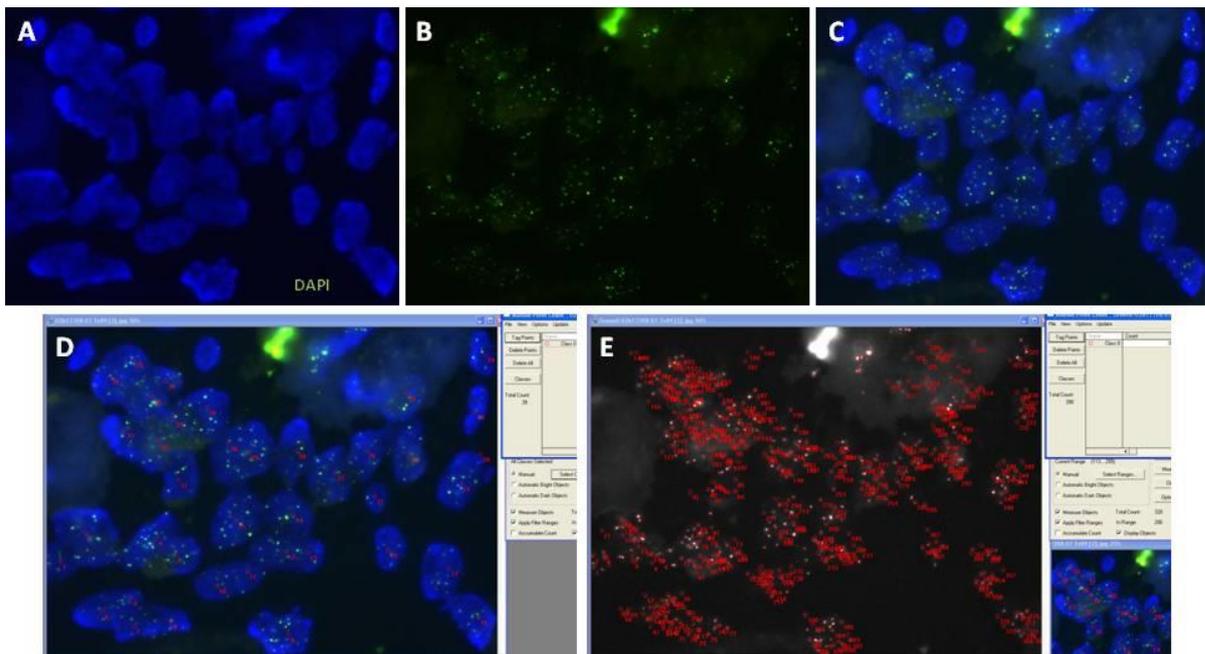


Figura 2.14. A: Tinción con Dapi de los núcleos. B: Los puntos verdes representan las señales teloméricas, con una intensidad distinta en función de la longitud de los mismos. C: Imagen de superposición en la que se aprecian los telómeros (puntos verdes) de forma más nítida sobre el contorno nuclear teñido con el dapi (azul). D y E: El software de análisis de imagen otorga un valor numérico a las distintas señales en función de su intensidad (que es equiparable a la longitud de los telómeros).

2.2.3. EVALUACIÓN DEL PRONÓSTICO

Para establecer la asociación entre la presencia o ausencia de regresión en los melanomas y el pronóstico de los mismos, el número total de melanomas estudiados fue de 61, 47 con regresión (todos los melanomas con regresión del estudio clínico-patológico) y 14 sin regresión (los 14 melanomas sin regresión que se incluyeron de forma aleatoria en el estudio molecular).

A efectos de la evaluación del pronóstico, el período de seguimiento de los pacientes incluidos en este estudio concluyó el 31 de diciembre de 2013. El tiempo medio de seguimiento de los 61 pacientes con melanoma fue de 6,2 años (rango de 4 a 10 años).

Se consideró que el paciente estaba libre de enfermedad cuando en la última revisión efectuada (la más próxima a la fecha del 31 de diciembre de 2013) no se constató la existencia de diseminación del melanoma.

Se consideró que el paciente presentaba metástasis si el melanoma se había diseminado, tanto por la demostración de afectación ganglionar como visceral.

En el estudio molecular también se han establecido las asociaciones entre el pronóstico y diversas variables como el cociente entre la intensidad media de las señales de las células tumorales y el de las epidérmicas, o el coeficiente de variación de las señales teloméricas. Para ello se han usado los 33 melanomas que se emplearon para estudiar la longitud de los telómeros (19 con regresión y 14 sin regresión).

2.3. LIMITACIONES:

De la regresión clínica:

- La ausencia de un estudio previo, clínico o dermatoscópico, de las lesiones con anterioridad a que se desarrolle el proceso de regresión.
- Al haberse obtenido las lesiones utilizando una base de datos del Servicio de Anatomía Patológica, no se dispone de la imagen clínica de las mismas en el momento en que se realizó la extirpación.

Del estudio histológico:

- En los casos con regresión tardía no se pueden evaluar de forma fiable los melanocitos que ya han sido destruidos, que posiblemente son los que podrían aportar una información más fidedigna, y las poblaciones linfocitarias son residuales y poco activas.
- A pesar de que todos los melanomas incluidos en el estudio son melanomas primarios, no hemos hecho énfasis en el estadio en el momento del diagnóstico.

Del estudio inmunohistoquímico:

- Aunque el muestreo que se obtiene con los TMA es limitado, en este estudio se seleccionaron previamente las áreas con mayor infiltrado linfocitario para obtener los cilindros tisulares.
- La existencia de un marcaje inespecífico. Se han descartado para el estudio aquellos casos en los que no existía inmunotinción apropiada en los controles internos o externos.
- El empleo de la expresión de FoxP3 como único marcador de las células T reguladoras CD4+CD25+. La expresión de FoxP3 no es específica de este particular subgrupo de células T ya que FoxP3 también se induce durante la estimulación de células T. Por tanto, aunque se considera el marcador más específico de las Tregs, también se puede expresar de forma transitoria en células T activadas.

Del estudio molecular:

- La imposibilidad de delimitar, en caso de superposición, los límites nucleares.
- Al tratarse de cortes parafinados se depende del plano que haya sido cortado y del grosor del mismo, por lo que en ocasiones no abarca la totalidad de la célula.
- No se pueden evaluar los telómeros de las células que ya han sido eliminadas, al igual que sucede con el estudio histológico e inmunohistoquímico.

2.4. EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ÉTICOS:

Este protocolo fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Clínico Universitario de Valencia para el proyecto de investigación en biomedicina de la Consellería de Sanidad de la Generalitat Valenciana titulado “Determinación de parámetros clínico-patológicos y moleculares implicados en la regresión espontánea de las neoplasias melanocíticas cutáneas” (AP-032/10), concedido y financiado en el año 2010.

2.5. DESCRIPCIÓN DE LAS PRUEBAS Y MODELOS ESTADÍSTICOS

Las variables cuantitativas se expresaron como media +/- desviación estándar, y las cualitativas como valores absolutos y porcentajes.

Para analizar la relación entre dos variables cualitativas se ha utilizado la prueba de Chi cuadrado, aplicando el test exacto de Fisher cuando el 20% de los valores esperados era inferior a cinco. La asociación lineal entre dos variables cuantitativas se analizó mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson. Si las variables no cumplían criterios de normalidad se aplicó el coeficiente de correlación ordinal de Spearman.

Para comparar las medias de una variable cuantitativa en los dos grupos independientes de una variable cualitativa binaria hemos utilizado la prueba t de Student-Fisher, y el análisis de la varianza (ANOVA) si la variable cualitativa incluye tres o más categorías. Si las variables no cumplían criterios de normalidad se utilizaron las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney si la variable cualitativa incluía dos categorías, o la prueba de Kruskal-Wallis si la variable cualitativa incluía más de 2 categorías.

También se ha realizado un análisis de regresión logística univariante analizando la variable melanoma con todas las demás variables estudiadas, y posteriormente para la obtención del modelo final de regresión logística multivariante se han utilizado los métodos de inclusión por pasos hacia delante y hacia atrás, combinados con la inclusión y/o exclusión manual de variables. Los criterios de inclusión y exclusión por pasos de las variables en los modelos, se realizaban con la prueba de razón de verosimilitud, con el criterio de inclusión $p \leq 0,05$ y de exclusión $p > 0,10$. Se ha fijado el modelo final, con aquellas variables que quedaban incluidas en el último paso y que no obedecían exclusivamente a criterios de significación estadística, sino que permanecían en el modelo si producían un cambio importante en el resto de coeficientes. El modelo final seleccionado se calibró con la prueba de Hosmer y Lemeshow, y se exponen las variables que lo componen, los coeficientes β , la *odds ratio*, su intervalo de confianza y el grado de significación. Se calculó la curva ROC (*receiver operating characteristic*), exponiendo las áreas bajo la curva y sus intervalos de confianza, para valorar la discriminación del modelo en distinguir las lesiones que son melanomas de los nevos melanocíticos.

Para todos los contrastes de hipótesis realizados, se consideró significativa toda diferencia que mostrase un valor de $p \leq 0,05$. Para el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS para Windows[®], versión 19 (SPSS Inc., Chicago, IL; EE.UU).

Estadística descriptiva:

Se emplea para estudiar los diferentes aspectos o caracteres referidos a un conjunto de elementos de naturaleza específica, y que reciben la denominación de variables.

El primer paso para el estudio estadístico fue el análisis, en forma descriptiva, de las variables cuantitativas, que se expresaron en la mayoría de ocasiones como media +/- desviación estándar y rango, y de las cualitativas, que se expresaron como valores absolutos y porcentajes.

Estadística de inferencia:

Permite extrapolar los resultados de la muestra a la población que se está estudiando. Comprende las denominadas “pruebas paramétricas” (**tabla 2.3**), en las que la población estudiada sigue una distribución normal, y las “pruebas no paramétricas” (**tabla 2.4**). Estas últimas son pruebas que, por no depender de la distribución de la variable, no precisan la condición previa de normalidad de las poblaciones, y no manejan los valores cuantitativos que toma la variable en cuestión sino únicamente sus rangos. Son pruebas de menor precisión que las paramétricas por lo que sólo demostrarán como significativas diferencias mayores. El uso de los test no paramétricos se limita a estudios con tamaños muestrales menores de 30 en las que las poblaciones no puedan ser consideradas como normales, o bien, cuando la variable represente solamente una medida aproximada del carácter, sin una valoración exacta.

En función de las variables estudiadas y del tamaño de la muestra se han empleado los siguientes test de hipótesis:

Asociación estadística entre dos variables

Tabla 2.3. Test paramétricos.

VARIABLE 1	VARIABLE 2	TEST DE HIPÓTESIS
Dicotómica	Dicotómica	Chi-cuadrado Test exacto de Fisher
Cualitativa (> 2 categorías)	Cualitativa (≥ 2 categorías)	Chi-cuadrado
Dicotómica	Cuantitativa	t de Student
Cualitativa (> 2 categorías)	Cuantitativa	Análisis de la varianza
Cuantitativa	Cuantitativa	Coefficiente de correlación de Pearson

Tabla 2.4. Test no paramétricos.

VARIABLE 1	VARIABLE 2	TEST DE HIPÓTESIS
Dicotómica independiente	Cuantitativa (n<30) u ordinal	U de Mann-Whitney. Test de Wilcoxon
Dicotómica pareada o dependiente	Cuantitativa (n<30) u ordinal	Test de Wilcoxon
Cualitativa (> 2 categorías)	Cuantitativa (n<30) u ordinal	Kruskal-Wallis
Cualitativa pareada (> 2 categorías)	Cuantitativa (n<30) u ordinal	Test de Friedman
Ordinal	Ordinal	Rho de Spearman

Pruebas estadísticas empleadas en este trabajo^{216,217}:

Prueba U de Mann-Whitney para dos muestras independientes: Se utiliza para contrastar si la distribución de un parámetro, cuando menos ordinal, es o no la misma en dos muestras independientes. Por tanto, se ha empleado para contrastar la homogeneidad de la distribución de una variable, cuando menos ordinal, en dos muestras independientes.

Prueba de Kruskal-Wallis para varias muestras independientes: Se utiliza para contrastar si la distribución de un parámetro, cuando menos ordinal, es o no la misma en más de dos muestras independientes. Se trata, por tanto, de un método no paramétrico para probar si un grupo de datos proviene de la misma población.

Prueba Chi-cuadrado (χ^2 de Pearson): Se ha utilizado como prueba de asociación o dependencia entre dos variables cualitativas (categóricas), siempre que la frecuencia esperada de las celdas en la tabla de contingencia ha sido superior a 5 casos. En caso contrario, y, sólo para variables dicotómicas, se ha empleado el test exacto de Fisher (cuando el valor esperado de una o más celdas era inferior a 5).

Coefficiente de correlación de Pearson:

Se ha empleado como una medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas. El valor del índice de correlación (r) varía en el intervalo $[-1,1]$:

- Si $r = 1$, existe una correlación positiva perfecta. El índice establece una dependencia total entre las dos variables denominada *relación directa*: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante.
- Si $0 < r < 1$, existe una correlación positiva (cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace).
- Si $r = 0$, no existe relación lineal. Pero esto no necesariamente implica que las variables son independientes, ya que pueden existir todavía relaciones no lineales entre las dos variables.

- Si $-1 < r < 0$, existe una correlación negativa (cuando una de ellas disminuye, la otra también lo hace).
- Si $r = -1$, existe una correlación negativa perfecta. El índice indica una dependencia total entre las dos variables llamada *relación inversa*: cuando una de ellas aumenta, la otra disminuye en proporción constante.

Curva ROC:

La curva ROC surgida del análisis de regresión logística representa la sensibilidad y especificidad en función de distintos puntos de corte, que se corresponden con los valores proporcionados por los propios test.

Se estima el área bajo la curva como un indicador de la bondad de ajuste de la clasificación, y se interpreta como la probabilidad de acertar en el diagnóstico de melanoma. Se proporciona, así mismo, el resultado de un contraste asintótico para valorar si el área es 0,5, es decir, si los resultados de clasificación obtenidos por el test son similares a los que se hubieran obtenido por azar. La información se completa con la estimación de un intervalo de confianza al 95% para el valor del área.

Regresión logística:

El modelo multivariante logístico expresa la probabilidad de que nos hallemos ante un melanoma en función de una serie de variables independientes.

El modelo logístico expresa el *odds* (o razón entre la probabilidad de padecer un melanoma y la probabilidad de no tenerlo) como función exponencial de las variables independientes.

La ecuación resultante con las variables obtenidas en el análisis de esta muestra, que predice la probabilidad de que la lesión con regresión sea un melanoma sería la siguiente: Probabilidad melanoma = $1 / 1 + e^{-(\beta_0 + \sum \beta_i X_i)}$, donde X_i son las variables independientes (edad, fibrosis laminar, densidad de vasos, de melanófagos y de células granzima B+), y los β_i son los coeficientes de regresión, que al igual que β_0 , se estiman en el análisis. Si el resultado de esta ecuación matemática fuera igual o mayor de 0,5 la lesión melanocítica con regresión sería clasificada como melanoma.

III- RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

3.1. ESTUDIO CLÍNICO-PATOLÓGICO

3.1.1. RESULTADOS DE LAS VARIABLES CLÍNICAS

3.1.1.1. ASOCIACIONES DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS CON EL RESTO DE VARIABLES ESTUDIADAS:

3.1.1.1.1. EDAD

La edad media de los pacientes es de $47,09 \pm 20,10$ años, y el rango de edad de 3 a 87 años. La edad media de las mujeres es de $44,00 \pm 19,63$ años, y la de los hombres de $49,48 \pm 20,25$ años. Estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Asociación entre la edad del paciente y el tipo de lesión melanocítica.

En los 39 pacientes con nevos melanocíticos no displásicos, la edad media es de $37,72 \pm 19,93$ años. La edad media de los 77 pacientes con nevos melanocíticos displásicos es de $43,99 \pm 18,88$ años, y la de los 47 pacientes con melanomas de $60,26 \pm 15,52$ años (figura 3.1).

Se demuestra que existe una asociación estadísticamente significativa entre la edad y el tipo de lesión melanocítica ($p < 0,0001$).

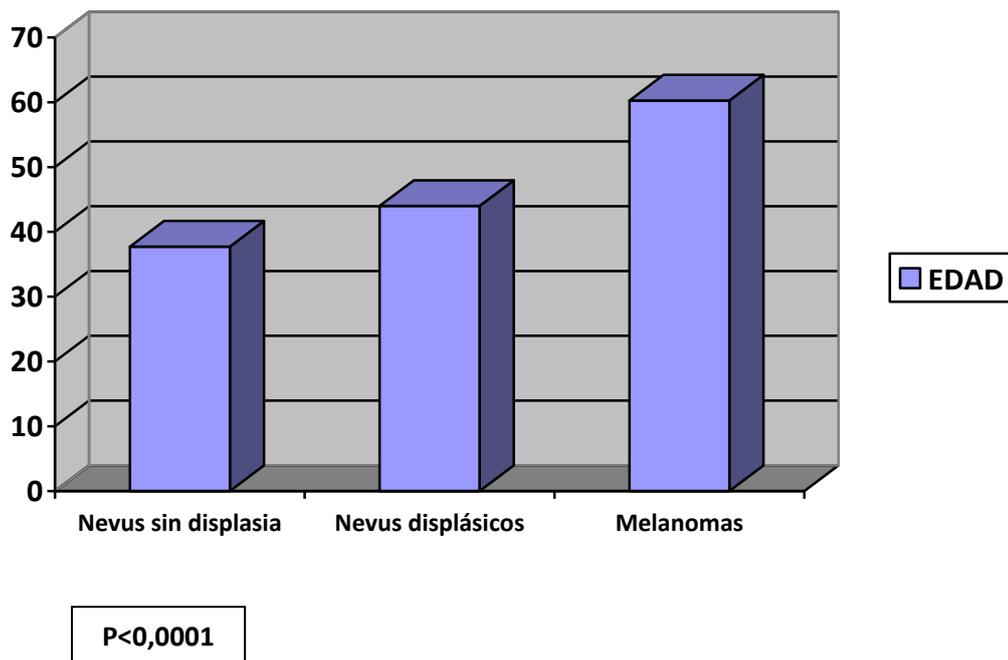
En función de estos resultados, la edad media de los pacientes con melanoma es 23 años superior a la de aquellos con nevos sin displasia, y 17 años mayor respecto a la de los pacientes con nevos displásicos. En relación a los diferentes subtipos histológicos de melanoma, la edad media de los pacientes también es superior a la de los individuos a los que se les extirparon nevos melanocíticos. En los pacientes con melanomas de extensión superficial es de $56,74 \pm 16,02$ años, en aquellos con léntigo maligno melanoma de $64,18 \pm 11,29$ años, en los que tienen melanomas nodulares $76,63 \pm 9,19$ años, y en aquellos con melanomas lentiginosos acrales $81,85 \pm 2,82$ años.

Desglosando la edad media de los individuos con nevos displásicos, en los 52 pacientes en los que la displasia no era severa es de $43,98 \pm 19,88$ años, mientras que la de los 25 pacientes que tuvieron nevos con displasia severa es de $43,48 \pm 16,76$ años. Por tanto, no se evidencian diferencias de edad en función del grado de displasia de los nevos

melanocíticos, pero las diferencias de edad sí son muy marcadas al comparar los nevos displásicos con los melanomas.

Figura 3.1. Edad media de los pacientes con los distintos tipos de lesiones melanocíticas:

	Edad media	Desviación típica
Nevus sin displasia	37,72	19,93
Nevus displásicos	43,99	18,88
Melanomas	60,26	15,52



Asociación entre la edad y el resto de parámetros histológicos

Las asociaciones entre la edad del paciente y el resto de parámetros histológicos evaluados están resumidas en la **tabla 3.1**.

EDAD						
		Número	Media	Desv.típica	Coef.correl	p
FIBROSIS						
Intensidad						NS
Leve		60	42,15	19,57		
Moderada		74	50,09	19,84		
Extensa		29	49,69	20,55		
Tipo						
Laminar	SÍ	118	45,36	19,93		NS
	NO	45	51,64	20,07		
Compacta	SÍ	38	51,29	20,21		NS
	NO	125	45,82	19,98		
Indeterminada	SÍ	7	53,57	20,75		NS
	NO	156	46,81	20,09		
Delicada	SÍ	3	57,67	14,15		NS
	NO	160	46,90	20,18		
Esclerosis	SÍ	11	40,18	18,25		NS
	NO	152	47,60	20,19		
Localización						
Superficial	SÍ	41	51,17	18,90		NS
	NO	122	45,73	20,38		
INFILTRADO INFLAMATORIO						
Densidad		163			-0,004	NS
Tipo						
Parcheado	SÍ	134	48,37	20,55		NS
	NO	29	41,24	17,00		
Difuso	SÍ	29	41,24	17,00		NS
	NO	134	48,37	20,55		
Localización						
Intratumoral	SÍ	88	46,05	20,41		NS
	NO	75	48,33	19,80		
Peritumoral	SÍ	154	48,36	19,91		0,001
	NO	9	25,56	7,23		
MELANOFAGIA						
Densidad		163			0,03	NS
PROLIFERACIÓN VASCULAR						
Densidad		163			0,29	<0,0001
PÉRDIDA DE MELANOCITOS						
						NS
Leve		61	42,07	19,88		
Moderada		52	51,13	20,73		
Intensa		48	49,17	18,70		
Total		2	46,00	28,28		
APOPTOSIS						
Ausente		94	45,51	20,81		NS
Escasa		50	48,60	28,43		
Intensa		19	51,00	20,98		
ATROFIA						
Ausente		93	41,66	18,82		<0,0001
Presente		70	54,33	19,59		

Asociación entre la edad y la fibrosis:

Asociación entre la edad y la intensidad de la fibrosis

Como se aprecia en la tabla, la edad media de los pacientes en los que se aprecia fibrosis leve es de 42,15 años, mientras que la de aquellos con fibrosis moderada y extensa es de 50,09 y 49,69 años respectivamente. El estudio estadístico demuestra que no hay diferencias significativas entre la edad y la intensidad de la fibrosis ($p=0,057$).

Asociación entre la edad y los diferentes tipos de fibrosis

La fibrosis de tipo **laminar** se aprecia en pacientes con una edad media de 45,36 años, mientras que la fibrosis que no es laminar en pacientes con una edad media de 51,64 años. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la fibrosis de tipo laminar.

La fibrosis de tipo **compacta** se aprecia en pacientes con una edad media de 51,29 años, mientras que la fibrosis que no es compacta en pacientes con una edad media de 45,82 años. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la fibrosis de tipo compacto.

La fibrosis de tipo **indeterminada** se aprecia en pacientes con una edad media de 53,57 años, mientras que la fibrosis que no es indeterminada en pacientes con una edad media de 46,81 años. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la fibrosis de tipo indeterminada.

La fibrosis **delicada** se aprecia en pacientes con una edad media de 57,67 años, mientras que la fibrosis que no es delicada en pacientes con una edad media de 46,90 años. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la fibrosis delicada.

La fibrosis de tipo **esclerosis** se aprecia en pacientes con una edad media de 40,18 años, mientras que la fibrosis que no es de tipo esclerosis en pacientes con una edad media de 47,60 años. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la fibrosis de tipo esclerosis.

Asociación entre la edad y la localización de la fibrosis

La acentuación **superficial o subepidérmica** de la fibrosis se aprecia en pacientes con una edad media de 51,17 años, mientras que la ausencia de ésta se aprecia en pacientes con una edad media de 45,73 años. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la fibrosis subepidérmica.

Asociación entre la edad y el infiltrado inflamatorio

No existe prácticamente correlación entre la densidad media del infiltrado inflamatorio y la edad del paciente (coeficiente de correlación=-0,004). No hay diferencias estadísticamente significativas entre la edad y la intensidad del infiltrado inflamatorio.

El infiltrado inflamatorio **parcheado** se aprecia en pacientes con una edad media de 48,37 años, mientras que el infiltrado inflamatorio que no es parcheado en pacientes con una edad media de 41,24 años. No hay diferencias estadísticamente significativas entre la edad y el infiltrado inflamatorio parcheado.

El infiltrado inflamatorio **difuso** se aprecia en pacientes con una edad media de 41,24 años, mientras que el infiltrado inflamatorio que no es difuso en pacientes con una edad media de 48,37 años. No hay diferencias estadísticamente significativas entre la edad y el infiltrado inflamatorio difuso.

El infiltrado inflamatorio **intratumoral** se aprecia en pacientes con una edad media de 46,05 años, mientras que el infiltrado inflamatorio que no es intratumoral en pacientes con una edad media de 48,33 años. No hay diferencias estadísticamente significativas entre la edad y el infiltrado inflamatorio intratumoral.

El infiltrado inflamatorio **peritumoral** se aprecia en pacientes con una edad media de 48,36 años, mientras que el infiltrado inflamatorio que no es peritumoral en pacientes con una edad media de 25,56 años. Sí hay diferencias estadísticamente significativas entre la edad y el infiltrado inflamatorio peritumoral ($p=0,001$).

Asociación entre la edad y la pérdida de melanocitos.

Los pacientes con pérdida leve de melanocitos tienen una edad media de 42,07 años, los que tienen una pérdida moderada 51,13 años, los que tienen una pérdida intensa 49,17 años, y aquellos en los que la pérdida es total 46 años. No hay diferencias estadísticamente significativas entre la edad del paciente y la pérdida de melanocitos.

Asociación entre la edad y la apoptosis.

Los pacientes con ausencia de apoptosis en sus lesiones melanocíticas tienen una edad media de 45,51 años, los que tienen una apoptosis escasa 48,60 años, y aquellos en los que la apoptosis es intensa 51 años. No hay diferencias estadísticamente significativas entre la edad del paciente y la apoptosis de melanocitos.

Asociación entre la edad y la atrofia.

La edad media de los pacientes con lesiones en las que se aprecia atrofia epidérmica es de 54,33 años, mientras que la de aquellos en los que no se observa atrofia epidérmica es de 41,66 años. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,0001$).

Asociación entre la edad y la melanofagia.

No existe prácticamente correlación entre la densidad media de melanófagos y la edad del paciente (coeficiente de correlación=0,03). No hay diferencias estadísticamente significativas entre la edad y la melanofagia.

Asociación entre la edad y la proliferación vascular.

Existe una correlación positiva entre la densidad media de vasos y la edad del paciente (coeficiente de correlación=0,29). Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,0001$). Por tanto, a medida que aumenta la edad del paciente aumenta la densidad de vasos en las lesiones melanocíticas. Este hecho está en concordancia con que la edad de los pacientes también se asocia de forma estadísticamente al diagnóstico de melanoma, ya que la neovascularización también es un hallazgo asociado al diagnóstico de melanoma, como también demuestran los resultados histológicos.

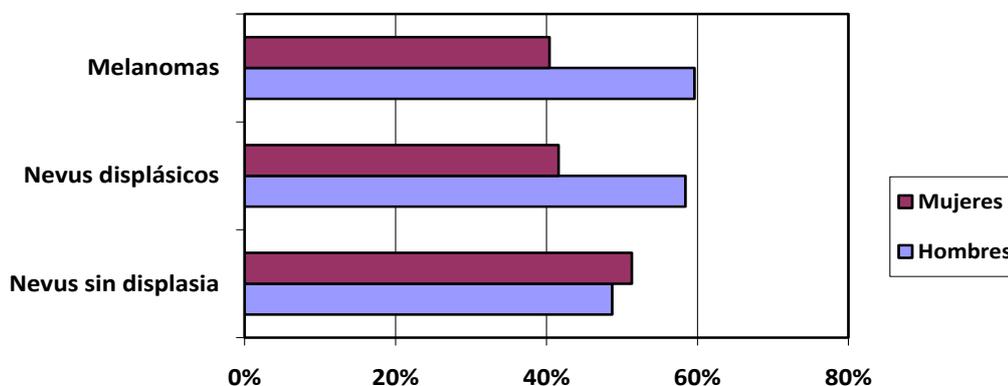
3.1.1.1.2. SEXO

En nuestra serie de 163 lesiones melanocíticas con regresión, el 56,4% (92 casos) pertenecen a hombres y el 43,6% (71 casos) a mujeres.

Asociación entre el sexo del paciente y el tipo de lesión melanocítica:

La distribución por sexos de los diferentes tipos de lesiones melanocíticas estudiadas (nevos sin displasia, nevos displásicos y melanomas) es de (**figura 3.2**):

SEXO	FEMENINO		MASCULINO		Total	
	Número	%	Número	%	Número	%
Nevus sin displasia	20	51,3	19	48,7	39	100
Nevus displásicos	32	41,6	45	58,4	77	100
Melanomas	19	40,4	28	59,6	47	100



A pesar de que la presencia de nevos melanocíticos displásicos y melanomas es más frecuente en varones (prácticamente un 20% superior), y que por el contrario los nevos sin displasia muestran una distribución equitativa por sexos, no se demuestra una asociación estadísticamente significativa entre el sexo y el tipo de lesión melanocítica ($p=0,53$; Chi-cuadrado).

Asociación entre el sexo del paciente y los parámetros histológicos estudiados:

La siguiente **tabla 3.2** resume las asociaciones entre el sexo del paciente y el resto de parámetros histológicos evaluados.

SEXO	MASCULINO			FEMENINO			p	
	Número	%	Media	Número	%	Media		
FIBROSIS								
Intensidad								
Leve	34	37		26	36,6		NS	
Moderada	40	43,5		34	47,9			
Extensa	18	19,6		11	15,5			
Tipo								
Laminar	SÍ	68	73,9	50	70,4		NS	
	NO	24	26,1	21	29,6			
Compacta	SÍ	18	19,6	20	28,2		NS	
	NO	74	80,4	51	71,8			
Indeterminada	SÍ	6	6,5	1	1,4		NS	
	NO	86	93,5	70	98,6			
Delicada	SÍ	1	1,1	2	2,8		NS	
	NO	91	98,9	69	97,2			
Esclerosis	SÍ	5	5,4	6	8,5		NS	
	NO	87	94,6	65	91,5			
Localización								
Superficial	SÍ	19	20,7	22	31		NS	
	NO	73	79,3	49	69			
Profunda	SÍ	92	100	71	100		NA	
	NO	0	0	0	0			
INFILTRADO INFLAMATORIO								
Presente		92		169,23		71	143,32	NS
Tipo								
Parcheado	SÍ	76	82,6	58	81,7		NS	
	NO	16	17,4	13	18,3			
Difuso	SÍ	15	16,3	14	19,7		NS	
	NO	77	83,7	57	80,3			
Localización								
Intratumoral	SÍ	47	51,1	41	57,7		NS	
	NO	45	48,9	30	42,3			
Peritumoral	SÍ	85	92,4	69	97,2		NS	
	NO	7	7,6	2	2,8			
MELANOFAGIA								
Presente		92		41,79		71	40,69	NS
PROLIFERACIÓN VASCULAR								
Presente		92		14,45		71	13,53	NS
PÉRDIDA DE MELANOCITOS								
Leve		32	34,8			19	40,8	NS
Moderada		33	35,9			19	26,8	
Intensa		27	29,3			23	32,4	
APOPTOSIS								
Ausente		56	60,9			38	53,5	NS
Escasa		27	29,3			23	32,4	
Intensa		9	9,8			10	14,1	
ATROFIA								
Ausente		49	53,3			44	62	NS
Presente		43	46,7			27	38	

Asociación entre el sexo y la fibrosis:

Asociación entre el sexo y la intensidad de la fibrosis

Como se aprecia en la tabla, las diferentes intensidades de la fibrosis no muestran prácticamente diferencias por sexos. El estudio estadístico demuestra que no hay diferencias significativas entre el sexo y la intensidad de la fibrosis.

Asociación entre el sexo y los diferentes tipos de fibrosis

La fibrosis de tipo **laminar** no muestra prácticamente diferencias por sexos, y no hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la fibrosis de tipo laminar.

La fibrosis de tipo **compacto** es un 8,6% más frecuente en el sexo femenino, aunque no hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la fibrosis de tipo compacta.

La fibrosis **indeterminada** es un 5,1% más frecuente en el sexo masculino, aunque no hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la fibrosis de tipo indeterminado.

La fibrosis **delicada** no muestra prácticamente diferencias por sexos, y no hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la fibrosis de tipo delicada.

La fibrosis de tipo **esclerosis** no muestra prácticamente diferencias por sexos, y no hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la fibrosis de tipo esclerosis.

Asociación entre el sexo y la localización de la fibrosis

La acentuación **subepidérmica** de la fibrosis es un 10,3% más frecuente en las mujeres, aunque no hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la fibrosis de localización superficial.

Asociación entre el sexo y el infiltrado inflamatorio

La densidad media del infiltrado inflamatorio es superior en el sexo masculino. En las mujeres es de $143,32 \pm 129,73$ linfocitos por campo usando el objetivo de 40 aumentos y en los hombres de $169,23 \pm 163,18$. A pesar de ello, no hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la intensidad del infiltrado inflamatorio.

El infiltrado inflamatorio **parcheado** no muestra prácticamente diferencias por sexos. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y el infiltrado inflamatorio parcheado.

El infiltrado inflamatorio **difuso** no muestra prácticamente diferencias por sexos. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y el infiltrado inflamatorio difuso.

El infiltrado inflamatorio **intratumoral** es un 6,6% más frecuente en el sexo femenino, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa.

El infiltrado inflamatorio **peritumoral** es un 4,8% más frecuente en el sexo femenino, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Asociación entre el sexo y la pérdida de melanocitos

La pérdida leve de melanocitos es un 6% más frecuente en el sexo femenino, la pérdida moderada es un 9,1% más frecuente en varones, y la pérdida intensa prácticamente no muestra diferencias por sexos. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo del paciente y la pérdida de melanocitos.

Asociación entre el sexo y la atrofia

La presencia de atrofia epidérmica es un 8,7% más frecuente en el sexo femenino, aunque no hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la atrofia epidérmica.

Asociación entre el sexo y la apoptosis

La ausencia de apoptosis es un 7,4% más frecuente en varones, mientras que la presencia de apoptosis es más frecuente en mujeres, siendo la apoptosis intensa un 4,3% mayor que en los varones. A pesar de estos hallazgos, no hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la apoptosis.

Asociación entre el sexo y la melanofagia

La densidad media de melanófagos no muestra prácticamente diferencias por sexos. En las mujeres es de $40,69 \pm 35,25$ y en los hombres de $41,79 \pm 43,70$. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y la melanofagia.

Asociación entre el sexo y la proliferación vascular

La densidad media de vasos prácticamente no muestra diferencias por sexos. En las mujeres es de $13,53 \pm 5,98$ vasos por campo de 40 aumentos y en los hombres de $14,45 \pm 6,12$. No hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y el número de vasos.

3.1.1.1.3. LOCALIZACIÓN

Localización de las lesiones:

La localización más frecuente de las lesiones es el tronco, predominando la espalda (78 casos; 47,85%), y seguida por el tórax (26 casos; 15,95%). El 10,42% restante (17 casos) se hallan en la cabeza, el 10,42% en las extremidades inferiores (17 casos), el 7,97% en las extremidades superiores (13 casos), y el 7,36% en el abdomen (12 casos) (figura 3.3).

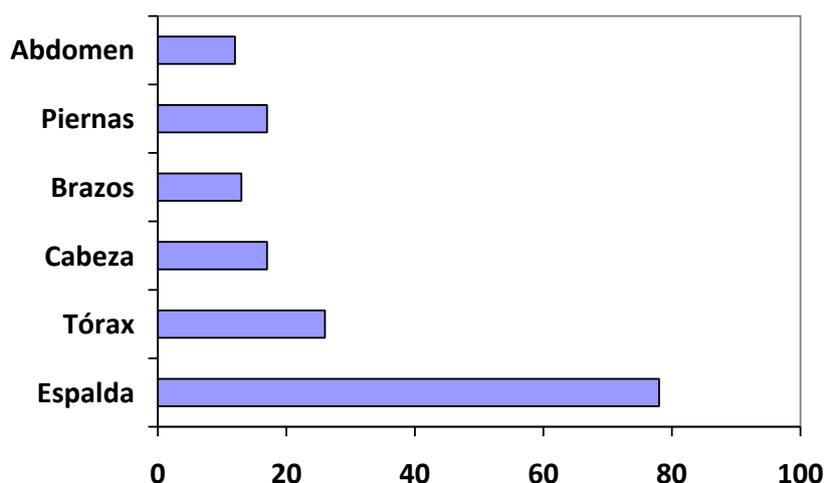


Figura 3.3. Número de lesiones melanocíticas con regresión en las distintas localizaciones de la superficie corporal.

La distribución de los diferentes tipos de lesiones melanocíticas estudiadas (nevus sin displasia, nevus displásicos y melanomas) en las distintas localizaciones es la siguiente (tabla 3.3):

TIPO DE LESIÓN MELANOCÍTICA		Abdomen	Brazo	Cabeza	Espalda	Pierna	Tórax	Total
Nevus sin displasia	N	0	4	4	20	3	8	39
	%	0%	30,8%	23,5%	25,6%	17,6%	30,8%	24,3%
Nevus displásicos	N	9	3	4	41	8	12	77
	%	75%	23,1%	23,5%	52,5%	47,1%	46,2%	47,0%
Melanomas	N	3	6	9	17	6	6	47
	%	25%	46,2%	52,9%	21,8%	35,3%	23,1%	28,7%

Asociación entre la localización y el tipo de lesión melanocítica:

El porcentaje de los diferentes tipos de lesiones melanocíticas en las distintas localizaciones es (tabla 3.4):

TIPO DE LESIÓN MELANOCÍTICA		Abdomen	Brazo	Cabeza	Espalda	Pierna	Tórax	Total
Nevus sin displasia	N	0/39	4/39	4/39	20/39	3/39	8/39	39
	%	0%	10,2%	10,2%	51,2%	7,6%	20,5%	100%
Nevus displásicos	N	9/77	3/77	4/77	41/77	8/77	12/77	77
	%	11,6%	3,8%	5,1%	53,2%	10,3%	15,5%	100%
Melanomas	N	3/47	6/47	9/47	17/47	6/47	6/47	47
	%	6,3%	12,7%	19,1%	36,1%	12,7%	12,7%	100%

Como se aprecia en la **tabla 3.4**, prácticamente la mitad de los nevos melanocíticos (tanto displásicos como no displásicos) se localiza en la espalda, porcentaje que se reduce a un 36% en los melanomas. El estudio estadístico demuestra que estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,027$).

Asociaciones entre la localización de la lesión y el resto de parámetros histológicos analizados.

La siguiente **tabla 3.5** resume las asociaciones entre la localización de la lesión y el resto de parámetros histológicos evaluados:

LOCALIZACIÓN	Abdomen			Brazo			Cabeza			Espalda			Pierna			Tórax			p	
	N	%	Media	N	%	Media	N	%	Media	N	%	Media	N	%	Media	N	%	Media		
FIBROSIS																				
Intensidad																				
Leve	6	50		6	46,2		4	23,5		29	37,2		5	29,4		10	38,5		NS	
Moderada	4	33,3		6	46,2		8	47,1		34	43,6		10	58,8		12	46,2			
Extensa	3	16,7		1	7,7		5	29,4		15	19,2		2	11,8		4	15,4			
Tipo																				
Laminar	SÍ	9	75	11	84,6		7	41,2		58	74,4		13	76,5		20	76,9		NS	
	NO	3	25	2	15,4		10	58,8		20	25,6		4	23,5		6	23,1			
Compacta	SÍ	2	16,7	2	15,4		9	52,9		17	21,8		4	23,5		4	15,4		NS	
	NO	10	83,3	11	84,6		8	47,1		61	78,2		13	76,5		22	84,6			
Indeterminada	SÍ	1	8,3	0	0		1	5,9		3	3,8		0	0		2	7,7		NS	
	NO	11	91,7	13	100		16	94,1		75	96,2		17	100		24	92,3			
Delicada	SÍ	0	0	1	7,7		0	0		0	0		2	11,8		0	0		0,014	
	NO	12	100	12	92,3		17	100		78	100		15	88,2		26	100			
Esclerosis	SÍ	1	8,3	0	0		1	5,9		8	10,3		0	0		1	3,8		NS	
	NO	11	91,7	13	100		16	94,1		70	89,7		17	100		25	96,2			
Localización																				
Superficial	SÍ	1	8,3	4	30,8		4	23,5		20	25,6		4	23,5		8	30,8		NS	
	NO	11	91,7	9	69,2		13	76,5		58	74,4		13	76,5		18	69,2			
Profunda	SÍ	12	100	13	100		17	100		78	100		17	100		26	100		NA	
	NO	0	0	0	0		0	0		0	0		0	0		0	0			
INFILTRADO INFLAMATORIO																				
Presente		12		117,08	13		129,62	17		138,65	78		179,99	17		78,24	26		189,62	NS
Tipo																				
Parcheado	SÍ	12	100	13	100		16	94,1		59	75,6		16	94,1		18	69,2		0,016	
	NO	0	0	0	0		1	5,9		19	24,4		1	5,9		8	30,8			
Difuso	SÍ	0	0	0	0		1	5,9		18	23,1		2	11,8		8	30,8		0,035	
	NO	12	100	13	100		16	94,1		60	76,9		15	88,2		18	69,2			
Localización																				
Intratumoral	SÍ	3	25	4	30,8		12	70,6		47	60,3		9	59,2		13	50		NS	
	NO	9	75	9	69,2		5	29,4		31	39,7		8	47,1		13	50			
Peritumoral	SÍ	11	91,7	13	100		17	100		74	94,9		15	88,2		24	92,3		NS	
	NO	1	8,3	0	0		0	0		4	5,1		2	11,8		2	7,7			
MELANOFAGIA																				
Presente		12		57,11	13		42	17		34,65	78		40,37	17		53,47	26		32,88	NS
PROLIFERACIÓN VASCULAR																				
Presente		12		11,42	13		15,85	17		12,94	78		14,08	17		16,35	26		13,54	NS
PÉRDIDA DE MELANOCITOS																				
Leve		7	58,3	8	61,5		5	29,4		29	37,2		4	23,5		8	30,8		NS	
Moderada		2	16,7	3	23,1		5	29,4		25	32,1		7	41,2		10	38,5			
Intensa		3	25	2	15,4		7	41,2		24	30,8		6	35,3		8	30,8			
APOPTOSIS																				
Ausente		6	50	7	53,8		9	52,9		42	53,8		12	70,6		18	69,2		NS	
Escasa		6	50	6	46,2		6	35,3		24	30,8		3	17,6		5	19,2			
Intensa		0	0	0	0		2	11,8		12	15,4		2	11,8		3	11,5			
ATROFIA																				
Ausente		10	83,2	7	53,8		5	29,4		41	52,6		12	70,6		18	69,2		0,032	
Presente		2	16,7	6	46,2		12	70,6		37	47,4		5	29,4		8	30,8			

Asociación entre la localización de la lesión y la fibrosis:

Asociación entre la localización de la lesión y la intensidad de la fibrosis

La fibrosis leve predomina en la abdomen y en los brazos. La fibrosis moderada es la predominante en el resto de localizaciones. La fibrosis intensa no predomina respecto a las demás en ninguna localización, pero el lugar donde se aprecia con mayor frecuencia es en la cabeza.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización y la intensidad de la fibrosis.

Asociación entre la localización de la lesión y los diferentes tipos de fibrosis

La **fibrosis laminar** predomina en todas las localizaciones, excepto en la cabeza. Está presente en un 84,6% de las lesiones localizadas en los brazos, y aproximadamente en el 75% de los casos en el resto de las localizaciones, salvo en la cabeza (41,2%).

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización y la fibrosis de tipo laminar.

La **fibrosis compacta** predomina exclusivamente en la cabeza (52,9%). En el resto de localizaciones la presencia de fibrosis compacta oscila entre un 15% y un 23% de las lesiones.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización y la fibrosis de tipo compacta.

Las localizaciones donde porcentualmente se han detectado más casos de **fibrosis indeterminada** son el abdomen (8,3%) y el tórax (7,7%).

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización y la fibrosis de tipo indeterminado.

Las únicas zonas en las que se ha apreciado **fibrosis de tipo delicada** han sido las extremidades. El porcentaje de lesiones localizadas en las piernas con fibrosis delicada ha sido del 11,8%, y el de las localizadas en los brazos del 7,7%. Por el contrario, ninguna lesión localizada en el resto de áreas de la superficie corporal presentaba fibrosis delicada.

Sí hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la lesión y la fibrosis de tipo delicada ($p=0,014$; Chi-cuadrado).

La espalda es el lugar donde se localizan la mayoría de casos con **fibroplasia florida o fibrosis de tipo esclerosis** (72,7%).

Al comparar el porcentaje de lesiones con fibroplasia florida presentes en las distintas localizaciones, ésta se halló en un 10,3% de las lesiones localizadas en la espalda, en un 8,3% de las localizadas en el abdomen y en un 5,9% de las localizadas en la cabeza.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización y la fibrosis de tipo esclerosis.

Asociación entre la localización de la lesión y la localización de la fibrosis

Las dos localizaciones donde porcentualmente se aprecian más casos de fibrosis con acentuación subepidérmica son los brazos y el tórax (30,8%), mientras que el abdomen es donde hemos hallado menos casos (8,3%).

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la lesión y la localización de la fibrosis.

Asociación entre la localización de la lesión y el infiltrado inflamatorio:

La densidad media de linfocitos oscila entre 189,6 en las lesiones localizadas en el tórax y 78,2 en las localizadas en las piernas.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la lesión y la densidad del infiltrado inflamatorio.

En el abdomen, la cabeza y las extremidades se aprecia **infiltrado parcheado** entre un 94,1% y un 100% de los casos. En las lesiones localizadas en el tronco el porcentaje se reduce hasta un 75,6% (espalda) y un 69,2% (tórax).

Sí hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la lesión y el infiltrado inflamatorio parcheado ($p=0,016$; Chi-cuadrado).

Por tanto, el infiltrado parcheado es mucho menos frecuente en las lesiones que se localizan en el tronco.

El tórax y la espalda muestran porcentualmente la mayoría de casos en los que predominaba el **infiltrado inflamatorio difuso** (30,8% y 23,1% respectivamente). Estos porcentajes contrastan con los que se aprecian en el resto de localizaciones.

Sí hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la lesión y el infiltrado inflamatorio difuso ($p=0,035$; Chi-cuadrado).

La presencia de infiltrado difuso es mucho más frecuente en las lesiones localizadas en el tronco.

Las localizaciones donde porcentualmente se aprecian más y menos casos de **infiltrado intratumoral** son la cabeza (70,6%) y el abdomen (25%) respectivamente.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la lesión y el infiltrado inflamatorio intratumoral.

El **infiltrado peritumoral** no muestra diferencias especialmente llamativas al asociarse con las diferentes localizaciones, ya que porcentualmente oscila entre un 88,2% de casos en las piernas y el 100% que se observa en la cabeza o en los brazos.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la lesión y el infiltrado inflamatorio peritumoral.

Asociación entre la localización de la lesión y la pérdida de melanocitos

La pérdida leve de melanocitos predomina en los brazos (61,5%), seguida del abdomen (58,3%) y la espalda (37,2%); la pérdida moderada en las piernas (41,2%) seguida del tórax (38,5%), y la pérdida intensa en la cabeza (41,2%) seguida de las piernas (35,3%).

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la lesión y la pérdida de melanocitos.

Asociación entre la localización de la lesión y la atrofia

En la cabeza es mucho más frecuente encontrar atrofia que en el resto de localizaciones (70,6%). En el resto de localizaciones oscila entre un 16,7% del abdomen y un 47,4% de la espalda. El motivo probablemente se deba a que la cara es la zona en la que se aprecia más elastosis, debido a que en la mayoría de personas es la región corporal con más daño actínico por la exposición solar acumulada a lo largo de toda la vida.

Sí hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la lesión y la atrofia ($p=0,032$; Chi-cuadrado).

Asociación entre la localización de la lesión y la apoptosis

Las localizaciones donde porcentualmente hay más ausencia de apoptosis son las piernas (70,6%) y el tórax (69,2%). El abdomen y los brazos son las localizaciones donde porcentualmente la apoptosis es escasa (50% y 46,2% respectivamente), y la apoptosis intensa se distribuye de forma similar en casi todas las localizaciones, con excepción del abdomen y los brazos, donde no se aprecia ningún caso.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la lesión y la apoptosis.

Asociación entre la localización de la lesión y la melanofagia

La densidad media de melanófagos por campo usando el objetivo de 40 aumentos oscila entre 57,1 en las lesiones localizadas en el abdomen y 32,8 en las localizadas en el tórax.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la lesión y la melanofagia.

Asociación entre la localización de la lesión y la proliferación vascular

La densidad media de vasos por campo usando el objetivo de 40 aumentos oscila entre 16,3 en las lesiones localizadas en las piernas y 11,4 en las localizadas en el abdomen.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la lesión y la proliferación vascular.

3.1.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS VARIABLE CLÍNICAS.

Asociaciones entre las variables clínicas y el tipo de lesión melanocítica.

En cuanto a la regresión en el melanoma, nuestros resultados están en concordancia con los de varios estudios previos, que han demostrado que la regresión se asocia de forma significativa con el sexo masculino, la edad avanzada, y la localización en el tronco o en la región de la cabeza y el cuello ^{53,218-220}.

En esta serie, la edad media de los pacientes con regresión en los melanomas es de 60,2 años, considerablemente superior a la de los pacientes con regresión en los nevos melanocíticos, que es de 44 años en los pacientes con nevos displásicos y 37,7 en aquellos con nevos melanocíticos comunes ($p < 0,0001$). La justificación se debería a que a medida que aumenta la edad de las personas hay más probabilidad de acumular mutaciones somáticas que puedan conducir al desarrollo de un melanoma.

Por otro lado, los melanomas han sido mucho más frecuentes en varones (59,6%; IC 95%: 45,5-73,6%) que en mujeres (40,4%; IC 95%: 26,4-54,5%), y también se

localizaban preferentemente en el tronco (48,9%; IC 95%: 34,6-63,2%). Algunas series han cifrado diferencias incluso superiores, con afectación de un 65% de varones^{219,220}, circunstancia que sugiere que, aunque los melanomas son más frecuentes en el sexo femenino, los que muestran regresión son más habituales en varones.

La regresión en los nevos melanocíticos también parece mostrar una predilección por el sexo masculino y por las lesiones localizadas en la espalda. En un estudio de Cesinaro et al²¹⁶ de 203 pacientes con nevos melanocíticos con fibrosis, 135 pacientes eran hombres (66,5%) y 68 mujeres (33,5%). Casi la mitad de las lesiones pertenecían a pacientes con edades comprendidas entre los 11 y los 40 años, y la mayor parte de las lesiones estaban localizadas en la espalda (52%).

En nuestros casos, los nevos melanocíticos sin displasia con regresión muestran una distribución por sexos que es prácticamente equitativa. Por el contrario, los nevos displásicos con regresión son mucho más frecuentes en varones (58,4%; IC 95%: 47,4-69,4%) que en mujeres (41,6%; IC 95%: 30,6-52,6%), al igual que sucedía con los melanomas. La edad media de los pacientes a los que se les extirparon nevos displásicos fue 6 años superior a la de aquellos a los que se les extirparon nevos sin displasia (43,9 y 37,7 años respectivamente). En cuanto a la localización, la mayor parte de los nevos melanocíticos extirpados que mostraron regresión se localizaron en la espalda; un 51,2% (IC 95%: 35,6-67,0%) de los nevos sin displasia y un 53,2% (IC 95%: 42,1-64,4%) de los nevos displásicos.

Asociaciones entre las variables clínicas y los parámetros histológicos

Los resultados más destacados (por demostrar significación estadística) que se han obtenido tras estudiar las asociaciones entre las variables clínicas y los distintos parámetros histológicos han sido los siguientes:

Edad:

A pesar de que la edad no muestra ninguna asociación con el infiltrado inflamatorio intratumoral, sí se observa una asociación estadísticamente significativa ($p=0,001$) con el infiltrado peritumoral, ya que los pacientes en los que se aprecia un infiltrado peritumoral en sus lesiones tienen una edad media 22,8 años superior a la de aquellos en los que el infiltrado no es peritumoral.

La edad media de los pacientes con lesiones melanocíticas con regresión en las que se aprecia atrofia epidérmica es 12,67 años mayor que la de aquellos en los que no se observa atrofia ($p < 0,0001$). Estos hallazgos pueden justificarse dado que la atrofia es un hallazgo fisiológico con el envejecimiento cutáneo.

Existe una correlación positiva entre la densidad media de vasos y la edad del paciente ($p = < 0,0001$). Por tanto, a medida que aumenta la edad del paciente aumenta la densidad de vasos en las lesiones melanocíticas. Este hecho está en concordancia con que la edad de los pacientes también se asocia de forma estadísticamente al diagnóstico de melanoma, ya que la neovascularización también es un hallazgo asociado al diagnóstico de melanoma, como demuestran los resultados de los parámetros histológicos evaluados.

Sexo:

No se demuestra ninguna asociación estadísticamente significativa entre el sexo y los distintos parámetros histológicos.

Localización:

La fibrosis delicada tan sólo se ha evidenciado en lesiones localizadas en las extremidades. En concreto, en un 11,8% de las lesiones localizadas en las piernas y en un 7,7% de las localizadas en los brazos ($p = 0,014$). A pesar de estos hallazgos, la presencia de fibrosis delicada también se ha descrito en la literatura en el tórax, en la espalda y en la región palmoplantar, fundamentalmente en lesiones melanocíticas con morfología clínica y dermatoscópica propias de benignidad que experimentaron una regresión completa³⁶.

La presencia de infiltrado inflamatorio parcheado es mucho más frecuente en las lesiones localizadas en abdomen, cabeza y extremidades ($p = 0,016$). Por el contrario, el infiltrado inflamatorio difuso es mucho más frecuente en las lesiones localizadas en el tronco ($p = 0,035$).

La atrofia epidérmica se objetiva con mucha más frecuencia en la cabeza que en el resto de localizaciones anatómicas ($p = 0,032$), probablemente porque es la región anatómica más expuesta de forma crónica al sol a lo largo de la vida.

3.1.3. RESULTADOS DE LAS VARIABLES HISTOLÓGICAS

El número total de lesiones melanocíticas extirpadas y analizadas histológicamente en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia en el período entre el 1 de enero de 2002 y el 31 de diciembre de 2009 fue el siguiente (**Tabla 3.6**):

	Número total de casos	% del total de lesiones extirpadas	Casos con regresión	% del total de lesiones con regresión
Nevus melanocíticos	8898	95,33%	116	71,16%
Melanomas	433	4,64%	47	28,83%
Total	9331	100%	163	100%

	Casos con regresión	Casos totales	% con regresión
Nevus melanocíticos	116	8898	1,30%
Melanomas	47	433	10,85%

Se extirparon un total de 9331 lesiones melanocíticas, de las cuales 8898 correspondieron a nevos melanocíticos y 433 a melanomas. Se identificaron un total de 163 lesiones melanocíticas con regresión empleando los criterios de búsqueda descritos en el apartado de material y métodos, de las que 116 fueron nevos melanocíticos y 47 melanomas.

El 71,1% del total de lesiones melanocíticas con signos histológicos de regresión son nevos melanocíticos, aunque tan sólo el 1,3% del total de nevos melanocíticos extirpados en ese período de tiempo tienen regresión histológica (IC 95%:1,1-1,5%).

Por otro lado, un 28,8% del total de lesiones melanocíticas con regresión histológica son melanomas, aunque sólo un 10,8% del total de melanomas extirpados tienen signos histológicos de regresión (IC 95%:7,9-13,8%), hallazgo que concuerda con la mayoría de estudios con series de melanomas, que cifran entre un 10 y un 35% el porcentaje de los mismos que presentan regresión histológica ²⁷ (**figura 3.3**).

Por tanto, la regresión histológica en nuestra serie es 8,3 veces más frecuente en los melanomas que en los nevos melanocíticos, y como demuestran los intervalos de confianza, estas diferencias son claramente significativas. Aunque se objetivan muchos más casos de regresión en lesiones melanocíticas benignas que en melanomas, esto se debe a que el número de extirpaciones de nevos melanocíticos ha sido 20,5 veces mayor que el de melanomas.

Figura 3.3. Proporción de lesiones melanocíticas con regresión del total de melanomas y nevos melanocíticos extirpados en el período 2002-2009.

Proporción de melanomas con y sin regresión:



Proporción de nevos melanocíticos con y sin regresión:



3.1.3.1. DIAGNÓSTICO HISTOLÓGICO DE LAS LESIONES MELANOCÍTICAS

Los diagnósticos histológicos de las 163 lesiones analizadas están reflejados en la siguiente **tabla 3.7**.

NEVUS MELANOCÍTICOS	116
Nevus melanocítico	101
Nevus de Spitz	2
Halo nevus	10
Regresión completa	3
Unión	30
Compuesto	78
Intradérmico	5
Sin displasia	39
Displasia	52
Displasia severa	25
MELANOMAS	47
Extensión superficial	31
Léntigo maligno	11
Lentiginoso acral	2
Nodular	2
No tipificable	1

Tabla 3.7. Relación de las distintas lesiones melanocíticas con regresión incluidas en el estudio.

3.1.3.2. ASOCIACIONES ENTRE EL TIPO DE LESIÓN MELANOCÍTICA Y EL RESTO DE PARÁMETROS HISTOLÓGICOS.

Del estudio de los diferentes parámetros histológicos evaluados en los distintos tipos de lesiones melanocíticas se obtuvieron los siguientes valores de frecuencia (**tabla 3.8**):

	NEVUS		NEVUS			MELANOMAS			p	
	Sin displasia		Displasia							
	Número	%	Media	Número	%	Media	Número	%		Media
FIBROSIS										
Intensidad									NS	
Leve	17/39	43,6		29/77	37,7		14/47	29,8		
Moderada	15/39	38,5		36/77	46,8		23/47	48,9		
Extensa	7/39	17,9		12/77	15,6		10/47	21,3		
Tipo										
Laminar	33/39	84,6		63/77	81,8		22/47	46,8	<0,0001	
Compacta	6/39	15,4		13/77	16,9		19/47	40,4	0,004	
Indeterminada	0/39	0		1/77	1,3		6/47	12,8	0,003	
Delicada	3/39	7,7		0/77	0		0/47	0	0,008	
Esclerosis	6/39	15,4		3/77	3,9		2/47	4,3	0,048	
Localización										
Superficial	6/39	15,4		24/77	31,2		11/47	23,4	NS	
INFILTRADO INFLAMATORIO										
Densidad	39		159,0	77		141,1	47		184,5	0,027
Tipo										
Parcheado	29/39	74,4		64/77	83,1		41/47	87,2	NS	
Difuso	10/39	25,6		14/77	18,2		5/47	10,6	NS	
Localización										
Intratumoral	22/39	56,4		42/77	54,5		24/47	51,1	NS	
Peritumoral	36/39	92,3		72/77	93,5		46/47	97,9	NS	
MELANOFAGIA										
Densidad	39		35,9	77		37,4	47		52,0	NS
PROLIFERACIÓN VASCULAR										
Densidad	39		12,4	77		13,1	47		16,8	0,004
PÉRDIDA DE MELANOCITOS										
									NS	
Leve	11/39	28,2		35/77	45,5		15/47	31,9		
Moderada	15/39	38,5		20/77	26		17/47	36,2		
Intensa	11/39	28,2		22/77	28,6		15/47	31,9		
Total	2/39	5,1		0/77	0		0/47	0		
APOPTOSIS									0,048	
Ausente	26/39	66,7		48/77	62,3		20/47	42,6		
Escasa	7/39	17,9		24/77	31,2		19/47	40,4		
Intensa	6/39	15,4		5/77	6,5		8/47	17		
ATROFIA										
									NS	
Ausente	24/39	61,5		48/77	62,3		21/47	44,7		
Presente	15/39	38,5		29/77	37,7		26/47	55,3		

Asociaciones entre el tipo de lesión melanocítica y la fibrosis

Tipo de lesión melanocítica e intensidad de la fibrosis

En cuanto a los nevos comunes (sin displasia), un 43,6% de los mismos presentan fibrosis leve, un 38,5% moderada, y un 17,9% extensa. Los nevos displásicos muestran fibrosis leve en un 37,7% de los casos, moderada en un 46,8%, y extensa en un 15,6%. En un 29,8% de los melanomas la fibrosis es leve, en un 48,9% moderada y en un 21,3% extensa.

La prueba de chi cuadrado demuestra que esas diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0,692$).

Tipo de lesión melanocítica y tipo de fibrosis

La *fibrosis laminar* está presente en un 72,4% de las lesiones con regresión.

Se aprecia en el 84,6% de los nevos sin displasia, en el 81,8% de los nevos con displasia y en un 46,8% de los melanomas.

La prueba de chi cuadrado demuestra que esas diferencias son estadísticamente significativas ($p<0,0001$).

La fibrosis de tipo laminar es mucho menos frecuente en los melanomas que en los nevos melanocíticos, aunque también es la variedad más frecuente de fibrosis en los melanomas (46,8% de los mismos).

La *fibrosis compacta* está presente en un 23,3% de las lesiones con regresión.

Se aprecia en el 15,4% de los nevos sin displasia, en el 16,9% de los nevos con displasia y en un 40,4% de los melanomas.

La prueba de chi cuadrado demuestra que esas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,004$).

La fibrosis de tipo compacta es más frecuente en los melanomas que en los nevos melanocíticos, y es la segunda forma más frecuente de fibrosis en los melanomas (40,4% de los mismos).

La ***fibrosis indeterminada*** está presente en un 4,3% de las lesiones con regresión.

No se observa en ninguno de los nevos melanocíticos sin displasia, se aprecia en el 1,3% de los nevos con displasia y en un 12,8% de los melanomas.

La prueba de chi cuadrado demuestra que esas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,003$).

La fibrosis de tipo indeterminada es un hallazgo que se observa casi de forma exclusiva en los melanomas (en un 12,8% de los mismos). Cinco de los seis melanomas con fibrosis indeterminada eran melanomas de extensión superficial. El caso restante era un melanoma sobre léntigo maligno.

La ***fibrosis delicada*** está presente en un 1,8% de las lesiones con regresión.

La fibrosis de tipo delicada es un hallazgo exclusivo de los nevos melanocíticos sin displasia, que se aprecia en un 7,7% de los mismos. No se ha observado en ningún melanoma ni en ningún nevo melanocítico displásico.

La prueba de Chi cuadrado demuestra que esas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,008$).

La ***fibroplasia florida (fibrosis de tipo esclerosis)*** está presente en un 6,7% de las lesiones con regresión.

Se aprecia en el 15,4% de los nevos sin displasia, en el 3,9% de los nevos con displasia y en un 4,3% de los melanomas.

La prueba de chi cuadrado demuestra que esas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,048$).

La fibrosis de tipo esclerosis se ha observado fundamentalmente en nevos melanocíticos sin displasia (15,4%), siendo su presencia en estas lesiones mucho más frecuente que en los melanomas y en nevos melanocíticos displásicos.

Tipo de lesión melanocítica y localización de la fibrosis

La *fibrosis con acentuación subepidérmica (fibrosis superficial)* está presente en un 25,2% de las lesiones con regresión.

Se aprecia en el 15,4% de los nevos sin displasia, en el 31,2% de los nevos con displasia y en un 23,4% de los melanomas.

La prueba de chi cuadrado demuestra que estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0,171$).

Asociaciones entre el tipo de lesión melanocítica y el infiltrado inflamatorio

Tipo de lesión melanocítica y densidad del infiltrado linfocitario

En los nevos no displásicos la densidad media de linfocitos es de $159,03 \pm 186,08$, en los nevos displásicos de $141,15 \pm 144,36$, y en los melanomas de $184,57 \pm 121,00$.

La prueba de Kruskal-Wallis demuestra que esas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,027$).

Los melanomas presentan un infiltrado inflamatorio más denso que los nevos melanocíticos (13,8% superior a los nevos melanocíticos sin displasia y 23,5% superior al de los nevos displásicos) (**figura 3.4**). Llama la atención que el infiltrado inflamatorio es superior en los nevos sin displasia que en los nevos displásicos, ya que la presencia de infiltrado inflamatorio es un hallazgo habitual en estos últimos, que incluso se encuentra entre los criterios diagnósticos de los nevos displásicos.

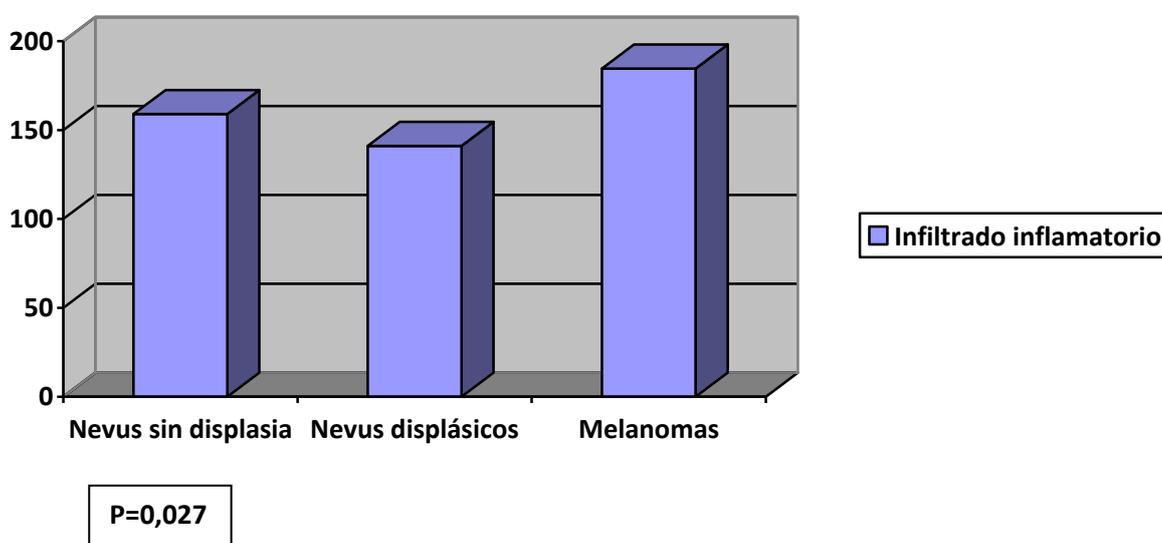


Figura 3.4. Representación de la densidad linfocitaria máxima por campo, usando el objetivo de 40 aumentos, en los distintos tipos de lesiones melanocíticas estudiadas.

Tipo de lesión melanocítica y tipo infiltrado linfocitario

El *infiltrado inflamatorio parcheado* está presente en un 82,3% de las lesiones con regresión.

Se aprecia en el 74,4% de los nevos sin displasia, en el 83,1% de los nevos con displasia y en un 87,2% de los melanomas.

La prueba de chi cuadrado no demuestra diferencias estadísticamente significativas ($p=0,287$).

El *infiltrado inflamatorio difuso* está presente en un 17,8% de las lesiones con regresión.

Se aprecia en el 25,6% de los nevos sin displasia, en el 18,2% de los nevos con displasia y en un 10,6% de los melanomas.

La prueba de chi cuadrado no demuestra diferencias estadísticamente significativas ($p=0,193$).

Tipo de lesión melanocítica y localización del infiltrado linfocitario

El *infiltrado inflamatorio intratumoral* está presente en un 54% de las lesiones con regresión.

Se aprecia en el 56,4% de los nevos sin displasia, en el 54,5% de los nevos con displasia y en un 51,1% de los melanomas.

La prueba de chi cuadrado no demuestra diferencias estadísticamente significativas ($p=0,877$).

El *infiltrado inflamatorio peritumoral* está presente en un 94,5% de las lesiones con regresión.

Se aprecia en el 92,3% de los nevos sin displasia, en el 93,5% de los nevos con displasia (incluidos aquellos con displasia severa) y en un 97,9% de los melanomas.

La prueba de chi cuadrado no demuestra diferencias estadísticamente significativas ($p=0,465$).

Asociaciones entre el tipo de lesión melanocítica y la densidad de melanófagos.

En los nevos no displásicos la densidad media de melanófagos es de $35,95 \pm 35,16$, en los nevos displásicos de $37,49 \pm 29,22$, y en los melanomas de $52,02 \pm 55,44$.

La prueba de Kruskal-Wallis demuestra que esas diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0,126$).

Los melanomas presentan una densidad de melanófagos mucho mayor que los nevos melanocíticos (30,8% superior a los nevos melanocíticos sin displasia y 27,9% superior a los nevos melanocíticos displásicos) (**figura 3.5**). Los nevos melanocíticos displásicos presentan una densidad de melanófagos prácticamente similar a la de los nevos melanocíticos sin displasia. A pesar de estos hallazgos, estas diferencias no son estadísticamente significativas.

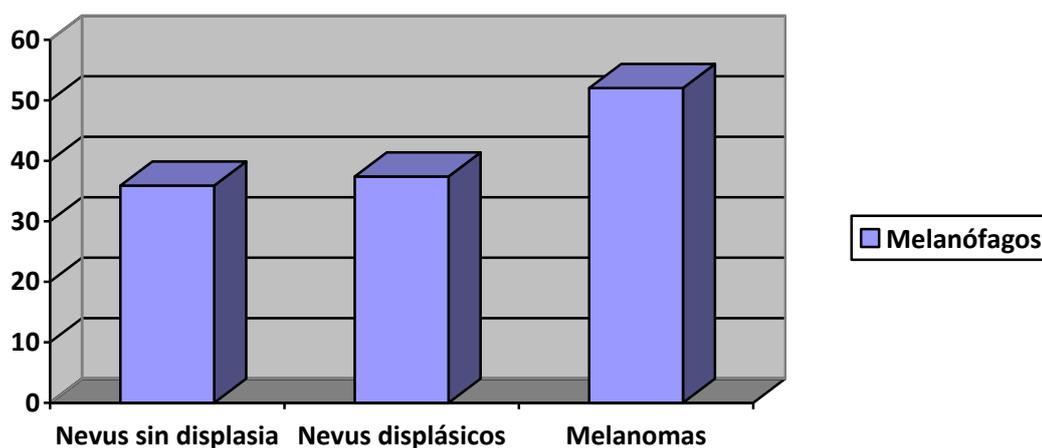


Figura 3.5. Representación de la densidad de melanófagos máxima por campo, usando el objetivo de 40 aumentos, en los distintos tipos de lesiones melanocíticas estudiadas.

Asociaciones entre el tipo de lesión melanocítica y la proliferación vascular.

En los nevos no displásicos la densidad media de vasos es de $12,44 \pm 5,32$, en los nevos displásicos de $13,18 \pm 5,33$, y en los melanomas de $16,82 \pm 6,91$.

La prueba de Kruskal-Wallis demuestra que esas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,004$).

Los melanomas presentan una densidad de vasos mayor que los nevos melanocíticos (un 26% superior a la de los nevos melanocíticos sin displasia y un 21,6% superior a la de los nevos melanocíticos displásicos) (**figura 3.6**). Los nevos melanocíticos displásicos presentan una densidad de vasos ligeramente superior a la de los nevos melanocíticos sin displasia.

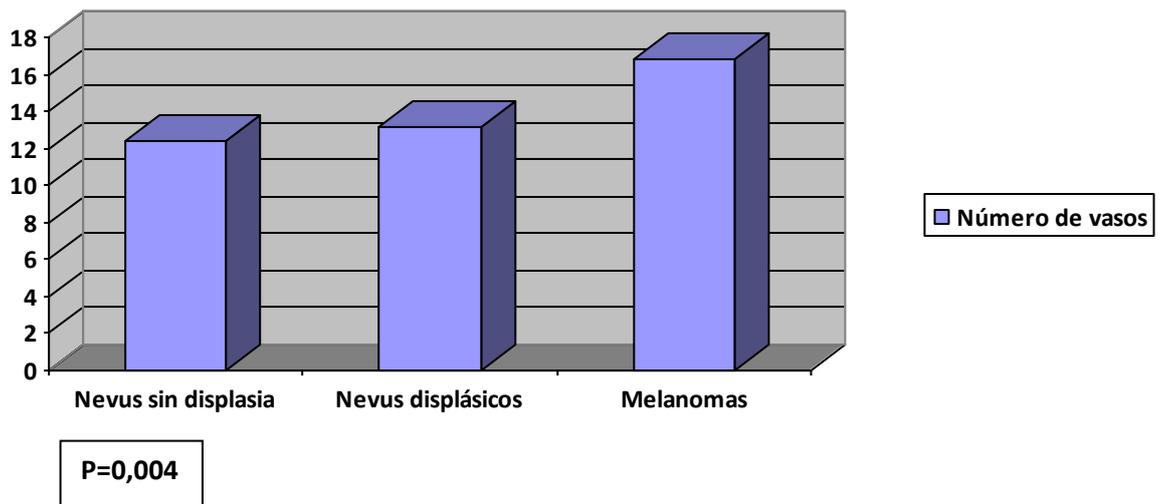


Figura 3.6. Representación de la densidad de vasos máxima por campo, usando el objetivo de 40 aumentos, en los distintos tipos de lesiones melanocíticas estudiadas.

Asociaciones entre el tipo de lesión melanocítica y la pérdida de melanocitos.

Del total de casos incluidos en el estudio se obtuvieron los siguientes datos: pérdida leve: 61 (37,4%); pérdida moderada: 52 (31,9%); pérdida intensa: 48 (29,4%); pérdida total: 2 (1,2%).

En cuanto a los nevos comunes (sin displasia), un 28,2% de los mismos presentan una mínima pérdida (leve), un 38,5% pérdida moderada, un 28,2% pérdida intensa, y en un 5,1% la pérdida fue total.

Los nevos displásicos muestran pérdida leve en un 45,5% de casos, moderada en un 26%, intensa en un 28,6%, y no hay pérdida total en ningún caso.

Los melanomas muestran pérdida leve en un 31,9% de los casos, moderada en un 36,2%, intensa en un 31,9%, y no se observa pérdida total en ningún caso (**figura 3.7**).

La prueba de chi cuadrado demuestra que no hay diferencias estadísticamente significativas al asociar la pérdida de melanocitos con el tipo de lesión melanocítica ($p=0,097$).

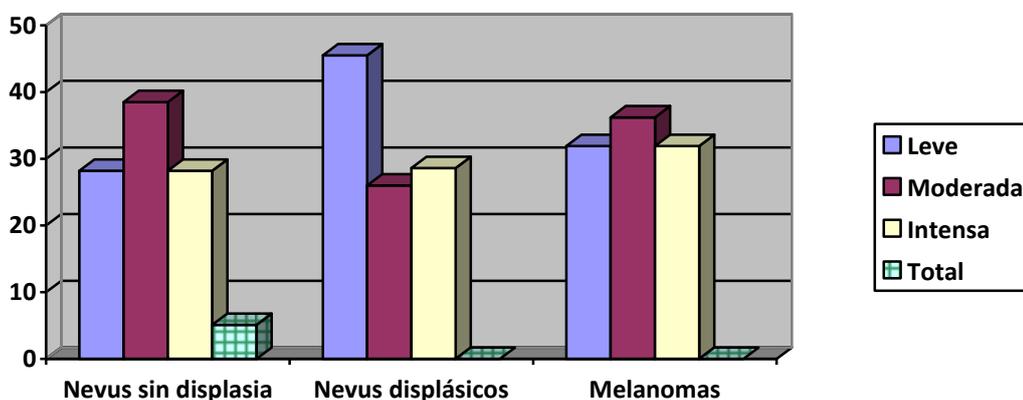


Figura 3.7. Representación de los distintos grados de pérdida de melanocitos en los distintos tipos de lesiones melanocíticas estudiadas.

Asociaciones entre el tipo de lesión melanocítica y la apoptosis de melanocitos.

Del total de casos incluidos en este estudio, la apoptosis fue nula en 94 casos (57,7%), escasa en 50 (30,7%), e intensa en 19 casos (11,7%).

En cuanto a los nevos comunes (sin displasia), un 66,7% de los mismos no presentan apoptosis, un 17,9% presentan apoptosis escasa, y un 15,4% intensa.

Los nevos displásicos no muestran apoptosis en un 62,3% de los casos, aunque se evidencia apoptosis escasa en un 31,2% e intensa en un 6,5%.

En un 42,6% de los melanomas no hay apoptosis, en un 40,4% la apoptosis es escasa y en un 17% la apoptosis es severa (**figura 3.8**).

La prueba de chi cuadrado demuestra que hay diferencias estadísticamente significativas entre la apoptosis y el tipo de lesión melanocítica ($p=0,048$).

La presencia de apoptosis es un hallazgo más frecuente en los melanomas que en los nevos melanocíticos. Llama la atención la presencia de apoptosis intensa en los nevos sin displasia, en un porcentaje prácticamente similar al de los melanomas y muy superior al de los nevos displásicos, de forma similar a lo que sucedía con la densidad del infiltrado linfocitario.

La ausencia de apoptosis es mucho más frecuente en los nevos melanocíticos que en los melanomas.

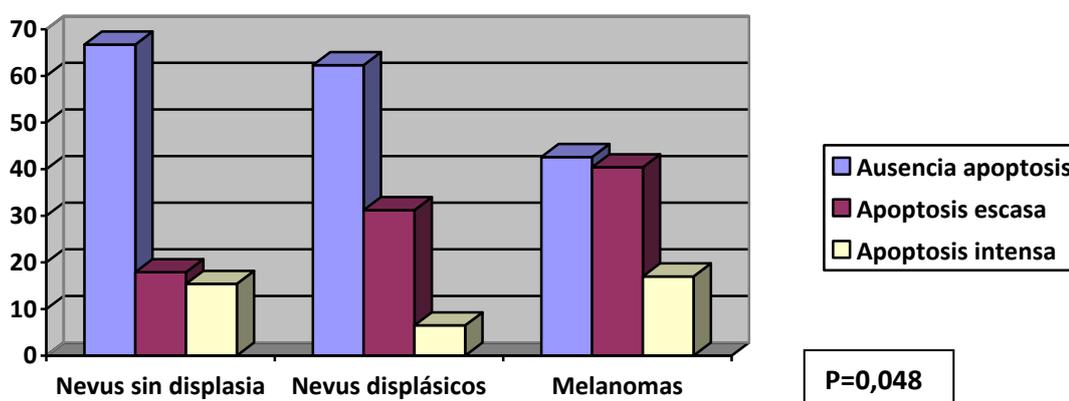


Figura 3.8. Representación de los distintos grados de apoptosis de melanocitos en los distintos tipos de lesiones melanocíticas estudiadas.

Asociaciones entre el tipo de lesión melanocítica y la atrofia epidérmica.

La atrofia epidérmica está presente en un 42,9% de las lesiones melanocíticas con regresión incluidas en este estudio.

Se aprecia en el 38,5% de los nevos sin displasia, en el 37,7% de los nevos con displasia y en un 55,3% de los melanomas (**figura 3.9**).

A pesar de esas diferencias, la prueba de chi cuadrado no permite demostrar que sean estadísticamente significativas ($p=0,127$).

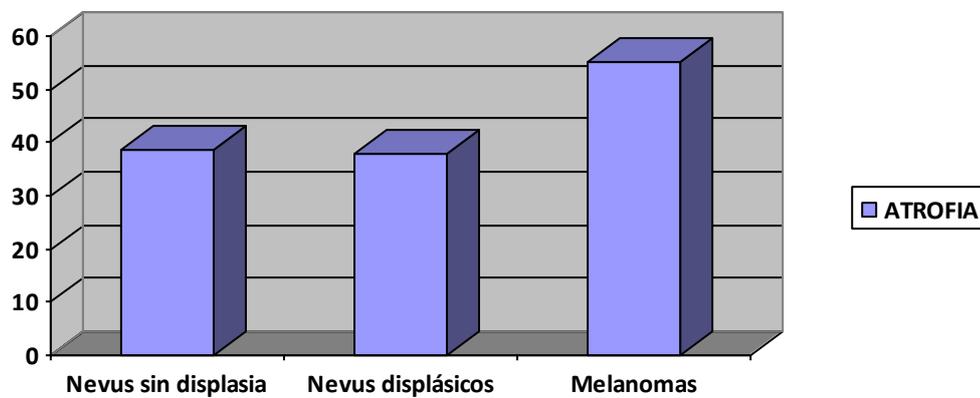


Figura 3.9. Presencia de atrofia epidérmica en los distintos tipos de lesiones melanocíticas estudiadas.

Asociaciones entre el tipo de lesión melanocítica (distinguiendo entre nevos con displasia “convencional” y nevos con displasia “severa”) y el resto de parámetros histológicos (tabla 3.9).

	Nevus melanocíticos									Melanomas			p
	Sin displasia			Displasia convencional			Displasia severa			Número	%	Media	
	Número	%	Media	Número	%	Media	Número	%	Media	Número	%	Media	
FIBROSIS													
Intensidad													0,664
Leve	17/39	43,5		21/52	40,3		8/25	32,0		14/47	29,7		
Moderada	15/39	38,4		25/52	48,0		11/25	44,0		23/47	48,9		
Extensa	7/39	17,9		6/52	11,5		6/25	24,0		10/47	21,2		
Tipo													
Laminar	33/39	84,6		44/52	84,6		19/25	76,0		22/47	46,8		<0,0001
Compacta	6/39	15,3		8/52	15,3		5/25	20,0		19/47	40,4		0,011
Indeterminada	0/39	0		0/52	0		1/25	4,0		6/47	12,7		0,006
Delicada	3/39	7,6		0/52	0		0/25	0		0/47	0		0,021
Esclerosis	6/39	15,3		2/52	3,8		1/25	4,0		2/47	4,2		0,108
Localización													
Superficial	6/39	15,3		21/58	36,2		3/25	5,1		11/47	23,4		0,013
INFILTRADO INFLAMATORIO													
Densidad	39		159,0±186,0	77		117,5±110,5	25		190,3±190,4	47		184,5±121,0	0,016
Tipo													
Parcheado	29/39	74,3		46/52	88,4		18/25	72,0		41/47	87,2		0,131
Difuso	10/39	25,6		6/52	11,5		8/25	32,0		5/47	10,6		0,043
Localización													
Intratumoral	22/39	56,4		25/52	48,0		17/25	68,0		24/47	51,0		0,398
Peritumoral	36/39	92,3		49/52	94,2		23/25	92,0		46/47	97,8		0,639
MELANOFAGIA													
Densidad	39		35,9±35,1	77		36,9±27,7	25		38,7±32,6	47		52,0±55,4	0,241
PROLIFERACIÓN VASCULAR													
Densidad	39		12,4±5,3	77		12,6±5,2	25		14,3±5,4	47		16,8±6,9	0,005
PÉRDIDA DE MELANOCITOS													
Leve	10/39	25,6		27/52	51,9		8/25	32,0		15/47	31,9		
Moderada	15/39	38,4		10/52	19,2		10/25	40,0		17/47	36,1		
Intensa	11/39	28,2		15/52	28,8		7/25	28,0		15/47	31,9		
Total	3/39	7,6		0/52	0		0/25	0		0/47	0		
APOPTOSIS DE MELANOCITOS													
Ausente	26/39	66,6		36/52	69,2		12/25	48,0		20/47	42,5		0,046
Escasa	7/39	17,9		14/52	26,9		10/25	40,0		19/47	40,4		
Intensa	6/39	15,3		2/52	3,8		3/25	12,0		8/47	17,0		
ATROFIA EPIDÉRMICA													
Ausente	24/39	61,5		38/52	73,0		10/25	40,0		21/47	44,6		0,009
Presente	15/39	38,4		14/52	26,9		15/25	60,0		26/47	48,9		

Las diferencias fundamentales que se observan tras diferenciar los nevos con displasia severa y los nevos con displasia convencional de las que se apreciaban considerando de forma conjunta todos los nevos displásicos son las siguientes (tabla 3.9):

- **Esclerosis:** La fibroplasia florida se aprecia en un 15,3% de los nevos melanocíticos sin displasia, mientras que los porcentajes del resto de lesiones en las que se observa este tipo de fibrosis son muy similares (en un 3,8% de los nevos con displasia convencional, en un 4% de los nevos con displasia severa y en un 4,2% de los melanomas). Las diferencias no son estadísticamente significativas, a diferencia de lo que sucedía al no diferenciar entre nevos con displasia convencional y nevos con displasia severa.

- **Fibrosis subepidérmica:** Se aprecia en un 15,3% de los nevos melanocíticos sin displasia, en un 36,2% de los nevos con displasia convencional, en un 5,1% de los nevos con displasia severa, y en un 23,4% de los melanomas. Las diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,013$).
- **Infiltrado inflamatorio difuso:** Se aprecia en un 25,6% de los nevos melanocíticos sin displasia, en un 11,5% de los nevos con displasia convencional, en un 32% de los nevos con displasia severa, y en un 10,6% de los melanomas. Las diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,043$).
- **Pérdida de melanocitos:** Las diferencias más llamativas se observan en la pérdida total de melanocitos, que sólo se constata en nevos melanocíticos sin displasia (en un 7,6% de los mismos), y en la pérdida leve de melanocitos, que se aprecia en un 51,9% de nevos con displasia convencional y en menos de un 32% del resto de lesiones. Las diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,029$).
- **Atrofia epidérmica:** La presencia de atrofia epidérmica es máxima en los nevos con displasia severa (en un 60% de los mismos), seguidos de los melanomas (48,9%). Los porcentajes son inferiores en los nevos melanocíticos sin displasia (38,4%) y en los nevos con displasia convencional (26,9%). Las diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,009$).
- El resto de parámetros estudiados no muestra cambios relevantes en relación a las asociaciones realizadas sin separar los nevos displásicos en nevos con displasia convencional y nevos con displasia severa.

3.1.3.3. ASOCIACIONES ENTRE LOS DIFERENTES TIPOS DE LESIONES MELANOCÍTICAS.

Asociaciones entre todos los nevos displásicos y los melanomas (tabla 3.10).

	Nevus			Melanomas			p
	Displasia			Número	%	Media	
	Número	%	Media				
FIBROSIS							
Intensidad							NS
Leve	29/77	37,7		14/47	29,8		
Moderada	36/77	46,8		23/47	48,9		
Extensa	12/77	15,6		10/47	21,3		
Tipo							
Laminar	63/77	81,8		22/47	46,8		<0,0001
Compacta	13/77	16,9		19/47	40,4		0,004
Indeterminada	1/77	1,3		6/47	12,8		0,012
Delicada	0/77	0		0/47	0		NA
Esclerosis	3/77	3,9		2/47	4,3		NS
Localización							
Superficial	24/77	31,2		11/47	23,4		NS
INFILTRADO INFLAMATORIO							
Densidad	77		141,1±190,4	47		184,5±121,0	0,01
Tipo							
Parcheado	64/77	83,1		41/47	87,2		NS
Difuso	14/77	18,2		5/47	10,6		NS
Localización							
Intratumoral	42/77	54,5		24/47	51,1		NS
Peritumoral	72/77	93,5		46/47	97,9		NS
MELANOFAGIA							
Densidad	77		37,4±32,6	47		52,0±55,4	NS
PROLIFERACIÓN VASCULAR							
Densidad	77		13,1±4,40	47		16,8±6,91	0,006
PÉRDIDA DE MELANOCITOS							
							NS
Leve	35/77	45,5		15/47	31,9		
Moderada	20/77	26		17/47	36,2		
Intensa	22/77	28,6		15/47	31,9		
Total	0/77	0		0/47	0		
APOPTOSIS							
							NS
Ausente	48/77	62,3		20/47	42,6		
Escasa	24/77	31,2		19/47	40,4		
Intensa	5/77	6,5		8/47	17		
ATROFIA							
							NS
Ausente	48/77	62,3		21/47	44,7		
Presente	29/77	37,7		26/47	55,3		

Asociaciones entre todos los nevos displásicos y los melanomas (tabla 3.10).

- **Fibrosis:** No hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la intensidad de la fibrosis. La fibrosis laminar es mucho más frecuente en los nevos displásicos que en los melanomas. Se aprecia en un 81,8% de los nevos displásicos y en un 46,8% de los melanomas, y se demuestra que estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,0001$). La fibrosis compacta es más frecuente en los melanomas (40,4%) que en los nevos displásicos (16,9%), y se demuestra que estas diferencias son estadísticamente significativas ($p = 0,004$). La fibrosis de tipo indeterminado es un hallazgo casi exclusivo de melanomas (12,8%), aunque se aprecia también en un 1,3% de nevos displásicos, y se demuestra que estas diferencias son estadísticamente significativas ($p = 0,012$). No hay casos de fibrosis delicada en nevos displásicos ni en melanomas. No hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la fibrosis de tipo esclerosis, ya que se aprecia en un 4,3% de los melanomas y en un 3,9% de nevos displásicos. Tampoco hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la localización superficial de la fibrosis.
- **Infiltrado inflamatorio:** En relación a la densidad del infiltrado inflamatorio, la densidad media en el grupo de melanomas fue muy superior a la de los nevos displásicos (184,5 y 141,1 linfocitos respectivamente), y se demuestra que estas diferencias son estadísticamente significativas ($p = 0,01$). En cuanto a la localización del infiltrado (intratumoral o peritumoral) y a la distribución del mismo (parcheado o difuso), no se aprecian diferencias estadísticamente significativas.
- **Proliferación vascular:** La densidad media de vasos es superior en los melanomas que en los nevos displásicos (16,8 y 13,1 respectivamente), diferencias que son estadísticamente significativas ($p = 0,006$).
- El resto de variables analizadas (melanofagia, pérdida de melanocitos, apoptosis y atrofia), no mostraron diferencias estadísticamente significativas al compararlas entre nevos displásicos y melanomas.

Asociaciones entre todos los nevos displásicos y los tipos histológicos más frecuentes de melanoma en esta serie.

- **Asociaciones entre todos los nevos displásicos y los melanomas de extensión superficial.**

- La fibrosis laminar es un hallazgo más frecuente en los nevos displásicos (81,8%) que en los melanomas de extensión superficial (51,6%). Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,001$).
- La fibrosis indeterminada es un hallazgo casi exclusivo de los melanomas de extensión superficial (16,1%), aunque también se aprecia en un melanoma sobre léntigo maligno y en un nevo melanocítico compuesto con displasia severa (1,3%). Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,002$).
- En cuanto al infiltrado inflamatorio se evidencian diferencias estadísticamente significativas ($p=0,006$) entre los melanomas de extensión superficial (densidad media de 198,5 linfocitos) y los nevos displásicos (densidad media de 141,1 de linfocitos). No se aprecian diferencias en relación a la distribución ni a la localización del mismo.
- Se observaron más melanófagos y vasos en los melanomas de extensión superficial que en los nevos displásicos. La densidad media de melanófagos en los melanomas fue de 62,2, y la de los nevos displásicos de 37,4. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,02$). La densidad media de vasos en los melanomas fue de 16,3 y la de los nevos displásicos de 13,1. Estas diferencias también son estadísticamente significativas ($p=0,011$).
- La apoptosis, la atrofia y la pérdida de melanocitos no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

- **Asociaciones entre todos los nevos displásicos y los melanomas sobre léntigo maligno.**

- La fibrosis laminar es más frecuente en los nevos displásicos (81,8%) que en el grupo de melanomas sobre léntigo maligno (45,5%). Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,007$).
- La fibrosis compacta es más frecuente en los melanomas sobre léntigo maligno (45,5%) que en los nevos displásicos (16,9%). Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,028$).
- La atrofia es mucho más frecuente en el grupo de melanomas sobre léntigo maligno (90,9%) que en los nevos displásicos (37,7%). Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,001$).

No hemos realizado asociaciones con los melanomas nodulares ni con los melanomas lentiginosos acrales, ya que sólo se objetivaron dos casos de cada tipo con regresión. El hecho de que sólo se constatará regresión en un número tan reducido de melanomas nodulares tiene trascendencia, ya que en todas las series es el segundo tipo de melanomas más frecuente, por detrás de los melanomas de extensión superficial. Esta circunstancia probablemente sea debida a que la regresión se asocia sobre todo a la fase de crecimiento radial, que no se produce en los melanomas nodulares.

Asociaciones entre los nevos con displasia severa y los melanomas (tabla 3.11).

	Nevus		Melanomas			p
	Displasia severa					
	Número	%	Media	Número	%	Media
FIBROSIS						
Intensidad						NS
Leve	8/25	32		14/47	29,8	
Moderada	11/25	44		23/47	48,9	
Extensa	6/25	24		10/47	21,3	
Tipo						
Laminar	19/25	76		22/47	46,8	0,0 17
Compacta	5/25	20		19/47	40,4	NS
Indeterminada	1/25	4		6/47	12,8	0,012
Delicada	0/25	0		0/47	0	NA
Esclerosis	1/25	4		2/47	4,3	NS
Localización						
Superficial	3/25	12		11/47	23,4	NS
INFILTRADO INFLAMATORIO						
Densidad	25		190,3±190,4	47		184,5±121,0 NS
Tipo						
Parcheado	18/25	72		41/47	87,2	NS
Difuso	8/25	32		5/47	10,6	0,029
Localización						
Intratumoral	17/25	68		24/47	51,1	NS
Peritumoral	23/25	92		46/47	97,9	NS
MELANOFAGIA						
Densidad	25		38,7±32,6	47		52,0±55,4 NS
PROLIFERACIÓN VASCULAR						
Densidad	25		14,3±5,40	47		16,8±6,91 NS
PÉRDIDA DE MELANOCITOS						
						NS
Leve	8/25	32		15/47	31,9	
Moderada	10/25	40		17/47	36,2	
Intensa	7/25	28		15/47	31,9	
Total	0/25	0		0/47	0	
APOPTOSIS						
						NS
Ausente	12/25	48		20/47	42,6	
Escasa	10/25	40		19/47	40,4	
Intensa	3/25	12		8/47	17	
ATROFIA						
						NS
Ausente	10/25	40		21/47	44,7	
Presente	15/25	60		26/47	55,3	

Asociaciones entre los nevos con displasia severa y los melanomas (tabla 3.11).

- **Fibrosis:** No hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la intensidad de la fibrosis. La fibrosis laminar es mucho más frecuente en los nevos melanocíticos con displasia severa (76%) que en los melanomas (46,8%; $p=0,017$). A diferencia de lo que sucedía con las asociaciones entre todos los nevos displásicos y los melanomas, al comparar sólo aquellos nevos melanocíticos con displasia severa y los melanomas, aunque la fibrosis compacta es más frecuente en los melanomas, las diferencias no son estadísticamente significativas. No hay casos de fibrosis delicada en nevos con displasia severa ni en melanomas. Tampoco hay diferencias estadísticamente significativas en relación a la fibrosis de tipo esclerosis, ni en cuanto a la localización superficial de la misma.
- **Infiltrado inflamatorio:** El infiltrado inflamatorio difuso es más frecuente en los nevos con displasia severa (32%) que en los melanomas (10,6%; $p=0,029$). En cuanto a su localización (intratumoral o peritumoral) y a su distribución (parcheado o difuso), no hay diferencias estadísticamente significativas.
- El resto de variables histológicas estudiadas (melanofagia, proliferación vascular, apoptosis, atrofia o pérdida de melanocitos) no mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar los melanomas con los nevos melanocíticos con displasia severa.

Asociaciones entre los nevos con displasia severa y los tipos histológicos más frecuentes de melanoma en esta serie.

- **Asociaciones entre los nevos con displasia severa y los melanomas de extensión superficial.**
 - Los hallazgos más relevantes de las asociaciones que se establecieron al comparar los melanomas de extensión superficial y los nevos melanocíticos con displasia severa fueron la ausencia de diferencias

significativas en cuanto a la presencia de fibrosis de tipo laminar o compacta en ambos tipos de lesiones.

- No hay diferencias en cuanto a la densidad ni a las características del infiltrado linfocitario, y tampoco se aprecian diferencias relativas a la pérdida de melanocitos, la apoptosis o la atrofia.

En función de los resultados de este estudio sería muy difícil hallar parámetros diferenciales entre la regresión de melanomas de extensión superficial y de nevos con displasia severa, ya que el estudio estadístico reveló una ausencia de diferencias estadísticamente significativas al evaluar todas las variables histológicas. Tan sólo la edad permitió establecer diferencias significativas entre los dos tipos de lesiones ($p=0,009$). En los melanomas de extensión superficial la edad media de los pacientes fue de 64,1 años, mientras que la de aquellos con nevos con displasia severa fue de 43,4.

- **Asociaciones entre los nevos con displasia severa y los melanomas sobre léntigo maligno.**

- Al igual que sucedía al comparar los nevos melanocíticos con displasia severa y los melanomas de extensión superficial no hay diferencias en relación a la fibrosis laminar y compacta. Por el contrario, la fibrosis superficial es más frecuente en los pacientes con melanomas sobre léntigo maligno (45,5%) que en los pacientes con nevos con displasia severa (12%; $p=0,026$).
- La presencia de infiltrado difuso es más frecuente en los nevos con displasia severa (32%), ya que no se apreció en ningún caso de melanoma sobre léntigo maligno ($p=0,033$).
- No se objetivaron diferencias al evaluar la pérdida de melanocitos, la apoptosis o la proliferación vascular.

- A pesar de que la atrofia es un 30,9% más frecuente en los melanomas sobre léntigo maligno (90,9%) que en los nevos con displasia severa (60%), estas diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0,067$). Este hecho es muy importante ya que, al tratarse de melanomas sobre léntigo maligno, sería de esperar que la atrofia fuera una de los parámetros que mostrara diferencias relevantes. De hecho, al comparar los melanomas sobre léntigo maligno con todos los nevos displásicos (incluyendo aquellos con displasia convencional), el porcentaje de atrofia era muy superior en los melanomas (53,3% más).

Asociaciones entre los nevos con displasia “severa” y los nevos con displasia “convencional” (tabla 3.12).

	Nevus			Nevus			p
	Displasia severa			Displasia convencional			
	Número	%	Media	Número	%	Media	
FIBROSIS							
Intensidad							NS
Leve	8/25	32		21/52	40,4		
Moderada	11/25	44		25/52	48,1		
Extensa	6/25	24		6/52	11,5		
Tipo							
Laminar	19/25	76		44/52	84,6		NS
Compacta	5/25	20		8/52	15,4		NS
Indeterminada	1/25	4		0/52	0		NS
Delicada	0/25	0		0/52	0		NA
Esclerosis	1/25	4		2/52	3,8		NS
Localización							
Superficial	3/25	12		21/52	40,4		0,012
INFILTRADO INFLAMATORIO							
Densidad	25		190,3±190,4	52		117,5±110,5	NS
Tipo							
Parcheado	18/25	72		46/52	88,5		NS
Difuso	8/25	32		6/52	11,5		0,029
Localización							
Intratumoral	17/25	68		25/52	51,9		NS
Peritumoral	23/25	92		49/52	94,2		NS
MELANOFAGIA							
Densidad	25		38,7±32,6	52		36,9±27,7	NS
PROLIFERACIÓN VASCULAR							
Densidad	25		14,3±5,4	47		12,6±5,2	NS
PÉRDIDA DE MELANOCITOS							
							NS
Leve	8/25	32		27/52	51,9		
Moderada	10/25	40		10/52	19,2		
Intensa	7/25	28		15/52	28,8		
Total	0/25	0		0/52	0		
APOPTOSIS							
							NS
Ausente	12/25	48		36/52	69,2		
Escasa	10/25	40		14/52	26,9		
Intensa	3/25	12		2/52	3,8		
ATROFIA							
							NS
Ausente	10/25	40		38/52	73,1		0,005
Presente	15/25	60		14/52	26,9		

Asociaciones entre los nevos con displasia convencional y los nevos con displasia severa (tabla 3.12).

Los hallazgos más relevantes al comparar los nevos melanocíticos con displasia severa con los nevos con displasia convencional son los siguientes:

- La fibrosis superficial es más frecuente en los nevos con displasia convencional (40,4%) que en los nevos con displasia severa (12%; $p=0,012$).
- El infiltrado inflamatorio difuso es más frecuente en los nevos con displasia severa (32%) que en los nevos con displasia convencional (11,5%; $p=0,029$).
- La atrofia también es un hallazgo más frecuente en los nevos con displasia severa (60%) que en los nevos con displasia convencional (26,9%; $p=0,005$).

3.1.3.4. ASOCIACIONES ENTRE EL ÍNDICE DE BRESLOW Y LA FASE DE CRECIMIENTO DE LOS MELANOMAS Y EL RESTO DE VARIABLES.

Asociaciones entre el índice de Breslow de los melanomas con regresión y el resto de parámetros histológicos evaluados (tabla 3.13).

ÍNDICE DE BRESLOW		Número	%	Breslow Media (mm)	Breslow Desv.típica	Coef.correl	p
FIBROSIS							
Intensidad							
Leve		14	29,78	0,53	0,38		NS
Moderada		23	48,93	1,09	1,29		
Extensa		10	21,27	0,88	1,67		
Tipo							
Laminar	SÍ	22	46,8	0,58	0,84		NS
	NO	25	53,19	1,13	1,41		
Compacta	SÍ	19	40,42	1,17	1,57		NS
	NO	28	59,57	0,68	0,84		
Indeterminada	SÍ	6	12,76	1,03	0,8		NS
	NO	41	87,23	0,85	1,25		
Delicada	SÍ	0	0				NA
	NO	47	100	0,87	1,2		
Esclerosis	SÍ	2	4,25	1,15	0,14		NS
	NO	45	95,74	0,86	1,23		
Localización							
Superficial	SÍ	11	23,4	0,37	0,28		NS
	NO	36	76,59	1,03	1,33		
Profunda	SÍ	47	100	0,87	1,2		NA
	NO	0	0				
INFILTRADO INFLAMATORIO							
Densidad						0,208	NS
Tipo							
Parcheado	SÍ	41	87,23	0,92	1,27		NS
	NO	6	12,76	0,57	0,4		
Difuso	SÍ	5	10,63	0,43	0,25		NS
	NO	42	89,36	0,93	1,26		
Localización							
Intratumoral	SÍ	24	51,06	1,17	1,54		NS
	NO	23	48,93	0,56	0,59		
Peritumoral	SÍ	46	97,87	0,87	1,21		NS
	NO	1	2,12	1,25	NA		
MELANOFAGIA							
Densidad						0,323	0,027

PROLIFERACIÓN VASCULAR					
Densidad				0,090	NS
PÉRDIDA DE MELANOCITOS					
Leve	15	31,91	0,32	0,33	0,007
Moderada	17	36,17	1,47	1,58	
Intensa	15	31,91	0,76	1,01	
APOPTOSIS					
Ausente	20	42,55	0,35	0,41	0,004
Escasa	19	40,42	0,83	0,72	
Intensa	8	17,02	2,3	2,14	
ATROFIA					
Ausente	21	44,68	0,87	0,81	NS
Presente	26	55,31	0,88	1,46	

Asociación entre el índice de Breslow y la fibrosis.

Intensidad de la fibrosis: La media del índice de Breslow en los melanomas en los que la intensidad de la fibrosis es leve es 0,53, la de los casos en los que es moderada es 1,09, y la de los casos en los que es extensa es 0,88.

A pesar de esas diferencias, no hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y la intensidad de la fibrosis

Tipo de fibrosis

Fibrosis laminar: La media del índice de Breslow en los melanomas con fibrosis laminar es de 0,58, mientras que la de los casos sin fibrosis laminar es de 1,13.

No hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y la fibrosis de tipo laminar.

Fibrosis compacta: La media del índice de Breslow en los melanomas con fibrosis compacta es de 1,17, mientras que la de los casos sin fibrosis compacta es de 0,68.

No hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y la fibrosis de tipo compacta.

Aunque los resultados no son estadísticamente significativos, la presencia de fibrosis de tipo compacto en los melanomas muestra una tendencia de asociación a un mayor índice de Breslow.

Fibrosis indeterminada: La media del índice de Breslow en los melanomas con fibrosis indeterminada es de 1,03, mientras que la de los casos sin fibrosis indeterminada es de 0,85.

No hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y la fibrosis de tipo indeterminada.

Fibrosis delicada: No se puede realizar la asociación entre el índice de Breslow y la fibrosis de tipo delicada (no hay ningún caso).

Fibrosis de tipo esclerosis: La media del índice de Breslow en los melanomas con fibrosis de tipo esclerosis es de 1,15, mientras que la de los casos sin fibrosis de tipo esclerosis es de 0,86.

No hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y la fibrosis de tipo esclerosis.

Localización de la fibrosis

Fibrosis superficial: La media del índice de Breslow en los melanomas con fibrosis superficial es de 0,37, mientras que la de los casos sin fibrosis superficial es de 1,13.

A pesar de lo llamativas que son las diferencias, no hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y la fibrosis superficial.

Asociación entre el índice de Breslow y el infiltrado inflamatorio.

Densidad del infiltrado: El coeficiente de correlación entre el índice de Breslow y la densidad de linfocitos es de 0,208.

No hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y la densidad del infiltrado inflamatorio.

Tipo de infiltrado

Infiltrado parcheado: La media del índice de Breslow en los melanomas con infiltrado parcheado es de 0,92, mientras que la de los casos sin infiltrado parcheado es de 0,57.

No hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y el infiltrado inflamatorio parcheado.

Infiltrado difuso: La media del índice de Breslow en los melanomas con infiltrado difuso es de 0,43, mientras que la de los casos sin infiltrado difuso es de 0,93.

No hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y el infiltrado inflamatorio difuso.

Localización del infiltrado

Infiltrado intratumoral: La media del índice de Breslow en los melanomas con infiltrado intratumoral es de 1,17, mientras que la de los casos sin infiltrado intratumoral es de 0,56.

No hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y el infiltrado inflamatorio intratumoral.

Infiltrado peritumoral: La media del índice de Breslow en los melanomas con infiltrado peritumoral es de 0,87, mientras que la de los casos sin infiltrado peritumoral es de 1,25.

No hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y el infiltrado inflamatorio peritumoral.

Asociación entre el índice de Breslow y la melanofagia.

El coeficiente de correlación entre el Breslow y la densidad de melanófagos es de 0,323.

Sí hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y la melanofagia ($p=0,027$), de modo que a medida que aumenta el índice de Breslow también lo hace la densidad de melanófagos.

Este hallazgo corroboraría el hecho de que el índice de Breslow también muestra una relación directa con la apoptosis, ya que a mayor destrucción de melanocitos, es de esperar que el número de melanófagos en la dermis sea también mayor.

Asociación entre el índice de Breslow y la proliferación vascular.

El coeficiente de correlación entre el Breslow y la densidad de vasos es de 0,090.

No hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y el número de vasos.

Asociación entre el Breslow y la pérdida de melanocitos.

La media del índice de Breslow en los melanomas en los que la pérdida de melanocitos es leve es 0,32, la de los casos en los que es moderada es 1,47, y la de los casos en los que es severa es 0,76.

Sí hay correlación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y la pérdida de melanocitos ($p=0,007$).

Asociación entre el Breslow y la apoptosis.

La media del índice de Breslow en los melanomas en los que no hay apoptosis es 0,35, la de los casos en los que la apoptosis es escasa es 0,83, y la de los casos en los que es intensa es 2,30.

Sí hay correlación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y la apoptosis ($p=0,004$).

Este sería el hallazgo más relevante de las asociaciones entre el índice de Breslow y los distintos parámetros histológicos evaluados, ya que se observa un incremento progresivo del índice de Breslow a medida que aumenta la intensidad de la apoptosis.

La media del índice de Breslow en los melanomas con apoptosis intensa es 1,95mm mayor que la de los melanomas en los que no se aprecia apoptosis, y 1,45mm mayor que aquellos melanomas en los que se observa apoptosis leve.

Dado que en la actualidad se considera el índice de Breslow como el principal factor pronóstico en el melanoma, la apoptosis intensa probablemente también podría asociarse a un peor pronóstico en los melanomas.

Asociación entre el índice de Breslow y la atrofia.

La media del índice de Breslow en los melanomas con atrofia epidérmica es de 0,88, mientras que la de los casos sin atrofia epidérmica es de 0,87.

No hay asociación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y la atrofia.

Asociaciones entre la fase de crecimiento en el melanoma y el resto de parámetros histológicos evaluados (tabla 3.14)

TIPO DE CRECIMIENTO							
	RADIAL			VERTICAL			p
	Número	%	Media	Número	%	Media	
FIBROSIS							
Intensidad							NS
Leve	12/31	38,7		2/16	12,5		
Moderada	12/31	38,7		11/16	68,8		
Extensa	7/31	22,6		3/16	18,8		
Tipo							
Laminar	18/31	58,1		4/16	25		0,031
Compacta	11/31	35,5		8/16	50		NS
Indeterminada	2/31	6,5		4/16	25		NS
Delicada	0/31	0		0/16	0		NA
Esclerosis	1/31	3,2		1/16	6,3		NS
Localización							
Superficial	10/31	32,3		1/16	6,3		0,046
INFILTRADO INFLAMATORIO							
Densidad	31		180,5±134,3	16		188,4±98,5	NS
Tipo							
Parcheado	27/31	87,1		14/16	87,5		NS
Difuso	4/31	12,9		1/16	6,3		NS
Localización							
Intratumoral	13/31	41,9		11/16	68,8		NS
Peritumoral	31/31	100		15/16	93,8		NS
MELANOFAGIA							
Densidad	31		45,1±34,8	16		65,6±73,5	NS
PROLIFERACIÓN VASCULAR							
Densidad	31		15,8±6,0	16		18,8±8,2	NS
PÉRDIDA DE MELANOCITOS							
							NS
Leve	13/31	41,9		2/16	12,5		
Moderada	8/31	25,8		9/16	56,3		
Intensa	10/31	32,3		5/16	31,3		
Total	0/31	0		0/16	0		
APOPTOSIS							
							0,036
Ausente	17/31	54,8		3/16	18,8		
Escasa	11/31	35,5		8/16	50		
Intensa	3/31	9,7		5/16	31,3		
ATROFIA							
							NS
Ausente	13/31	41,9		8/16	50		NS
Presente	18/31	58,1		8/16	50		

Asociación entre la fase de crecimiento en los melanomas con regresión y la fibrosis.

Intensidad de la fibrosis

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y la intensidad de la fibrosis.

Se aprecia crecimiento vertical en un 12,5% de los melanomas con fibrosis leve, y crecimiento radial en un 38,7% de los melanomas con fibrosis leve.

Se aprecia crecimiento vertical en un 68,8% de los melanomas con fibrosis moderada, y crecimiento radial en un 38,7% de los melanomas con fibrosis moderada.

Se aprecia crecimiento vertical en un 18,8% de los melanomas con fibrosis extensa, y crecimiento radial en un 22,6% de los melanomas con fibrosis extensa.

Tipo de fibrosis

Fibrosis laminar

Sí hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y la fibrosis de tipo laminar ($p=0,031$).

Se aprecia crecimiento vertical en sólo un 25% de los melanomas con fibrosis de tipo laminar, y crecimiento radial en un 58,1% de los melanomas con fibrosis de tipo laminar.

Se aprecia crecimiento vertical en un 75% de los melanomas que no presentan fibrosis de tipo laminar, y crecimiento radial en un 41,9% de los melanomas que no presentan fibrosis de tipo laminar

Fibrosis compacta

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y la fibrosis de tipo compacta.

Se aprecia crecimiento vertical en un 50% de los melanomas con fibrosis de tipo compacta, y crecimiento radial en un 35,5% de los melanomas con fibrosis de tipo compacta.

Se aprecia crecimiento vertical en un 50% de los melanomas que no presentan fibrosis de tipo compacta, y crecimiento radial en un 64,5% de los melanomas que no presentan fibrosis de tipo compacta.

Fibrosis indeterminada

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y la fibrosis de tipo indeterminada.

Se aprecia crecimiento vertical en un 25% de los melanomas con fibrosis de tipo indeterminada, y crecimiento radial en un 6,5% de los melanomas con fibrosis de tipo indeterminada.

Se aprecia crecimiento vertical en un 75% de los melanomas que no presentan fibrosis de tipo indeterminada, y crecimiento radial en un 93,5% de los melanomas que no presentan fibrosis de tipo indeterminada.

Fibrosis delicada

No hay ningún melanoma con regresión con fibrosis de tipo delicada.

Fibrosis de tipo esclerosis

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y la fibrosis de tipo esclerosis.

Se aprecia crecimiento vertical en un 6,3% de los melanomas con fibrosis de tipo esclerosis, y crecimiento radial en un 3,2% de los melanomas con fibrosis de tipo esclerosis.

Se aprecia crecimiento vertical en un 93,8% de los melanomas que no presentan fibrosis de tipo esclerosis, y crecimiento radial en un 96,8% de los melanomas que no presentan fibrosis de tipo esclerosis.

Localización de la fibrosis

Fibrosis superficial

Sí hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y la fibrosis de tipo superficial ($p=0,046$).

Se aprecia crecimiento vertical en sólo un 6,3% de los melanomas con fibrosis de localización superficial, y crecimiento radial en un 32,3% de los melanomas con fibrosis de localización superficial.

Se aprecia crecimiento vertical en un 93,8% de los melanomas que no presentan fibrosis de localización superficial, y crecimiento radial en un 67,7% de los melanomas que no presentan fibrosis de localización superficial.

Asociación entre la fase de crecimiento en los melanomas con regresión y el infiltrado inflamatorio.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y la intensidad del infiltrado inflamatorio.

La densidad media de linfocitos en los melanomas con crecimiento radial es de $180,5 \pm 134,3$. La densidad media de linfocitos en los melanomas con crecimiento vertical es de $188,4 \pm 98,5$.

Tipo de infiltrado

Infiltrado parcheado

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y el infiltrado inflamatorio parcheado.

Se aprecia crecimiento vertical en un 87,5% de los melanomas con infiltrado inflamatorio parcheado, y crecimiento radial en un 87,1% de los melanomas con infiltrado inflamatorio parcheado.

Se aprecia crecimiento vertical en un 12,5% de los melanomas que no presentan infiltrado inflamatorio parcheado, y crecimiento radial en un 12,9% de los melanomas que no presentan infiltrado inflamatorio parcheado.

Infiltrado difuso

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y el infiltrado inflamatorio difuso.

Se aprecia crecimiento vertical en un 6,3% de los melanomas con infiltrado inflamatorio difuso, y crecimiento radial en un 12,9%% de los melanomas con infiltrado inflamatorio difuso.

Se aprecia crecimiento vertical en un 93,8% de los melanomas que no presentan infiltrado inflamatorio difuso, y crecimiento radial en un 87,1% de los melanomas que no presentan infiltrado inflamatorio difuso.

Localización del infiltrado

Infiltrado intratumoral

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y el infiltrado inflamatorio intratumoral.

Se aprecia crecimiento vertical en un 68,8% de los melanomas con infiltrado inflamatorio intratumoral, y crecimiento radial en un 41,9% de los melanomas con infiltrado inflamatorio intratumoral.

Se aprecia crecimiento vertical en un 31,3% de los melanomas que no presentan infiltrado inflamatorio intratumoral, y crecimiento radial en un 58,1% de los melanomas que no presentan infiltrado inflamatorio intratumoral.

Infiltrado peritumoral

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y el infiltrado inflamatorio peritumoral.

Se aprecia crecimiento vertical en un 93,8% de los melanomas con infiltrado inflamatorio peritumoral, y crecimiento radial en un 100% de los melanomas con infiltrado inflamatorio peritumoral.

Se aprecia crecimiento vertical en un 6,3% de los melanomas que no presentan infiltrado inflamatorio peritumoral, y crecimiento radial en un 0% de los melanomas que no presentan infiltrado inflamatorio peritumoral.

Asociación entre el tipo de crecimiento en los melanomas con regresión y la pérdida de melanocitos

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y la pérdida de melanocitos.

Un 12,5% de los melanomas en fase de crecimiento vertical presentan una pérdida leve de melanocitos, un 56,3% una pérdida moderada y un 31,3% una pérdida intensa.

Un 41,9% de los melanomas en fase de crecimiento radial presentan una pérdida leve de melanocitos, un 25,8% una pérdida moderada y un 32,3% una pérdida intensa.

Asociación entre el tipo de crecimiento en los melanomas con regresión y la apoptosis.

Sí hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y la apoptosis ($p=0,036$).

En los melanomas con crecimiento vertical no hay apoptosis en un 18,8% de los mismos, hay apoptosis escasa en un 50% e intensa en un 31,3%.

En los melanomas con crecimiento radial no hay apoptosis en un 54,8% de los mismos, hay apoptosis escasa en un 35,5% e intensa en un 9,7%.

Estos resultados también corroborarían los que se han obtenido al valorar las asociaciones entre el índice de Breslow y la apoptosis, que mostraban un incremento progresivo del grado de apoptosis a medida que aumentaba el espesor del melanoma.

Asociación entre el tipo de crecimiento en los melanomas con regresión y la atrofia.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y la atrofia epidérmica.

Un 50% de los melanomas en fase de crecimiento vertical muestran atrofia epidérmica, mientras que la otra mitad no.

Un 58,1% de los melanomas en fase de crecimiento radial presentan atrofia epidérmica, mientras que no se observa en un 41,9%.

Asociación entre el tipo de crecimiento en los melanomas con regresión y la melanofagia.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y la melanofagia.

La densidad media de melanófagos en los melanomas con crecimiento radial es de $45,1 \pm 43,8$. La densidad media de melanófagos en los melanomas con crecimiento vertical es de $65,6 \pm 73,5$.

Asociación entre el tipo de crecimiento en los melanomas con regresión y la proliferación vascular.

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el crecimiento radial o vertical y la proliferación vascular.

La densidad media de vasos en los melanomas con crecimiento radial es de $15,8 \pm 6,0$.
La densidad media de linfocitos en los melanomas con crecimiento vertical es de $18,8 \pm 8,2$.

3.1.4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LAS VARIABLES HISTOLÓGICAS.

3.1.4.1. MELANOMA

En esta serie hemos hallado 47 melanomas con regresión sobre un total de 433 melanomas que se extirparon en un período de 8 años. Por tanto, la incidencia de melanomas con regresión ha sido de un 10,8% (IC 95%:7,9-13,8%) (**tabla 3.6**), cifra que concuerda con la de otros estudios, que estiman entre un 10 y un 35% los melanomas cutáneos primarios que muestran una regresión parcial en el examen histológico, sobre todo en la fase de crecimiento radial ^{1,2,27}.

La regresión en el melanoma se definiría por la sustitución de la lesión neoplásica por un estroma fibroso, con escasos o ningún melanocito residual, pero con melanófagos, linfocitos, y vasos neoformados. En las fases iniciales de la regresión predomina la inflamación, con presencia de numerosos linfocitos que infiltran los melanocitos neoplásicos y que también se localizan en la periferia del tumor, que lo fragmentan en pequeños nidos, con apoptosis de células tumorales. Inicialmente, la presencia de fibrosis no suele ser evidente, pero sí pueden aparecer ya melanófagos en cantidad variable. En las fases tardías, la dermis papilar se encuentra ocupada por una fibrosis evidente, fundamentalmente de tipo compacta, con distintos grados de edema, y se observa una proliferación de vasos sanguíneos perpendiculares a la superficie, y melanófagos. Por otro lado, se suele apreciar una epidermis atrófica suprayacente al área de regresión, que ha perdido su red de crestas y que contiene ocasionalmente algunos melanocitos supervivientes ^{27,80}.

A pesar de que la regresión parcial es relativamente frecuente en el melanoma, por el contrario, la regresión completa es muy rara, y tan sólo existen documentados menos de 50 casos ^{1,2,4}. En los melanomas con regresión completa descritos en la literatura, existe un claro predominio de varones (el doble que mujeres), con una edad media de 48 años. Las lesiones tenían tamaños que oscilaban entre 0,4 y 3 cm, y la mitad de los pacientes tenían supervivencias superiores a los 5 años. A pesar de que la regresión completa en el melanoma se ha considerado un factor de mal pronóstico, hay que tener en cuenta que casi todos los casos de melanomas con regresión completa descritos en la literatura corresponden a melanomas metastásicos, en los que el examen físico detallado del

paciente permitió descubrir con posterioridad el remanente de la lesión sospechosa. Cabe la posibilidad de que haya melanomas que regresen espontáneamente sin provocar metástasis, hecho que es casi imposible poder documentar. Existe un caso descrito en la literatura de un paciente con un melanoma con un índice de Breslow de 0,7 mm, que rechazó la extirpación completa del mismo, que sufrió una regresión espontánea sin evidencia de metástasis tras 4 años de seguimiento ². Nosotros también extirpamos una lesión melanocítica que mostraba en la dermatoscopia características propias de una lesión benigna, pero que experimentó una involución progresiva y homogénea, cuyo diagnóstico fue de melanoma “in situ” asociado a un nevo displásico ²⁵. Podría tratarse de melanomas que el sistema inmune consigue destruir de forma muy rápida, sin dar tiempo a que la neoplasia tenga capacidad de producir metástasis, o bien de melanomas con un comportamiento biológico poco agresivo.

Desde un punto de vista exclusivamente histológico, cuando la regresión es completa, es muy difícil determinar la naturaleza biológica de la lesión previa, y en la mayoría de ocasiones, tan sólo el desarrollo de metástasis en el seguimiento posterior del paciente permite establecer dicha distinción. A pesar de ello, en la literatura se han descrito algunas características diferenciales entre la regresión de melanomas y la de lesiones melanocíticas benignas.

En el melanoma en regresión el infiltrado linfocitario es habitualmente asimétrico y parcheado, y está constituido preferentemente por linfocitos T, con un predominio de células T CD4+ sobre CD8+ ²²²⁻²²⁵, aunque también se aprecia un número significativo de macrófagos y células de Langerhans. Se ha descrito también la presencia de células dendríticas plasmocitoides productoras de interferon tipo I, de células CXCR3+ y granzima B+, y sobreexpresión de IP10/CXCL10 inducido por interferon ^{226,227}. Los linfocitos B y las células “natural killer” están ausentes o sólo presentes de forma infrecuente.

El incremento gradual en los linfocitos infiltrantes del tumor durante la génesis del melanoma también puede reflejar un aumento en la antigenicidad de las células tumorales. Algunas de estas células son células T reguladoras (Tregs), que expresan el factor de transcripción FoxP3. Si ejecutan sus capacidades reguladoras pueden ser responsables de la inducción de inmunotolerancia, favoreciendo la progresión del melanoma ²²⁸.

Aunque existe cierta controversia en relación a la implicación pronóstica del infiltrado linfocitario en el melanoma, su presencia constituye para algunos autores un factor de buen pronóstico, particularmente cuando los infiltrados son muy densos y están presentes en la fase de crecimiento vertical del melanoma ⁹².

Por otro lado, la regresión en el melanoma suele asociarse a melanofagia intensa. De hecho, muchos autores consideran la melanosis nodular (depósito extenso de melanófagos) como un hallazgo fundamental en la regresión histológica de un melanoma ².

En cuanto a la fibrosis, en el melanoma generalmente es más compacta, difusa y eosinofílica que la que se observa en los nevos melanocíticos ²²⁹.

El hallazgo de una vascularización prominente en áreas de regresión de melanomas se ha descrito ampliamente en la literatura. Para algunos autores la vascularización tumoral se asocia de forma muy consistente con la regresión. Barnhill et al ²³⁰ demostraron que los melanomas en fase de crecimiento radial que no tenían regresión mostraron de forma significativa menos densidad de vasos que los melanomas con regresión en la misma fase de crecimiento.

3.1.4.2. NEVOS MELANOCÍTICOS

En esta serie hemos hallado 116 nevos melanocíticos con regresión sobre un total de 8898 nevos melanocíticos que se extirparon en el período 2002-2009. Por tanto, la incidencia de nevos con regresión ha sido de un 1,3% (IC 95%:1,1-1,5%) (**tabla 3.6**).

A diferencia de lo que sucede con la regresión parcial, la regresión completa de nevos melanocíticos es mucho más frecuente que la de los melanomas. Clásicamente, el halo nevo se ha considerado el paradigma de nevo melanocítico que sufre una regresión, aunque la introducción de la dermatoscopia digitalizada ha permitido identificar patrones de involución distintos al halo nevo clásico ^{26,231,232}.

Las características histopatológicas esenciales de un nevo melanocítico que ha sufrido un proceso de regresión espontánea son la sustitución de las células tumorales por un estroma fibroso, con cantidades variables de melanófagos, inflamación y neovascularización, de forma análoga a lo que sucede en el melanoma ^{1,27}.

En cuanto a las neoplasias melanocíticas benignas que no son halo nevos, la regresión se ha descrito más en nevos displásicos que en nevos comunes. Habitualmente no existe

aplanamiento de crestas interpapilares, o bien es mínimo. Se observa mínima fibrosis colágena en la dermis papilar, preferentemente de tipo laminar, y la pérdida de melanocitos se produce fundamentalmente en la región periférica, más que en la central²³³. Si se observa regresión extensa con atrofia epidérmica y fibrosis grosera no laminar, circunstancia que es posible aunque mucho menos frecuente en los nevos melanocíticos, debe descartarse un melanoma, donde estos cambios son habituales en la fase tardía. La presencia de infiltrado inflamatorio también es un hallazgo habitual en los nevos displásicos. Estos infiltrados varían desde escasos linfocitos y de localización perivascular a infiltrados densos, distribuidos a modo de banda, que ocupan la totalidad de la dermis papilar. La presencia de infiltrado difuso es más frecuente en los nevos con displasia severa que en los melanomas¹⁹⁶, circunstancia que también se corrobora en esta serie.

3.1.4.2.1. Regresión en los halo nevos

Se trata de un fenómeno que afecta al 1% de la población general, especialmente a niños y jóvenes. El halo nevo se caracteriza histológicamente por una progresiva degeneración de los melanocitos, que son destruidos por un infiltrado inflamatorio que inicialmente es muy prominente y va disminuyendo gradualmente. En el estadio final no se aprecian células névicas, y sólo hay un moderado número de células inflamatorias^{223,234}. Algunos autores dividen la regresión en el halo nevo en cuatro fases histológicas, que pueden coexistir:

- Pre-regresión: se aprecian nidos de melanocitos rodeados por una cantidad moderada de linfocitos.
- Regresión precoz: se observan melanocitos en contacto estrecho con abundantes linfocitos y presencia de apoptosis de los primeros. Se ha descrito un predominio de los linfocitos T CD8 sobre los T CD4, y no se observan prácticamente células B, macrófagos o células de Langerhans.
- Regresión tardía: se aprecian melanocitos aislados con discreta atipia en el seno del infiltrado linfocitario.
- Regresión completa: no se observan melanocitos y existe una moderada cantidad de células inflamatorias, y mínima o nula fibrosis.

En el halo nevo se genera un halo hipopigmentado alrededor de la lesión, que puede presentar un diámetro variable, lo que sugiere que la despigmentación también afecta a las células de alrededor del nevo. Al igual que sucede en el vitíligo, el halo se formaría porque existe una destrucción de melanocitos epidérmicos normales ²³⁴⁻²³⁷ (**figura 3.10**).



Figura 3.10. Se ilustran varios ejemplos de halo nevos, en los que llama la atención la variabilidad del diámetro del halo perilesional.

En el halo nevo, la lesión névica central se suele asociar con un componente inflamatorio denso de células mononucleares, mientras que el halo hipopigmentado periférico se caracteriza por un leve infiltrado o incluso por la ausencia del mismo. Este infiltrado inflamatorio se compone casi exclusivamente por linfocitos, que son predominantemente TCD8+ e histiocitos, a diferencia de lo que sucede en el melanoma, que contiene un predominio de linfocitos TCD4+ ^{27,222-225,238}. Adicionalmente las citoquinas presentes en el halo nevo también son diferentes de las presentes en los melanomas ²²². Dichas células se encuentran ocupando la dermis papilar y se puede observar cómo infiltran los nidos de células névicas provocando la degeneración de las mismas. El infiltrado es en ocasiones tan prominente que puede dificultar la distinción de las células névicas de los linfocitos que los rodean.

La evolución biológica del halo nevo se caracteriza por la desaparición de las células névicas sin desarrollo de tejido fibroso, a diferencia de los que sucede en la regresión del melanoma, en el que la desaparición de las células se acompaña de fibroplasia de la dermis papilar en la última fase ^{222,239}. Algunos autores han intentado esclarecer los motivos por los cuales se induce fibrosis en la regresión del melanoma y no en la de halo nevo. De este modo, se ha objetivado que determinadas citoquinas fibrogénicas se expresan más frecuentemente en el melanoma que en el halo nevo, mientras que la expresión de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), citoquina inhibidora de la fibrosis, se expresa de forma mucho más elevada en el halo nevo. Aunque el microentorno de citoquinas parece no justificar completamente la evolución fibrótica en el melanoma en regresión (intervienen también interacciones entre el tumor, el estroma, y el infiltrado inflamatorio), la elevada expresión de TNF- α en el halo nevo sugiere que sí desempeñaría un papel importante en la evolución no fibrótica de la lesión ^{222,239-241}.

Aunque la etiopatogenia de los halo nevos aún no ha sido plenamente esclarecida, parece que el infiltrado inflamatorio sirve como precursor de la regresión, que se produce probablemente por un mecanismo de citotoxicidad celular mediada por linfocitos T CD8. Los linfocitos T activados, al igual que anticuerpos contra componentes citoplasmáticos de melanocitos, serían los responsables de la progresiva destrucción de las células névicas, y esta respuesta inmune se mantendría hasta eliminar totalmente el estímulo antigénico que la generó ²³⁵.

El halo nevo sin halo clínico es otra variedad de nevo melanocítico que se ha descrito de forma mucho menos frecuente en la literatura. La histología de esta variedad de nevo muestra unas características que son similares a las del halo nevo convencional ²²³, con un denso infiltrado linfocitario en banda en la dermis y nidos de células névicas localizados en la porción central.

Nosotros hemos podido observar en un estudio previo que a pesar de la ausencia de halo clínico, en una minoría de casos se puede apreciar un sutil halo dermatoscópico. Este hecho, unido a que las características observadas con la dermatoscopia durante la regresión de estas lesiones son similares a las que ya se han descrito en los halo nevos ²⁴², y también a que el tiempo en que tarda en producirse la regresión es parecido, sugiere un mecanismo de involución similar al halo nevo clásico. La diferencia fundamental estaría en el grado de afectación de los melanocitos adyacentes a las células tumorales.

A diferencia de lo que sucede con los halo nevos, en los que se produce una despigmentación del nevo y de la piel perilesional, en el halo nevo sin halo no se produciría una afectación de la piel que rodea al nevo. Es de esperar, por tanto, que los antígenos que inducen el proceso de regresión se encuentren tan sólo en las células tumorales. Al igual que sucede con los halo nevos, parece que en su patogenia también están fuertemente involucrados mecanismos mediados por la inmunidad celular y humoral ²⁴³.

Los casos en los que tan sólo se aprecia halo dermatoscópico constituirían una situación intermedia, en la que sí se produciría afectación de los melanocitos epidérmicos situados alrededor del nevo, aunque de forma menos marcada de lo que sucede en los halo nevos convencionales.

Los patrones mencionados anteriormente constituirían un espectro de lesiones melanocíticas benignas que ampliaría el concepto que se tiene en la actualidad del denominado halo nevo, en las que la regresión se produciría porque el sistema inmune se dirigiría contra modificaciones antigénicas presentes en los melanocitos tumorales, con una afectación variable de los melanocitos de la piel sana adyacente al nevo ²⁶. Las diferencias fundamentales radicarían en el grado de afectación de los melanocitos peritumorales. Hipotéticamente, cuanto más estímulo antigénico similar al que inicia la respuesta inmune haya en la piel perilesional, más halo se debería generar (**figura 3.11**). Del mismo modo, también habría que considerar la posibilidad de que también existan respuestas diferentes del estroma, debidas a variaciones propias de cada individuo, que podrían actuar en algunos casos frenando la intensidad de la respuesta inmune ^{6,27,244}.

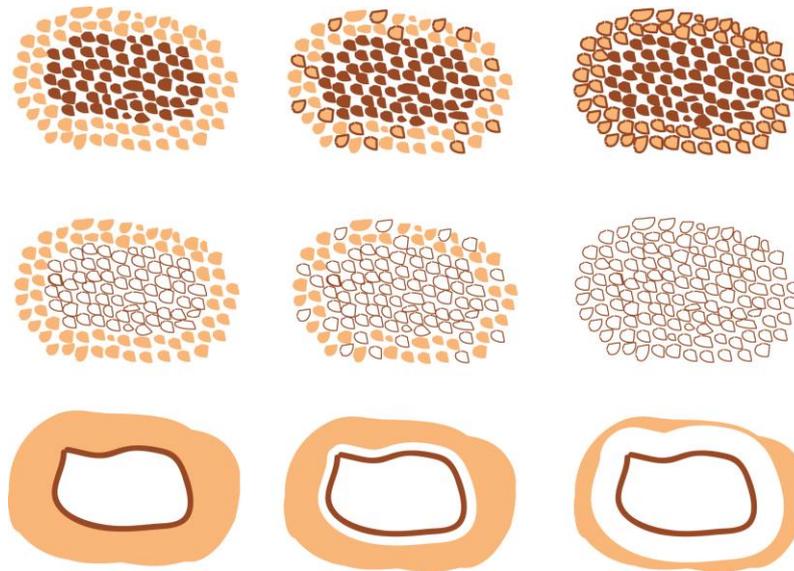


Figura 3.11. Representación esquemática de los distintos tipos de halo nevos, en los que el diámetro del halo perilesional se justificaría por el grado de afectación de los melanocitos que rodean el nevo. Izquierda: ejemplo de halo nevo sin halo clínico ni dermatoscópico, en el que no se produciría afectación de los melanocitos peritumorales. Centro: la presencia de halo nevo dermatoscópico se justificaría por la afectación de escasos melanocitos peritumorales. Derecha: en el halo nevo convencional se produciría una gran destrucción de los melanocitos que rodean al nevo.

3.1.4.2.2. Patrones de regresión de nevos melanocíticos distintos del halo nevo.

Regresión completa de nevos melanocíticos

En cuanto a las características clínicas y dermatoscópicas de los nevos melanocíticos que han sufrido una regresión completa, hemos podido identificar en un estudio previo un peculiar patrón de regresión caracterizado clínicamente por la rápida involución de los mismos, e histológicamente por una particular variedad de fibrosis, constituida por haces extraordinariamente finos de colágeno, que denominamos delicada por sus características ³⁶. En todos los casos se confirmó la ausencia completa de células névicas tras realizar múltiples cortes y técnicas inmunohistoquímicas, y se produjo una involución completa del nevo al observarlo con la dermatoscopia en un período de tiempo muy corto (unos 6 meses). La principal característica dermatoscópica fue la pérdida del patrón estructural previo, junto con la presencia de numerosos gránulos semejantes a los de pimienta, que se correlacionan histológicamente con melanofagia (**figura 3.12**). La lesión residual adoptó en la mayoría de los casos una morfología

similar a la que se aprecia en las queratosis liquenoides. En ningún caso se evidenció el desarrollo de metástasis en el seguimiento posterior de los pacientes (mínimo de 5 años).

Determinadas características sugerían que estos casos no eran halo nevos convencionales. Del mismo modo, la regresión se produjo de forma distinta a la que se observa en el melanoma. Por un lado, en ninguno de esos nevos se apreció clínicamente el desarrollo de un halo blanquecino perilesional. A diferencia de lo que sucede con los halo nevos, en los que es frecuente que los pacientes presenten varias lesiones similares, en ninguno de esos sujetos se afectaron otros nevos, y la regresión se produjo de forma muy rápida, comparado con el tiempo que tardan en despigmentar los halo nevos.

Desde un punto de vista histológico, se evidenciaron grados variables de melanofagia, infiltrado inflamatorio (moderado o leve en la mayoría de casos) y proliferación vascular, y una particular variedad de fibrosis, en muchos casos de localización subepidérmica, constituida por haces muy finos de colágeno, que no es propio de halo nevos ni melanomas. En el melanoma lo habitual es que se produzca una fibrosis de tipo compacto, y en el halo nevo no se desarrolla fibrosis en la fase final. En los nevos convencionales que sufren regresión espontánea, la fibrosis prominente no es un hallazgo tan significativo como en el melanoma en regresión, salvo en la entidad recientemente descrita como nevo esclerosante con cambios tipo pseudomelanoma, o nevo con fibroplasia florida^{200,245-248}. Estas lesiones se caracterizan porque presentan un patrón trizonal, que está constituido por una proliferación melanocítica atípica con crecimiento pagetoide, un área significativa de esclerosis dérmica conteniendo nidos irregulares de melanocitos, y tejido residual del nevo alrededor y por debajo del área cicatricial. Las alteraciones arquitecturales de esas neoplasias melanocíticas son habitualmente tan llamativas que en algunos casos inducen al diagnóstico de melanoma con regresión o melanoma con regresión sobre un nevo. A pesar de ello, no se cumplen las alteraciones citológicas esenciales para el diagnóstico de melanoma.

En relación al resto de características histopatológicas estudiadas, el infiltrado inflamatorio en estos casos fue menos intenso que el que suele apreciarse en los halo nevos, y mostró un fenotipo con un claro predominio de linfocitos T CD8, similar al que se observa en el halo nevo, y distinto al del melanoma (existe un predominio de linfocitos T CD4).

La etiopatogenia más plausible de esta variedad de regresión sería un origen inmune contra determinados antígenos que se expresarían exclusivamente por los melanocitos que constituyen el nevo afectado, y no por los de la piel adyacente ni por los de otros nevos del paciente, que inducirían una destrucción masiva y muy rápida de los mismos. El marcado predominio de linfocitos T CD8 sugeriría un mecanismo citotóxico, que sería originado por un infiltrado inflamatorio que actuaría de forma muy rápida y desaparecería también precozmente. Los melanocitos expresan de forma muy llamativa moléculas de histocompatibilidad (MHC) de clase I, lo que las hace susceptibles a ser atacadas y destruidas por linfocitos citotóxicos. Probablemente las dianas que inducen el proceso de destrucción son antígenos frente a los que el sistema inmune es normalmente tolerante, que se expresarían en la membrana de los melanocitos, y que sufrirían algún tipo de modificación que desencadenaría la respuesta inmune. Los linfocitos citotóxicos reconocerían los antígenos extraños y ejercerían sus efectos apoptóticos. El daño de la célula diana podría amplificar la respuesta inmune vía liberación de antígenos citoplasmáticos que serían normalmente inaccesibles para el sistema inmune^{30,223}. La fibrosis delicada podría explicarse por la rápida evolución del proceso de regresión y por el carácter superficial de la reparación.

Se ha sugerido que en caso de regresión completa de una lesión melanocítica, la presencia de fibrosis constituida por haces extraordinariamente finos de colágeno, unida a un infiltrado inflamatorio con predominio de linfocitos citotóxicos, apoyaría una naturaleza biológica benigna de la lesión involucionada³⁶.



Figura 3.12. Se ilustran varios ejemplos de nevos melanocíticos que experimentaron una regresión completa.

Regresión parcial de nevos melanocíticos

También se ha descrito otro grupo de lesiones en los que tan sólo existió una regresión parcial, ya fuera de forma homogénea o heterogénea. En los casos en que se produjo una despigmentación heterogénea (**figura 3.13**), el fenómeno se podría justificar por la existencia de modificaciones antigénicas que sólo afectarían a un clon o clones determinados de melanocitos, que serían los destruidos por el sistema inmune, pero no a todas las células integrantes de la lesión ²⁶. En los casos en que se produjo una despigmentación parcial homogénea (**figura 3.14**), el proceso se inició a expensas de las células situadas en la periferia, tal y como demuestra la dermatoscopia en la mayoría de casos. Quizás los melanocitos localizados en la periferia son más vulnerables al ataque del sistema inmune, los localizados en la porción central son capaces de desarrollar mecanismos de escape frente al sistema inmune, o simplemente el proceso de regresión es mucho más lento que en los demás casos ²⁶.

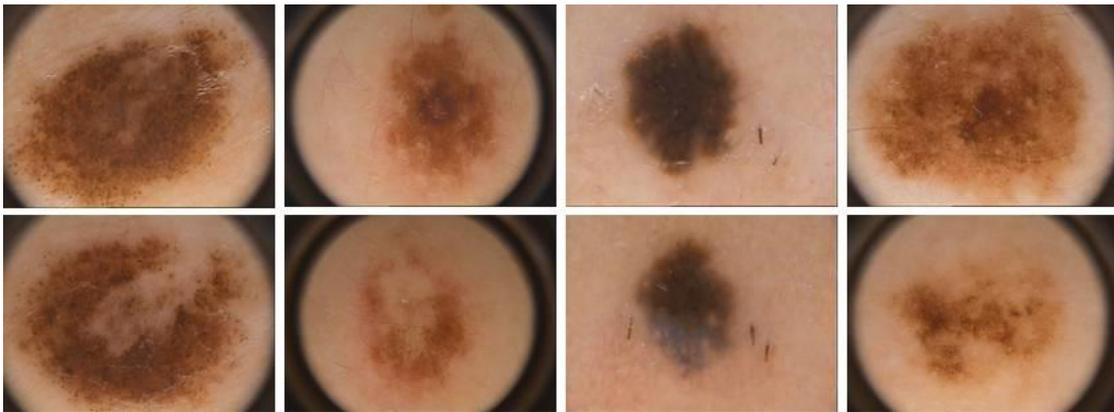


Figura 3.13. Ejemplos de regresión parcial heterogénea.

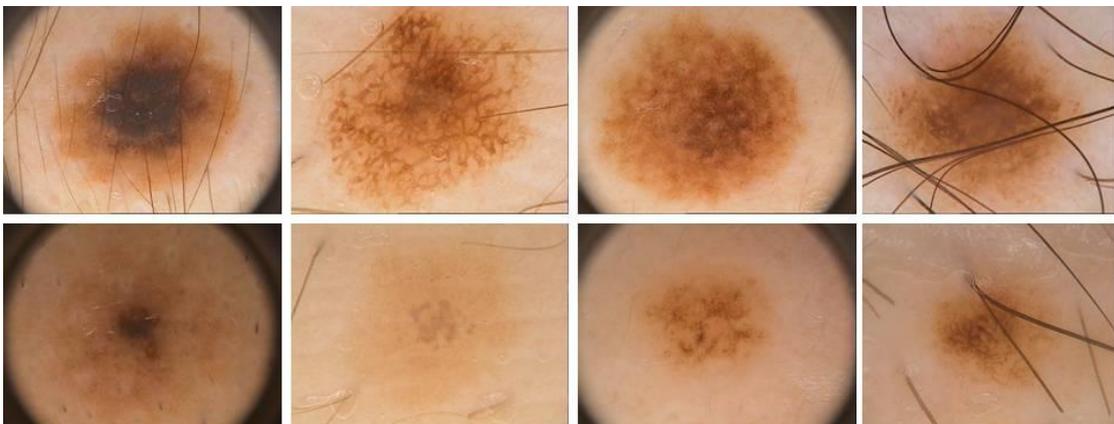


Figura 3.14. Ejemplos de regresión parcial homogénea, en los que el proceso se inició a expensas de las células situadas en la periferia.

Regresión en los nevos de Spitz

A pesar de que la presencia de infiltrado inflamatorio es un hallazgo frecuente en los nevos de Spitz, ya que se ha descrito hasta en un 70% de casos, la regresión se produce tan sólo en contadas ocasiones ^{249,250}, como sucede en esta serie, en la que sólo se ha constatado regresión en dos nevos de Spitz.

A modo de resumen, la **figura 3.15** ilustra de forma gráfica todos los tipos de regresión mencionados con anterioridad.

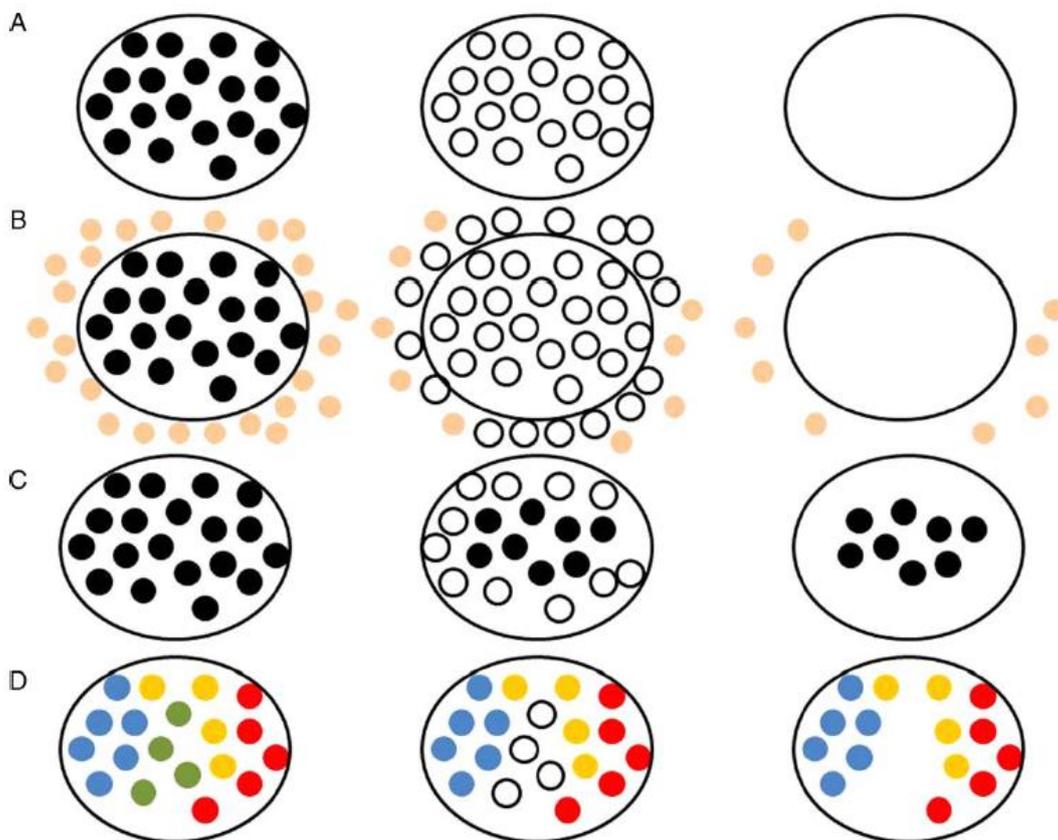


Figura 3.15. A. En esta variedad de regresión determinados antígenos de los melanocitos constituirían la diana contra la que actuaría el sistema inmune, provocando una destrucción masiva y muy rápida de los mismos. B. En el halo nevo el sistema inmune se dirigiría contra modificaciones antigénicas presentes en los melanocitos tumorales, con una afectación variable de los melanocitos y queratinocitos de la piel adyacente al nevo. C. En la regresión parcial homogénea el proceso se inicia probablemente a expensas de las células situadas en la periferia. D. En las regresiones parciales heterogéneas el fenómeno se podría justificar por la existencia de modificaciones antigénicas que sólo afectarían a un clon o clones determinados de melanocitos, que serían los destruidos por el sistema inmune. Los círculos negros pequeños indicarían las células atacadas por el sistema inmune.

3.1.4.3. DIFERENTES PARÁMETROS HISTOLÓGICOS EVALUADOS.

En función de los resultados obtenidos en esta serie, se han objetivado diversos parámetros diferenciales en la regresión de melanomas y nevos melanocíticos.

En las lesiones melanocíticas en regresión, pueden observarse cambios histológicos relacionados con el ataque inmunitario, que corresponderían a la “fase activa o destructiva”, como sería la respuesta linfocitaria, la apoptosis o la melanofagia, y cambios relacionados con la reparación del daño tisular, propias de la “fase tardía o reparativa”, como la proliferación vascular, la fibrosis, o la atrofia epidérmica^{27,80-82}.

3.1.4.3.1. FIBROSIS

Se trata de una respuesta estromal mediante la cual se induce un aumento en la síntesis de colágeno por los fibroblastos. Se cree que se desarrolla como consecuencia de la interacción de algunos factores de crecimiento secretados por los melanocitos, queratinocitos adyacentes y fibroblastos, que tienen un efecto autocrino o paracrino²⁵¹.

Las lesiones melanocíticas con regresión muestran alteraciones en el colágeno que se pueden producir como consecuencia de la respuesta que genera el estroma del huésped ante las mismas, y/o por la reparación del daño tisular inducido tras la destrucción del tejido tumoral por el sistema inmune. Como se aprecia en este estudio, en la regresión pueden apreciarse diversos tipos de cambio colágeno, y no es raro que éstos se mezclen. A pesar de que la extensión de la fibrosis no muestra diferencias relevantes entre las distintas lesiones estudiadas, las características de la misma sí han permitido establecer distinciones.

Asociaciones entre la intensidad de la fibrosis y el grado de atipia melanocitaria.

Aunque la presencia de fibrosis se considera para algunos autores un factor de mal pronóstico en el melanoma⁴⁰⁻⁵⁰, existen muy pocos estudios en lesiones melanocíticas no displásicas, y no se conocen de forma exacta las implicaciones pronósticas que la fibrosis tiene en las mismas. Además, la existencia de fibrosis también se encuentra entre los criterios diagnósticos de los nevos displásicos sin regresión, en los que se puede observar a nivel de la dermis papilar fundamentalmente dos tipos de patrones de respuesta del estroma. Por un lado, la denominada fibrosis eosinofílica concéntrica, que se produce por una condensación de un colágeno acelular, que se localiza alrededor de

las crestas epidérmicas. Por otro lado, también puede observarse la denominada fibroplasia lamelar o laminar. Se trata de otro tipo de cambio colágeno que consiste en un colágeno fino, dispuesto en capas o láminas, subyacente a las puntas de las crestas, y con fibroblastos distribuidos a lo largo de dichas láminas según un patrón lineal. Se trataría por tanto de fibras colágenas delgadas y horizontales.

Diversos estudios han establecido una relación entre el grado de fibrosis y un incremento de la atipia arquitectural y citológica en lesiones melanocíticas^{200,221,252}.

A pesar de ello, no se ha constatado que la existencia de fibrosis implique un aumento en el riesgo de desarrollar melanoma. Cesinaro et al²²¹ realizaron un estudio en el que evaluaban una serie de características clínico-patológicas en 209 nevos melanocíticos con fibrosis, y la asociación de la misma con el riesgo de desarrollar melanoma. Los nevos con fibrosis fueron más frecuentes en varones con edades muy variadas, y la mayor parte de las lesiones estaban localizadas en la espalda (52%). Histológicamente había infiltrado inflamatorio en un 67,8% de casos, parcheado en prácticamente todos, melanófagos en un 56,4%, y un patrón lentiginoso en un 31,1%. La fibrosis era tanto compacta como laminar, y en unos pocos casos se apreciaban los dos tipos.

Los nevos melanocíticos con fibrosis constituyeron un 4,2% del total de sus lesiones melanocíticas. Estos autores sugieren que aunque existe una relación estrecha entre la presencia de fibrosis en un nevo melanocítico y su atipia histológica, ésta no representaría un incremento en el riesgo de desarrollar un melanoma, aunque un 11,3% de sus pacientes tenían antecedente personal de melanoma. Por otro lado, tampoco parece estar en relación con un proceso de senescencia, ya que se observó en nevos melanocíticos pertenecientes a pacientes de todos los rangos de edad.

Asociaciones entre la intensidad y los distintos tipos de fibrosis y el grado de atipia melanocitaria.

Asociaciones de la fibrosis entre melanomas y todos los nevos displásicos.

En esta serie, no se evidencian diferencias relativas a la intensidad de la fibrosis al compararla entre melanomas y nevos displásicos. En cuanto a las características de la misma, la fibrosis laminar es mucho más frecuente en los nevos displásicos que en los melanomas (35% más; $p < 0,0001$). Por otro lado, la fibrosis compacta es más frecuente en melanomas que en nevos displásicos, al igual que la fibrosis indeterminada (23,9% más; $p = 0,004$ y 8,9% más; $p = 0,012$ respectivamente). En relación a la fibrosis delicada no hemos encontrado ningún caso en nevos displásicos ni en melanomas. Este hecho corroboraría las conclusiones que obtuvimos estudiando una serie de nevos melanocíticos que experimentaron una regresión completa en un período de tiempo muy corto, en las que la principal característica histológica fue la presencia de esta variedad de fibrosis³⁶. Por tanto, la presencia de fibrosis delicada parece constituir un marcador cuya presencia orientaría a que nos hallamos ante una lesión melanocítica con un comportamiento biológico benigno. Tampoco hay diferencias en la fibrosis de tipo esclerosis (fibroplasia florida), ni en la localización subepidérmica de la misma.

Al comparar los nevos displásicos con los melanomas de extensión superficial y con los melanomas sobre léntigo maligno, la fibrosis laminar es mucho más frecuente en los nevos displásicos. Se aprecia en un 81,8% de los nevos displásicos frente a un 51,6% en los melanomas de extensión superficial ($p = 0,001$) y un 45,5% en los melanomas de tipo léntigo maligno ($p = 0,007$), mientras que la fibrosis indeterminada es un hallazgo casi exclusivo de los melanomas, y en particular de los melanomas de extensión superficial (16,1% frente a un 1,3%; $p = 0,013$), y la fibrosis compacta es más frecuente en los pacientes con léntigo maligno (45,5% frente a un 16,9%; $p = 0,043$).

Asociaciones de la fibrosis entre melanomas y nevos con displasia severa.

No se evidenciaron diferencias en cuanto a la intensidad de la fibrosis al compararla entre melanomas y nevos con displasia severa. En cuanto a las características de la misma, la fibrosis laminar es mucho más frecuente en los nevos con displasia severa que en los melanomas (29,2% más; $p = 0,017$). Por otro lado, la fibrosis compacta no muestra diferencias estadísticamente significativas al comparar los melanomas con los

nevos con displasia severa. Estos resultados sugieren que la fibrosis compacta no permitiría distinguir con garantías un melanoma de un nevo con displasia severa, a diferencia de lo que sucede con la fibrosis laminar, que sigue predominando de forma clara en los nevos con displasia severa. La fibrosis de tipo indeterminado es un 8,8% más frecuente en melanomas que en nevos con displasia severa ($p=0,012$), y no hemos encontrado ningún caso con fibrosis delicada en nevos con displasia severa ni en melanomas. Tampoco hay diferencias entre los nevos con displasia severa y los melanomas en la fibrosis de tipo esclerosis, ni en la localización superficial de la misma. Un hallazgo muy relevante ha sido que no se ha podido establecer diferencias significativas relativas a los dos tipos principales de fibrosis (laminar o compacta) al compararlas entre los nevos con displasia severa y los melanomas de extensión superficial. Por tanto, en el caso de que se trate de un melanoma de extensión superficial, la fibrosis laminar tampoco permitiría discriminar entre estos dos tipos de lesiones.

Comparando exclusivamente el grupo de nevos con displasia severa con el de melanomas sobre léntigo maligno, tampoco se evidencian diferencias significativas en cuanto a los principales tipos de fibrosis (laminar y compacta). Por el contrario, la localización superficial de la fibrosis es un hallazgo propio del léntigo maligno melanoma (45,5% frente a un 12%; $p=0,04$).

Asociaciones entre los nevos con displasia “convencional” y los nevos con displasia “severa”.

Los hallazgos más relevantes al comparar los nevos con displasia convencional y los nevos con displasia severa fueron que la fibrosis superficial era mucho más frecuente en los nevos con displasia convencional (40,4%) que en aquellos con displasia severa (12%; $p=0,012$). Los estudios de asociación entre el resto de variables relacionadas con la fibrosis no permitieron establecer diferencias que resultaran estadísticamente significativas.

Distintos tipos de fibrosis:

Fibrosis laminar

La fibrosis de tipo laminar es mucho menos frecuente en los melanomas que en los nevos melanocíticos, a pesar de que también es la forma más frecuente de fibrosis en los melanomas. Se aprecia en el 84,6% de los nevos sin displasia y de los nevos con displasia convencional, en el 76% de los nevos con displasia severa, y tan sólo en un 46,8% de los melanomas ($p < 0,0001$).

Considerando de forma conjunta todos los nevos displásicos, la fibrosis laminar es mucho más frecuente (81,8% de casos) que la compacta (16,9%).

Como se describe posteriormente, la fibrosis laminar es la variedad de fibrosis que el análisis multivariante considera más útil para poder establecer diferencias entre nevos y melanomas. De hecho, la ausencia de fibrosis laminar sería muy orientativa de melanoma, ya que la fibrosis en el melanoma generalmente es más compacta y eosinofílica que la que se observa en los nevos melanocíticos.

En otros trabajos, la fibrosis laminar también es el patrón de respuesta estromal más frecuente, y aunque se puede ver en melanomas invasores, para algunos autores indica el punto final de la progresión de lesiones melanocíticas precursoras²⁵². Estos cambios se ven de forma más marcada en las lesiones que están en el umbral entre un nevo displásico y un melanoma precoz²⁵³.

Fibrosis compacta

La fibrosis compacta prevalece de forma clara en los melanomas, ya que se aprecia en un 40,4% de los mismos, mientras que sólo en un 15,3% de los nevos sin displasia o con displasia convencional, y en un 20% de los nevos con displasia severa, diferencias que son estadísticamente significativas ($p = 0,011$). A pesar de ello, es la segunda variedad de fibrosis más frecuente en el melanoma, superada por la fibrosis de tipo laminar, presente en un 46,8% de los mismos.

Fibrosis delicada

La fibrosis delicada es una peculiar variedad de fibroplasia constituida por haces extremadamente finos de colágeno, no ordenados, con mínima celularidad y sin signos de actividad significativa que se disponen esencialmente en la dermis papilar. Esta

forma de fibrosis no se ha descrito en el melanoma, y podría explicarse por una rápida evolución del proceso de regresión y por el carácter superficial de la reparación.

La fibrosis delicada está presente en un 1,8% de las lesiones de nuestra serie, y es un hallazgo exclusivo de los nevos melanocíticos sin displasia, que se aprecia en un 7,7% de los mismos, ya que no se ha observado en ningún melanoma ni en ningún nevo melanocítico displásico ($p=0,008$).

Fibrosis indeterminada

La fibrosis de tipo indeterminado es un hallazgo que se observa de forma casi exclusiva en los melanomas (en un 12,7% de los mismos; $p=0,006$). Cinco de los seis melanomas con fibrosis indeterminada eran melanomas de extensión superficial, y el restante era uno de tipo léntigo maligno. En cuanto a los nevos melanocíticos, tan sólo se ha documentado en un nevo con displasia severa.

Fibroplasia florida/Fibrosis de tipo esclerosis

La fibroplasia florida es una forma muy peculiar de fibrosis, poco frecuente, que se ha descrito hasta la fecha fundamentalmente en melanomas y en nevos melanocíticos atípicos. Esta variedad de fibrosis recuerda a la que se observa en los nevos recidivados o traumatizados al visualizarla con el microscopio a pequeño aumento, pero se objetiva en lesiones sobre las que no se ha realizado ninguna manipulación quirúrgica ni se conocen antecedentes traumáticos llamativos.

La fibroplasia florida o fibrosis de tipo esclerosis está presente en un 6,7% de las lesiones con regresión en esta serie. Esta variedad de fibrosis se ha observado fundamentalmente en nevos melanocíticos sin displasia (15,4%), aunque también en un 4,3% de melanomas y en un 3,9% de nevos melanocíticos displásicos. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,048$).

En el caso de los nevos melanocíticos la terminología con la que se hace mención a esta variedad de lesiones es variada e incluso confusa (nevo esclerosante con cambios tipo pseudomelanoma (NECP) ²⁴⁷, nevo con fibrosis similar a una regresión ²⁴⁶, nevo traumatizado no quirúrgicamente, o nevo con fibroplasia florida ²⁰⁰).

A pesar de que se trata de lesiones que se pueden confundir con un melanoma, la ausencia de rasgos de atipia citológica melanocítica como núcleos hiper cromáticos,

distribución irregular de la cromatina, grosor irregular de la membrana nuclear, nucléolos prominentes, actividad mitótica significativa, necrosis celular o nódulos expansivos, permite establecer el diagnóstico de lesión benigna.

Las 19 lesiones en las que se describió inicialmente esta entidad eran casos en los que el componente névico residual era profundo. Ante la ausencia de rasgos de atipia citológica melanocítica, en ningún caso se estableció el diagnóstico de melanoma a pesar de que los rasgos arquitecturales simulaban malignidad en varios de ellos. Los autores concluían el manuscrito afirmando que se trataba de lesiones con buen pronóstico, y que deberían ser consideradas nevos melanocíticos o en el peor de los casos, nevos displásicos.

Posteriormente, otros autores han recomendado una mayor cautela en la interpretación de estas lesiones, sobre todo en los casos en los que el nevo residual se limita a la porción superficial de la lesión, o en aquellos en los que la proliferación melanocítica atípica con crecimiento pagetoide sea extensa^{248,254}. De este modo, Ferrara et al²⁴⁷ diagnosticaron un 30% de melanomas en un grupo de lesiones que cumplían de forma estricta los criterios establecidos por Fabrizi como diagnósticos de esta entidad. Estos autores consideran que esos melanomas deberían denominarse como melanoma en regresión con rasgos nevoideos. Los siguientes criterios conducirían a un diagnóstico morfológico de malignidad: arquitectura irregular de los nidos de unión, demasiados melanocitos aislados en la unión dermoepidérmica, atrofia epidérmica extensa, y crecimiento pagetoide prominente^{193,194,255,256}.

Por tanto, los criterios diagnósticos propuestos por Fabrizi y colaboradores²⁴⁵ tan sólo permiten diferenciar esta variedad de nevo de los melanomas gruesos en regresión con rasgos nevoideos. Como sucede en otros tipos de neoplasias cutáneas melanocíticas, el diagnóstico diferencial entre un nevo con fibrosis y un melanoma en regresión con rasgos nevoideos es mucho más complejo en los casos en que la proliferación atípica de unión asociada al crecimiento pagetoide es extensa, y el umbral de malignidad puede estar sujeto a cierta variabilidad interobservador, al estar condicionada a la interpretación del patólogo²⁴⁸.

En cuanto a las diferencias arquitecturales entre los nevos con fibrosis prominente y el melanoma desmoplásico, el melanoma tiene una silueta infiltrativa asimétrica, y frecuentemente se extiende al tejido celular subcutáneo²⁵⁷. Por el contrario, el componente de unión en estos nevos, si está presente, muestra una configuración bien

delimitada, y el componente dérmico también está bien circunscrito y limitado a la dermis ^{200,254,258}.

Inmunofenotípicamente, las células tumorales del melanoma desmoplásico son fuertemente positivas para proteína S100 y tienen un índice de proliferación Ki-67 más elevado que el NECP, pero tienden a perder la expresión de varios antígenos de diferenciación melanocitaria, como Melan-A, tirosinasa o gp100, mientras que el nevo esclerosante usualmente presenta mínima o nula inmunotinción para Ki-67, y es positivo para Melan-A. Así mismo, la mayoría de melanomas desmoplásicos muestran una pérdida de tinción para p16 ^{258,259}.

Por otro lado, en un estudio reciente se empleó la técnica de hibridación “in situ” con fluorescencia (FISH) para intentar discernir si ésta resultaba de utilidad para diferenciar melanomas desmoplásicos de este tipo de nevos. Ninguno de los nevos con fibroplasia prominente a los que se realizó FISH mostró aberraciones cromosómicas en un rango suficiente para considerar el diagnóstico de melanoma. Por el contrario, aproximadamente un 50% de los melanomas desmoplásicos sí mostraron aberraciones cromosómicas por encima de ese rango ²⁶⁰.

La mayoría de NECP descritos en la literatura se localizan en la parte convexa de la espalda, como sucede en nuestros casos ^{200,246-248}. No hay ninguna característica específica ni clínica ni dermatoscópica que sugiera el diagnóstico de nevo esclerosante. Dermatoscopicamente suelen ser lesiones en las que coexisten áreas blanquecinas y áreas azuladas, pero indistinguibles de un nevo melanocítico con regresión convencional. La extensión dermatoscópica de la regresión tampoco se ha relacionado con la profundidad del componente névico residual ^{246,261}.

Respecto a las características de las fases precoces de la regresión, en los casos de esta serie que presentan esta forma de fibrosis tan sólo se apreció apoptosis en un 18,1% de los casos, y el infiltrado inflamatorio tampoco fue llamativo en ningún caso. Por el contrario, predominan las características propias de una fase tardía de regresión, ya que además de la fibrosis, la atrofia epidérmica se observa en un 72,7% de casos.

El origen de estas lesiones no ha sido claramente establecido. La mayoría de autores coinciden en que el principal mecanismo etiopatogénico sería la existencia de traumatismos repetidos que inducirían tanto fibrosis como hiperplasia atípica regenerativa ²⁴⁶⁻²⁴⁸. Esto se podría justificar porque la proliferación de células aisladas que se observa en la unión dermoepidérmica es similar a los cambios observados en

nevus recurrentes tras traumatismos ²⁶². La marcada predilección que tienen estos nevus por el área convexa de la espalda apoyaría también la hipótesis de que se debería a traumatismos por la fricción repetida. Por otro lado, una fibrosis tan extensa y profunda se podría explicar difícilmente por un daño provocado por exposición solar intermitente. Aunque la fibrosis prominente y la disposición en tres fases son un hallazgo frecuente en lesiones névicas que han sido traumatizadas, en ninguna de las lesiones incluidas en este estudio se documentó la existencia de antecedentes de traumatismos, reacciones inflamatorias o infecciosas, ni tratamientos previos que pudieran justificar el desarrollo de la fibrosis. Además, en la mitad de los casos la fibrosis era de tipo laminar, diferente a la que se aprecia en las cicatrices traumáticas, donde los haces de colágeno son densos y paralelos a la epidermis y se mezclan con fibroblastos. Por otro lado, el hecho de que la proliferación melanocítica rebasa la fibrosis cicatricial es un signo de sospecha de melanoma ante la recidiva de una lesión melanocítica, pero ninguno de nuestros casos corresponde a esta situación de recidiva (ni quirúrgica ni traumática).

Parece que otros mecanismos también pueden estar implicados en el proceso de génesis de esta variedad de fibroplasia. Dado que todas las lesiones de esta serie presentan regresión, con infiltrado inflamatorio, aunque escaso, y melanofagia en el examen histológico de la mayoría de las lesiones, y como este fenómeno de fibroplasia florida también se ha descrito en nevus congénitos gigantes, en los que el factor traumático justificaría con menor consistencia el desarrollo de la fibrosis, habría que contemplar también la hipótesis de una regresión mediada por un fenómeno inmunológico ^{6,11,15,223}.

Los nevus melanocíticos congénitos gigantes con esclerosis se caracterizan clínicamente por tener una consistencia muy indurada, y presentan una elevada tendencia a la involución espontánea, por lo que parece que el mecanismo que genera la fibrosis podría representar un fenómeno protector. Se ha considerado que la regresión espontánea de estos nevus se produciría por un mecanismo inmunológico que se originaría intraútero contra un clon aberrante de melanocitos, y que se prolongaría hasta la desaparición del estímulo antigénico que la generó. Del mismo modo, se considera que diferentes factores relacionados con el estroma podrían ser responsables de la intensa reacción fibrótica que se produce durante la regresión. Parece que las claves para el desarrollo de la reacción fibroblástica pueden ser una diferenciación multidireccional de melanocitos en fibroblastos adaptativos, o interacciones entre la

matriz extracelular con el tumor, que conducirían a la liberación de citocinas profibróticas que inducirían la síntesis de colágeno por los fibroblastos^{222,240,263,264}.

Por otro lado, parece que la fibroplasia florida no confiere a los melanomas un peor pronóstico, ya que en la mayoría de casos presentan un índice de Breslow inferior a 0,75mm²⁴⁷. En este sentido, los melanomas descritos en esta serie tenían índices de Breslow de 1,04 y 1,25mm, y no se han evidenciado metástasis tras 4 años de seguimiento. En el resto de lesiones se han realizado seguimientos entre 4 y 9 años sin que tampoco se hayan evidenciado incidencias.

Para algunos autores, la presencia de fibroplasia florida podría comportar un factor de riesgo adicional para desarrollar melanoma, dado que este fenómeno lo estudiaron exclusivamente en nevos displásicos²⁰⁰.

Otros, en cambio, sugieren que la presencia de fibroplasia florida no estaría determinada por factores genéticos, ni por un mayor o menor riesgo del paciente de padecer un melanoma, sino más bien parece una respuesta exagerada del estroma desencadenada por otros factores, ya que la objetivaron mayoritariamente en nevos sin displasia y en pacientes sin antecedentes de nevos displásicos ni melanoma³⁸. Por otro lado, el examen del resto de nevos extirpados a esos pacientes constató la ausencia de esa variedad de fibrosis. Este hecho apoyaría la idea de que el hallazgo aislado de fibroplasia florida no debería considerarse como un marcador de mayor riesgo de agresividad de la lesión (si no se dan otras características que sugieran malignidad), y que debería valorarse en el contexto del resto de características clinicopatológicas del paciente, hecho que apuntaban otros estudios, pero que no habían tenido en cuenta el resto de nevos de los pacientes.

Como conclusión, la fibroplasia florida consistiría en una respuesta exagerada del estroma, en cuya génesis parece desempeñar un papel importante la respuesta inmune del huésped, que no implicaría en base a nuestros resultados y a los que ya están publicados, un comportamiento biológico más agresivo de la lesión en la que está presente³⁸.

Localización subepidérmica de la fibrosis

La fibrosis con acentuación subepidérmica (fibrosis superficial) está presente en un 25,2% de las lesiones con regresión. Se aprecia en el 15,4% de los nevos sin displasia, en el 31,2% de los nevos con displasia y en un 23,4% de los melanomas, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Al desglosar los nevos displásicos en nevos con displasia convencional y nevos con displasia severa, un 14,6% de los casos en los que se aprecia fibrosis superficial en el estudio histológico corresponden a nevos melanocíticos sin displasia, un 51,2% a nevos con displasia convencional, un 7,3% a nevos con displasia severa, y un 26,8% a melanomas. Las diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,013$).

Por otro lado, la localización subepidérmica de la fibrosis podría utilizarse como una ayuda diagnóstica adicional en el diagnóstico diferencial entre un melanoma con regresión y un nevo con displasia severa y regresión, puesto que se observa en un 23,4% de melanomas y tan sólo en un 5,1% de los nevos con displasia severa.

La acentuación superficial de la fibrosis es un hallazgo muy poco frecuente (6,3%) en los melanomas que están en fase de crecimiento vertical, por lo que su presencia quizás pueda relacionarse con un mejor pronóstico de los melanomas en los que está presente.

3.1.4.3.2. INFILTRADO INFLAMATORIO

Muchas observaciones clínicas e histológicas sugieren una clara interacción entre el sistema inmune del huésped y el melanoma, que pueden favorecer tanto la progresión y la capacidad metastásica de esta neoplasia, como la regresión parcial o incluso completa de la misma ^{32,84,265,266}. La regresión en el melanoma se inicia con un infiltrado inflamatorio acompañante, y su presencia es indicativa de que se ha producido una respuesta inmunológica frente al tumor por parte del huésped, por lo que se considera el principal mecanismo implicado en la destrucción de tejido tumoral en el melanoma.

En este trabajo de tesis, los melanomas presentan un infiltrado inflamatorio más denso que los nevos melanocíticos (13,8% superior a los nevos melanocíticos sin displasia y 23,5% superior al de los nevos displásicos). También llama la atención que el infiltrado inflamatorio está constituido por un mayor número de linfocitos en los nevos sin displasia que en los nevos displásicos ($p=0,027$).

La localización intratumoral o peritumoral del infiltrado inflamatorio en esta serie es muy similar en todos los tipos de lesiones, y la disposición parcheada del mismo es la predominante en todos ellos. La presencia de infiltrado inflamatorio difuso muestra una correlación inversa con el grado de displasia de la lesión estudiada, mientras que la correlación sería directa en caso de que el infiltrado linfocitario sea parcheado.

El infiltrado inflamatorio intratumoral está presente en un 54% de las lesiones con regresión. Se aprecia en el 56,4% de los nevos sin displasia, en el 54,5% de los nevos con displasia y en un 51,1% de los melanomas, diferencias que no son estadísticamente significativas.

El infiltrado peritumoral está presente en un 94,5% de las lesiones con regresión. Se aprecia en el 92,3% de los nevos sin displasia, en el 93,5% de los nevos displásicos y en un 97,9% de los melanomas, diferencias que no son estadísticamente significativas.

Por tanto, la disposición del infiltrado linfocitario no permitiría discriminar entre melanomas, nevos displásicos y nevos sin displasia.

El infiltrado inflamatorio parcheado está presente en un 82,3% de las lesiones con regresión, y es más frecuente a medida que aumenta el grado de atipia, ya que se aprecia en el 74,4% de los nevos sin displasia, en el 83,1% de los nevos con displasia y en un 87,2% de los melanomas, diferencias que no son estadísticamente significativas.

El infiltrado inflamatorio difuso está presente en un 17,8% de las lesiones con regresión, y es menos frecuente a medida que aumenta el grado de atipia de la lesión melanocítica estudiada, ya que se aprecia en el 25,6% de los nevos sin displasia, en el 18,2% de los nevos con displasia y en un 10,6% de los melanomas, diferencias que tampoco alcanzan la significación estadística.

Por tanto, aunque el estudio estadístico no permite corroborar estas diferencias, existe una tendencia que sugiere que la presencia de infiltrado inflamatorio parcheado es más frecuente en los melanomas que en los nevos melanocíticos, mientras que el infiltrado inflamatorio difuso es más frecuente en los nevos melanocíticos que en los melanomas. En el caso del infiltrado inflamatorio difuso, esas diferencias sí son significativas si se desglosan los nevos displásicos en nevos con displasia convencional y nevos con displasia severa. De este modo, el infiltrado inflamatorio de tipo difuso es un 20,5% más frecuente en los nevos melanocíticos con displasia severa ($p=0,029$), por lo que el infiltrado difuso permitiría establecer diferencias entre los nevos con displasia severa y los nevos con displasia convencional.

Al comparar exclusivamente el grupo de nevos con displasia severa con el de melanomas sobre léntigo maligno, también se aprecia que el infiltrado inflamatorio difuso es un hallazgo propio de los nevos con displasia severa (32% frente a un 0%; $p=0,036$).

Como ya se ha mencionado, la respuesta inmune frente al melanoma, espontánea o inducida por los nuevos fármacos disponibles actualmente, tiene importantes implicaciones biológicas, y puede ser crucial en su evolución.

Los linfocitos que infiltran los tumores pueden presentar varios fenotipos. Generalmente, en el melanoma existe una respuesta de células T, y la mayoría de autores coinciden en que existe un predominio CD4⁺ ²⁶⁷. Por otro lado, también se aprecian células citotóxicas CD8⁺, que están relacionadas con una evolución clínica favorable ^{268,269}, y células T reguladoras FoxP3⁺, cuya presencia se asocia con una menor supervivencia de los pacientes ²⁷⁰⁻²⁷².

Aunque existe cierta controversia en relación a la implicación pronóstica del infiltrado linfocitario en el melanoma cutáneo primario, su presencia constituye para muchos autores un factor de buen pronóstico, particularmente cuando estos infiltrados están constituidos por células T, son muy densos y están presentes en la fase de crecimiento vertical del melanoma, ya que se han correlacionado con una supervivencia prolongada y una reducción de la incidencia de enfermedad metastásica ^{48,91,92,273-275}. Sin embargo, no existe ningún consenso objetivo en la literatura médica.

Del mismo modo, las reacciones prominentes de células T en los melanomas que metastatizan en los ganglios linfáticos son predictores de una mayor supervivencia cuando se comparan con las lesiones que no presentan infiltrados inflamatorios ²⁷⁶.

Al igual que sucede en el melanoma, se han objetivado correlaciones entre la presencia de infiltrados de células T y un aumento de la supervivencia en distintos cánceres, como el de ovario, colon, renal, pulmonar, vejiga, mama y linfomas foliculares ^{92,270}.

Por el contrario, se ha constatado que la presencia de linfocitos fuera de la fase de crecimiento vertical del melanoma, tanto si están por debajo o de forma lateral a ella, o en el contexto de la fase de crecimiento radial adyacente, no tiene significado pronóstico ²⁷⁷. Se trata de melanomas en los cuales no importa lo densos o agrupados que estén los linfocitos alrededor de la fase de crecimiento vertical si no existe una infiltración por parte de los mismos de las células tumorales. Lo mismo sucedería con los agregados de

linfocitos alrededor de los vasos, incluso si se localizan en la fase de crecimiento vertical, si no existe infiltración fuera de la región perivascular.

Los autores que analizan los infiltrados linfocitarios en el melanoma de acuerdo a los criterios propuestos por Clark et al ⁴⁸, encuentran de forma persistente una relación con el pronóstico en el caso de que los infiltrados sean abundantes. Según estos criterios, los infiltrados linfocitarios presentes en el melanoma pueden dividirse en tres categorías:

- **Abundante o “brisk”:** cuando los linfocitos están dispuestos de forma difusa entre las células tumorales, rodeándolas y separándolas. Se trata de un infiltrado difuso que abarca la totalidad de la base en la fase de crecimiento vertical.
- **No abundante o “non-brisk”:** los infiltrados están compuestos por uno o más focos de linfocitos, que pueden ocupar hasta dos tercios de la fase de crecimiento vertical. Pueden estar dispersos o situarse focalmente en la periferia del tumor. Por tanto, infiltran sólo parcialmente y no abarcan toda la base de la fase de crecimiento vertical.
- **Ausente:** si no hay linfocitos, o bien, aunque estén presentes, si no infiltran el melanoma.

Posteriormente, Busam et al ²⁷³ sugirieron facilitar la terminología por otra más intuitiva y que expresara un patrón morfológico, simplificándola en términos como difuso o focal.

Los estudios que han analizado los infiltrados linfocitarios en el melanoma sugieren que en prácticamente la mitad de los casos se constata una ausencia de infiltrado inflamatorio, y en tan sólo una minoría éste es prominente (aproximadamente en un 10%). Lo más frecuente es que exista infiltrado pero que no sea abundante ²⁷⁴. En esta serie el infiltrado es más abundante en los melanomas que en los nevos melanocíticos. Por otro lado, el infiltrado parcheado predomina en todos los tipos de lesiones, y tan sólo es difuso en un 10% de los melanomas, porcentaje menor que el que se aprecia en los nevos sin displasia (25% de casos).

En el estudio de Tuthill et al ²⁷⁴ se objetivó que los pacientes con una respuesta linfocitaria abundante tienen una supervivencia del 100% a los 5 años y del 93% a los 10 años. La supervivencia a los 10 años fue de un 58% en los casos con infiltrado no abundante y de un 55% en aquellos con ausencia de infiltrado.

Del mismo modo, Clemente et al ⁹² revisaron 285 melanomas cutáneos primarios con un índice de Breslow < 2 mm, y constataron una supervivencia del 77% y del 55% a los 5 y 10 años respectivamente en sus melanomas con infiltrado linfocitario abundante, comparada con una supervivencia del 53% y 45% si el infiltrado no era abundante, y un 37% y 27% en los casos en los que se constataba una ausencia de infiltrado, por lo que los linfocitos que infiltran el tumor constituyen un importante factor pronóstico independiente del tamaño o el grosor de la lesión.

En otro estudio, Clark et al ⁹¹ analizaron 386 pacientes, de los cuales 264 tenían un melanoma en fase de crecimiento vertical, y hallaron una supervivencia a los 8 años de un 88,5% en los casos con infiltrado abundante, de un 75% en los que el infiltrado no era abundante, y de un 59,3% en los que el infiltrado estaba ausente.

3.1.4.3.3. MELANOFAGIA

La regresión en el melanoma suele asociarse a melanofagia intensa. De hecho, muchos autores consideran la melanosí nodular (depósito extenso de melanófagos) como un hallazgo fundamental en la regresión histológica de un melanoma ^{7,278}, aunque no es un patrón exclusivo del melanoma, ya que también se aprecia en la regresión de lentigos solares y lesiones epiteliales como el carcinoma basocelular pigmentado ^{279,280}. Para algunos autores la presencia de melanófagos se ha asociado con un mejor pronóstico en el melanoma ^{273,281}.

En esta serie, la densidad de melanófagos ha sido mucho mayor en los melanomas que en los nevos melanocíticos y, a pesar de que el estudio univariante no permite demostrar que esas diferencias sean significativas, la melanofagia sí es una de las variables que el análisis multivariante ha incluido entre las más “potentes” para discriminar entre nevo y melanoma.

En los melanomas se aprecia una densidad de melanófagos un 30,8% superior a la de los nevos melanocíticos sin displasia y un 27,9% superior a la de los nevos

melanocíticos displásicos. Los nevos melanocíticos displásicos presentan una densidad de melanófagos prácticamente similar a la de los nevos melanocíticos sin displasia.

Al desglosar los nevos displásicos en nevos con displasia “convencional” y nevos con displasia “severa”, también se obtiene una densidad media de melanófagos muy superior en los melanomas (52,0) que en el resto de lesiones melanocíticas. En los nevos muestra un incremento progresivo a medida que aumenta el grado de displasia de los mismos, ya que la densidad media de melanófagos en los nevos sin displasia es 35,9, en los nevos con displasia convencional 36,9, y en los nevos con displasia severa de 38,7. La presencia de melanófagos sí se asocia con significación estadística al grupo de melanomas de extensión superficial al compararlo con los nevos displásicos ($p=0,02$).

3.1.4.3.4. PROLIFERACIÓN VASCULAR

En esta serie, los melanomas presentan una densidad de vasos mayor que los nevos melanocíticos, un 26% superior a la de los nevos melanocíticos sin displasia y un 21,6% superior a la de los nevos melanocíticos displásicos ($p=0,004$). Los nevos melanocíticos displásicos presentan una densidad de vasos ligeramente superior a la de los nevos melanocíticos sin displasia.

Al desglosar los nevos displásicos en nevos con displasia “convencional” y nevos con displasia “severa”, la densidad de vasos también muestra una correlación directa con el grado de atipia de la lesión estudiada, siendo también máxima en los melanomas ($p=0,005$), al igual que sucedía con la melanofagia. Los melanomas tienen una densidad media de 16,8 vasos, los nevos con displasia severa de 14,3, los nevos con displasia convencional de 12,6, y los nevos sin displasia de 12,4.

La presencia de vasos también se asocia significativamente al grupo de melanomas de extensión superficial al compararlos con los nevos displásicos ($p=0,011$).

La angiogénesis es un fenómeno esencial para el crecimiento tumoral y se correlaciona con el desarrollo de metástasis. Este proceso consiste en la capacidad de un tejido para formar una red vascular propia mediante el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. Durante su progresión, las células tumorales adquieren la capacidad de secretar factores angiogénicos entre los que se encuentran el VEGF y el bFGF, que actúan sobre células endoteliales vecinas para dar lugar a la formación de una nueva red de venas, arterias y

capilares. Ello permite que el tumor crezca, al asegurar la llegada de oxígeno y nutrientes.

El hallazgo de una vascularización prominente en áreas de regresión de melanomas se ha descrito ampliamente en la literatura. Para algunos autores la vascularización tumoral se asocia de forma muy consistente con la regresión. Barnhill et al ²⁸² demostraron que los melanomas en la fase de crecimiento radial que no tenían regresión mostraban de forma significativa menos densidad de vasos que los melanomas con regresión en la misma fase de crecimiento. Estos hallazgos han sugerido que la regresión puede desencadenar o estar asociada con el desarrollo de nuevos vasos, y por este motivo se ha especulado con que un incremento en el número de estructuras vasculares puede ser predictora de metástasis en los melanomas microinvasores que presentan regresión histológica.

La linfangiogénesis se considera importante para la diseminación metastásica y el pronóstico en tumores malignos. Da Costa et al ²⁸³ estudiaron si existía un aumento en la densidad de vasos linfáticos en melanomas de extensión superficial con un índice de Breslow < 1 mm, comparando melanomas con y sin regresión, áreas con y sin regresión del mismo tumor, y estadios precoces y tardíos de regresión en un mismo tumor. Encontraron un aumento de la densidad microvascular linfática en zonas de regresión en fase tardía, al compararlas con áreas del mismo tumor en las que la regresión no era evidente. Su estudio sugiere que la fase tardía de la regresión espontánea de melanomas delgados se podría relacionar con un peor pronóstico, al mostrar una densidad microvascular linfática aumentada.

Estudios experimentales sugieren que la linfangiogénesis intratumoral también ocurre en presencia de factores de crecimiento endoteliales vasculares (VEGF)-C y D. Estos factores de crecimiento pueden aumentar el desarrollo de metástasis linfáticas, probablemente debido a sus efectos en los vasos linfáticos ^{284,285}. La participación de las quimiocinas en la angiogénesis es así mismo compleja. En general, son angiogénicas las quimiocinas CXC con dominios “glu-leu-arg” (ERL), concretamente CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 y CXCL8 (todas ellas ligandos de CXCR2), así como CXCL12 (que no tiene dominios ERL). Es particularmente potente como angiogénico CXCL8, cuyos receptores CXCR1 y CXCR2 se expresan en células endoteliales. CXCL8 ejerce en buena medida su acción induciendo la producción de metaloproteinasas MMP2 y MMP9, y también del VEGF, activando este último de

forma autocrina a su receptor en las mismas células endoteliales. Por el contrario, son anti-angiogénicas CXCL4, CXCL9, CXCL10 y CXCL11 ²⁸⁶.

Por otro lado, las vénulas de células endoteliales altas (HEV) son vasos especializados presentes en ganglios linfáticos y órganos linfoides terciarios. CCL19, CCL21 y CCR7 regulan la migración de linfocitos a través de las HEV. En un estudio previo correlacionamos la densidad de HEV en melanomas primarios y metastáticos con parámetros clinicopatológicos y con la expresión de las quimiocinas CCL19 y CCL21, y su receptor CCR7. Estudiando la densidad de HEV mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo específico, MECA-79, y la expresión de quimiocinas mediante RT-PCR, se observó HEV MECA-79+ en un 55% de los melanomas, siendo la densidad mayor en los primarios que en los metastáticos. Destacaba la morfología variable de los HEV, ya que se apreciaron HEV con endotelio cúbico (C-HEV) y con endotelio aplanado (F-HEV). Se observó una correlación positiva entre la densidad de C-HEV y el infiltrado linfocitario, así como entre la densidad de F-HEV y la regresión tumoral. Más aún, los casos con predominio de C-HEV sobre F-HEV tenían niveles mayores de expresión de CCL19, CCL21 y CCR7. Los resultados apoyarían un papel protagonista de C-HEV en el reclutamiento de linfocitos en los melanomas cutáneos, mediado por las quimiocinas CCL19 y CCL21, mientras que la densidad de F-HEV mostró una fuerte correlación con la regresión tumoral. Por tanto, C-HEV y F-HEV podrían servir como indicadores en el melanoma cutáneo de regresión tumoral en fase activa o tardía respectivamente ²⁸⁷. En algunos estudios, la vascularización tumoral ha demostrado ser el determinante más importante de la supervivencia global en el análisis multivariante, superando al espesor del tumor ²⁸⁸.

También se ha constatado un aumento de la densidad vascular en la regresión de nevos melanocíticos. De este modo, en otro estudio previo relacionado con este trabajo de tesis evidenciamos que la proliferación vascular fue la única variable que demostró una asociación estadísticamente significativa con la despigmentación completa de los nevos melanocíticos ²⁶.

3.1.4.3.5. PÉRDIDA DE MELANOCITOS

En esta serie no hemos evidenciado diferencias estadísticamente significativas al asociar los distintos grados de pérdida de melanocitos con el tipo de lesión estudiada.

En cuanto a los nevos comunes (sin displasia), un 28,2% de los mismos presentan una pérdida leve, un 38,5% una pérdida moderada, un 28,2% una pérdida intensa, y en un 5,1% la pérdida es total. Los nevos displásicos muestran pérdida leve en un 45,5% de casos, moderada en un 26%, intensa en un 28,6%, y no hay pérdida total en ningún caso. Los melanomas muestran pérdida leve en un 31,9% de los casos, moderada en un 36,2%, intensa en un 31,9%, y no se observa pérdida total en ningún caso.

Al desglosar los nevos displásicos en nevos con displasia convencional y nevos con displasia severa la pérdida de melanocitos revela diferencias significativas al comparar las distintas lesiones ($p=0,029$). La pérdida leve de melanocitos permite establecer diferencias entre los nevos con displasia convencional, ya que se objetiva en el 51,9% de los mismos, y el resto de lesiones, en las que oscila entre un 25,6% y un 32%. La pérdida intensa prácticamente no muestra diferencias entre los distintos subgrupos, y la pérdida total es un hallazgo exclusivo de los nevos melanocíticos sin displasia. Esta última tan sólo se ha objetivado en 3 casos, todos ellos nevos melanocíticos sin displasia. Los hemos clasificado como nevos sin displasia porque la imagen dermatoscópica de esas lesiones era claramente sugestiva de benignidad y no se han objetivado metástasis tras un mínimo de 4 años de seguimiento.

En el melanoma hay más activación de la respuesta inmune, con más densidad de linfocitos y más apoptosis, pero sólo excepcionalmente se consigue una regresión completa del mismo ¹¹. Eso se podría justificar porque, además de los antígenos más comunes, que son los que tienen más capacidad de inducir una respuesta inmune, también se pueden generar clones de células con antígenos propios de cada melanoma concreto, que no activarían la respuesta inmune, o que desarrollarían mecanismos de evasión frente a la presión a la que son sometidas por el sistema inmunitario ²⁸⁹⁻²⁹¹.

Existen diferentes tipos de antígenos que se expresan en los melanomas y que pueden ser reconocidos por linfocitos T citotóxicos ^{53,101,102}. Como ya se ha mencionado, el grupo de antígenos que se detecta con más frecuencia en pacientes con melanoma, y que también es el más inmunogénico, está constituido por los denominados antígenos de diferenciación melanocitaria. A esta categoría pertenecen los antígenos melanosómicos MART-1/Melan-A (el más frecuente), gp100 y tirosinasa ¹⁰³. Los genes que codifican

estos antígenos, no se expresan sólo en los melanomas, sino que también están presentes en melanocitos normales ¹⁰⁵. Por otro lado, se ha demostrado que no existe un origen clonal en melanomas primarios múltiples pertenecientes a los mismos pacientes ²⁹², lo que sugiere que, además de los antígenos asociados a tumor comunes en la mayoría de melanomas y también en los nevus melanocíticos, como el MART-1 ⁷¹, otros antígenos asociados a tumores son únicos para cada tipo de melanoma primario, que son los que podrían no contribuir a un efecto inmunizante ^{289,293}.

En el caso de los nevus melanocíticos, al tratarse de células más homogéneas y sin la misma capacidad de generar mecanismos de escape, si el sistema inmune consigue destruirlas lo hace con más facilidad.

Quizás por este motivo, el tejido que repara el melanoma está constituido por un colágeno más compacto, más grosero, y la cantidad de vasos que se produce también es mayor, como consecuencia de que tanto la destrucción de las células neoplásicas como la reparación tisular son más dificultosas. Por el contrario, en los nevus predomina la fibrosis laminar o la delicada, que son mucho más sutiles, probablemente porque el organismo tiene más facilidad para destruir el tumor, y al ser menor el daño tisular es más fácil reparar el tejido dañado, por lo que también hay menos vasos.

3.1.4.3.6. APOPTOSIS

La apoptosis de células tumorales es un hallazgo propio de las fases iniciales o activas de la regresión. El porcentaje de casos en los que se objetiva un mayor grado de apoptosis es máximo en los melanomas, aunque sólo un 5,4% mayor que en los nevus con displasia severa. La densidad del infiltrado inflamatorio también es muy elevada en el melanoma, lo que justificaría esa mayor apoptosis. Por otro lado, los cuerpos apoptóticos son un excelente estímulo para el sistema inmunitario.

En cuanto a los nevus sin displasia, un 66,7% de los mismos no presentan apoptosis, un 17,9% presentan apoptosis escasa, y un 15,4% intensa. Los nevus displásicos no muestran apoptosis en un 62,3% de los casos, aunque se evidencia apoptosis escasa en un 31,2% e intensa en un 6,5%. En un 42,6% de los melanomas no hay apoptosis, en un 40,4% la apoptosis es escasa y en un 17% la apoptosis es intensa. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,048$).

Desglosando los nevos displásicos en nevos con displasia convencional y nevos con displasia severa, se objetivó apoptosis en un 57,4% de los melanomas, en un 52% de los nevos con displasia severa, en un 30,7% de los nevos con displasia convencional y en un 33,2% de los nevos sin displasia ($p=0,046$).

Por tanto, la existencia de apoptosis es un hallazgo más frecuente en los melanomas que en los nevos melanocíticos, mientras que la ausencia de apoptosis es mucho más frecuente en los nevos melanocíticos que en los melanomas. Un hallazgo llamativo de nuestros resultados es la presencia de apoptosis intensa en los nevos sin displasia, en un porcentaje prácticamente similar al de los melanomas y muy superior al de los nevos displásicos, probablemente por la inclusión de diez halo nevos.

Por otro lado, la apoptosis en los melanomas de esta serie se ha relacionado de forma directa con parámetros histopatológicos que se asocian con un peor pronóstico, como son el índice de Breslow ($p=0,004$) y la fase de crecimiento vertical ($p=0,036$).

3.1.4.3.7. ATROFIA

La atrofia es un hallazgo propio de las fases tardías de la regresión y suele apreciarse en la epidermis suprayacente al área de regresión, que está adelgazada y ha perdido su red de crestas. En este estudio, la presencia de atrofia se asocia a melanomas y nevos con displasia severa, y en las lesiones con regresión parece una herramienta muy útil para diferenciar los nevos con displasia severa (se observa en un 60% de los mismos), de los nevos con displasia convencional, en los que se aprecia en un 26,9%.

La atrofia epidérmica está presente en un 42,9% de las lesiones melanocíticas con regresión incluidas en este estudio. Se ha apreciado en el 38,5% de los nevos sin displasia, en el 37,7% de los nevos con displasia y en un 55,3% de los melanomas, aunque estas diferencias no alcanzan la significación estadística.

Al desglosar los nevos displásicos en nevos con displasia “convencional” y nevos con displasia “severa” llama la atención que el porcentaje de atrofia epidérmica es superior en los nevos con displasia severa que en los melanomas (60% y 48,9% respectivamente). Por el contrario, sólo se observa en un 38,4% de nevos sin displasia y en un 26,9% de nevos con displasia convencional ($p=0,009$). La atrofia se ha considerado para muchos autores un criterio clave para el diagnóstico de melanoma ²⁹⁴,

pero en función de estos resultados, no permitiría discriminar entre un melanoma con regresión y un nevo con displasia severa y regresión.

Al comparar de forma exclusiva los nevos con displasia convencional con nevos con displasia severa, la diferencia más remarcable se halló en la atrofia epidérmica, característica histológica que demostró una asociación muy fuerte con los nevos con displasia severa ($p=0,005$), ya que se apreciaba en un 60% de los mismos por un 26,9% en los que la displasia no era severa. Por tanto, la presencia de este hallazgo histológico apoyaría el diagnóstico de nevo con displasia severa en caso de duda diagnóstica.

En cuanto al léntigo maligno, la atrofia sería la variable que con más claridad diferencia los melanomas sobre léntigo maligno de los nevos displásicos, ya que está presente en un 90,9% de los melanomas sobre léntigo maligno y en un 37,7% de los nevos displásicos ($p=0,001$).

Por el contrario, al comparar los melanomas sobre léntigo maligno sólo con los nevos con displasia severa no se han evidenciado diferencias estadísticamente significativas en relación a la atrofia, hallazgo muy importante, dado que tratándose de melanomas sobre léntigo maligno sería de esperar que sí hubiera diferencias.

El adelgazamiento epidérmico o consunción es un hallazgo histológico que puede observarse en algunos melanomas ²⁹⁴⁻²⁹⁸. Consiste en un adelgazamiento extremo o en la desaparición de estratos celulares epidérmicos en la zona suprayacente al melanoma, con atenuación de las capas basales y suprabasales y pérdida de las redes de crestas adyacentes a las colecciones de melanocitos ²⁹⁹.

También se pueden apreciar hendiduras que separan la epidermis de la dermis, edema y telangiectasias en grado variable, aunque estos hallazgos no son imprescindibles para el diagnóstico de consunción ²⁹⁹.

La frecuencia de consunción epidérmica es variable, aunque parece un hallazgo frecuente en los melanomas ya que se ha cifrado entre un 43% y 86% ^{295,296}. Sin embargo, existen muy pocos estudios al respecto.

Hantschke et al ²⁹⁵ hallaron adelgazamiento epidérmico en 88 de 102 melanomas (86%) y en 12 de 125 nevos de Spitz (9,6%). Por otro lado, Walters et al ²⁹⁶ evidenciaron consunción en 92 de 213 melanomas (43%), en sólo 4 de 94 melanomas “in situ”/nevos con displasia severa, y en ninguno de 146 nevos benignos (114 nevos con displasia leve, 8 nevos congénitos y 24 nevos comunes).

Ohata et al ²⁹⁹ también estudiaron si la consunción se correlacionaba con otras variables clinicopatológicas de melanomas lentiginosos acrales, entre las que se encontraba la regresión, sin que hallaran diferencias estadísticamente significativas. Objetivaron consunción en 39 de 52 melanomas lentiginosos acrales invasores (75%) pero, por el contrario, no encontraron consunción en ninguno de los 130 nevos melanocíticos acrales con los que compararon los melanomas.

Por este motivo, algunos autores consideran que se podría utilizar el adelgazamiento epidérmico, con cierta prudencia, como un criterio adicional que apoyaría el diagnóstico de melanoma cuando se realiza diagnóstico diferencial entre melanoma y nevo de Spitz y/o nevo con displasia ^{294,299}.

Respecto a la etiopatogenia del adelgazamiento epidérmico, se ha postulado que puede ser consecuencia de un proceso autoinmune o inmunológico, ya que también se ha observado en algunos halo nevos (pseudoadelgazamiento epidérmico) ²⁹⁵⁻²⁹⁷. Walters et al ²⁹⁶ no encontraron relación entre el adelgazamiento epidérmico y fenómenos de regresión y/o infiltrado inflamatorio, por lo que descartaron un origen inmunológico. Otros autores también consideran que podría tratarse de un fenómeno físico, debido a la compresión producida por el crecimiento del tumor ²⁹⁵⁻²⁹⁷, si bien esto no explicaría por qué aparece consunción en algunos melanomas delgados o por qué no aparece en casi todos los melanomas gruesos.

Posiblemente el adelgazamiento epidérmico esté causado por la acción de metaloproteasas o se deba a la alteración de determinadas moléculas de adhesión, como la cadherina-E ^{296,297,300,301}.

Para algunos autores la frecuencia de consunción aumenta a medida que el grosor del melanoma también lo hace ²⁹⁶. Se ha observado un predominio de este adelgazamiento epidérmico en la zona adyacente a áreas de ulceración del melanoma ^{296,299}, así como asociado a grietas, hendiduras y áreas de despegamiento epidérmico. Por este motivo, se ha sugerido que la consunción sería un hallazgo histológico previo a la ulceración ²⁹⁴⁻²⁹⁸.

El adelgazamiento epidérmico en el melanoma se asocia además de a ulceración, a otros factores que también implican un peor pronóstico (mayor índice de Breslow, mayor número de mitosis por campo y crecimiento vertical). En otras neoplasias se ha demostrado que la presencia de elastosis solar puede representar un estroma permisivo para la progresión tumoral ³⁰².

3.1.4.4. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL HISTOLÓGICO DE LAS LESIONES CON REGRESIÓN.

El principal diagnóstico diferencial de una lesión melanocítica con regresión habría que establecerlo con la recurrencia de un nevo melanocítico tras un tratamiento incompleto, ya que los haces de colágeno también son densos y paralelos a la epidermis y se mezclan con fibroblastos.

El término pseudomelanoma se emplea para describir la recurrencia de un nevo melanocítico. Se trata de lesiones que simulan histológicamente un melanoma de extensión superficial y que se ven clínicamente como áreas de repigmentación, y ocurren típicamente tras tratamientos incompletos de nevos melanocíticos ya sea con cirugía, dermabrasión o láser³⁰³.

La recurrencia de un nevo melanocítico caracteriza histológicamente por³⁰⁴:

- Un distintivo patrón trizonal que está constituido por una proliferación melanocítica lentiginosa o juntural, un área significativa de fibrosis de aspecto cicatricial en la zona intermedia, y células névicas residuales por debajo del área cicatricial.
- Hiperpigmentación e hiperplasia melanocítica, con tecas adoptando un patrón lentiginoso o juntural. A menudo, la proliferación localizada en la unión dermoepidérmica es mayor que la que se apreciaba en el nevo original.
- Generalmente se observa un patrón citológico uniforme de células névicas, sin ninguna o con ligera atipia melanocítica, y sin figuras mitóticas o bien excepcionales en los melanocitos.
- Restricción en el área de la cicatriz del pigmento recurrente y de la proliferación melanocítica, respetando los límites del nevus original.

La inflamación también es frecuente en el área de la cicatriz (78%)³⁰⁴, y la mayoría de las lesiones presentan atrofia epidérmica (85%)²⁵⁹. En las cicatrices traumáticas, los haces de colágeno son densos y paralelos a la epidermis y se mezclan con fibroblastos. La inmensa mayoría de los nevos recurrentes se identifican con facilidad por la presencia de la totalidad de la proliferación melanocítica confinada a los límites de la

cicatriz. El hecho de que la proliferación melanocítica rebase la fibrosis cicatricial es un signo de sospecha de melanoma ante la recidiva de una lesión melanocítica, pero ninguno de nuestros casos corresponde a esta situación de recidiva, ni quirúrgica ni traumática.

Aunque la fibrosis también forma parte de los criterios diagnósticos de los nevos displásicos, en esos casos no existe sustitución de las células tumorales por la misma. Además, los dos tipos de fibrosis más frecuentes en los nevos displásicos, la fibrosis laminar y la fibrosis eosinofílica concéntrica, son diferentes al aspecto del colágeno grueso, muy denso e hialinizado, propios de la fibrosis de aspecto cicatricial ²²¹.

3.1.5. RESULTADOS DE LAS VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS.

3.1.5.1. ASOCIACIONES DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS CON LOS PARÁMETROS CLÍNICOS.

Asociación entre la edad y los marcadores inmunohistoquímicos

La **tabla 3.15** resume las asociaciones entre la edad y los distintos marcadores inmunohistoquímicos (CD4, CD8, FOXP3, CD25, granzima B y L-FAS).

	Número	Coef. Correl	Media	p	test
CD4	150	0,25		NS	Rho de Spearman
CD8	150	-0,22		NS	Rho de Spearman
FOXP3	152	0,06		NS	Rho de Spearman
CD25	152	0,15		NS	Rho de Spearman
GRANZIMA	152	0,12		NS	Rho de Spearman
L-FAS minoritario	28		46,50±18,08	NS	U de Mann-Whitney
L-FAS mayoritario	122		46,59±20,65		

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la edad y ninguno de los marcadores inmunohistoquímicos estudiados.

Asociación entre el sexo y los marcadores inmunohistoquímicos

La **tabla 3.16** resume las asociaciones entre el sexo y los distintos marcadores inmunohistoquímicos (CD4, CD8, FOXP3, CD25, granzima B y L-FAS).

	FEMENINO				MASCULINO				p
	Número	Media	Desv.típ	%	Número	Media	Desv.típ	%	
CD4	66	62,97	20,03		84	59,17	20,38		NS
CD8	66	32,18	20,09		84	35,83	20,38		NS
FOXP3	68	6,19	5,5		84	7,45	5,82		NS
CD25	68	6,36	5,17		84	8,05	5,75		NS
GRANZIMA	68	3,62	4,03		84	3,86	4,03		NS
L-FAS minoritario	13			18,8%	15			18,5%	NS
L-FAS mayoritario	56			81,2%	66			81,5%	

No hay diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y ninguno de los marcadores inmunohistoquímicos estudiados.

Asociación entre la localización de la lesión y los marcadores inmunohistoquímicos

La **tabla 3.17** muestra las asociaciones entre la localización de la lesión y los diferentes marcadores inmunohistoquímicos empleados (CD4, CD8, FOXP3, CD25, granzima B, L-FAS).

No hay diferencias estadísticamente significativas entre la localización de la lesión y ninguno de los marcadores inmunohistoquímicos evaluados.

Localización		CD4	CD8	FOXP3	CD25	GRANZIMA	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
Abdomen	Media/%	57,50	37,50	7,75	8,33	5,00	33,3%	66,7%
	N	12	12	12	12	12	4	8
	Desv.típ.	18,52	18,52	5,37	4,07	4,11		
Brazo	Media/%	61,67	34,17	7,17	8,58	5,08	15,4%	84,6%
	N	12	12	12	12	12	2	11
	Desv.típ.	17,10	17,43	6,97	4,77	6,78		
Cabeza	Media/%	62,06	32,94	8,50	7,50	5,18	23,5%	76,5%
	N	17	17	17	17	17	4	13
	Desv.típ.	15,71	15,71	4,99	6,43	4,87		
Espalda	Media/%	59,20	35,80	6,92	7,74	3,47	14,7%	85,3%
	N	71	71	72	72	72	10	58
	Desv.típ.	22,22	22,22	5,36	5,38	3,76		
Pierna	Media/%	66,07	28,93	5,20	4,80	1,80	12,5%	87,5%
	N	14	14	15	15	15	2	14
	Desv.típ.	19,62	19,62	6,83	6,73	1,69		
Torax	Media/%	63,04	31,96	6,13	6,21	3,50	25%	75%
	N	24	24	24	24	24	6	18
	Desv.típ.	20,57	20,57	6,05	5,47	2,85		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

3.1.5.2. ASOCIACIONES ENTRE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS Y EL TIPO DE LESIÓN MELANOCÍTICA.

Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y los nevos melanocíticos.

1. Grado de displasia

Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y todos los tipos de nevos melanocíticos (comunes y displásicos) (tabla 3.18).

Nevus melanocíticos		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	58,77	36,23	8,81	7,88	5,30	28,6%	38,5%
	N	57	57	57	57	57	8	47
	Desv. típ.	20,09	20,09	5,69	5,70	5,50		
Sí	Media-%	62,11	33,00	5,74	6,94	2,83	71,4%	61,5%
	N	93	93	95	95	95	20	75
	Desv. típ.	20,35	20,38	5,41	5,44	2,50		
p		NS	NS	0,000	NS	0,007		NS

Se demuestra una asociación estadísticamente significativa entre el diagnóstico de nevo melanocítico y el número de linfocitos marcados con FoxP3 ($p < 0,0001$; U de Mann-Whitney) y granzima B ($p = 0,007$; U de Mann-Whitney).

Los nevos melanocíticos muestran un 34,8% menos linfocitos marcados con FoxP3 que las lesiones que no son nevos melanocíticos (fundamentalmente melanomas).

Por otro lado, los nevos melanocíticos muestran un 46,6% menos positividad para granzima B en el infiltrado inflamatorio que las lesiones que no son nevos melanocíticos.

Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y los nevos melanocíticos no displásicos (tabla 3.19).

Nevus sin displasia		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	59,56	33,53	7,25	7,52	4,09	20,2%	79,8%
	N	117	117	118	118	118	23	91
	Desv. típ.	18,87	18,89	5,91	5,43	4,31		
Sí	Media-%	65,39	29,61	5,63	6,50	2,56	13,9%	86,1%
	N	33	33	34	34	34	5	31
	Desv. típ.	24,31	24,31	4,74	5,93	2,51		
p		NS	NS	NS	NS	0,048		NS

Se demuestra una asociación estadísticamente significativa entre el diagnóstico de nevo melanocítico sin displasia y el número de linfocitos marcados con granzima B ($p=0,048$; U de Mann-Whitney).

Los nevos melanocíticos no displásicos muestran un 37,4% menos linfocitos marcados con granzima B que las lesiones que no son nevos melanocíticos no displásicos.

Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y los nevos melanocíticos con displasia convencional (tabla 3.20).

Nevus displásicos		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	60,84	34,26	7,04	7,17	4,20	53,6%	69,7%
	N	99	99	101	101	101	15	85
	Desv. típ.	21,53	21,56	5,54	5,49	4,49		
Sí	Media-%	60,84	34,16	6,59	7,54	2,86	46,4%	30,3%
	N	51	51	51	51	51	13	37
	Desv. típ.	17,70	17,70	6,03	5,70	2,70		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa.

Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y los nevos melanocíticos con displasia severa (tabla 3.21).

Nevus con displasia severa		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	61,57	33,43	7,00	7,34	3,75	85,7%	85,2%
	N	128	128	129	129	129	24	104
	Desv. típ.	20,18	20,18	5,80	5,64	4,26		
Sí	Media-%	56,59	38,86	6,24	7,00	3,74	14,3%	14,8%
	N	22	22	23	23	23	4	18
	Desv. típ.	20,60	20,64	5,12	5,09	2,30		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa.

2. Localización del componente celular

Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y los nevos melanocíticos de unión (tabla 3.22).

Nevus de unión		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	60,09	34,91	7,01	7,31	4,04	78,6%	82,8%
	N	125	125	126	126	126	22	101
	Desv. típ.	20,31	20,31	5,64	5,62	4,27		
Sí	Media-%	64,60	30,80	6,31	7,21	2,35	21,4%	17,2%
	N	25	25	26	26	26	6	21
	Desv. típ.	19,89	20,08	6,03	5,27	1,95		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa.

Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y los nevos melanocíticos compuestos (tabla 3.23).

Nevus compuesto		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	60,45	34,68	7,62	7,60	4,36	46,4%	52,5%
	N	77	77	78	78	78	13	64
	Desv. típ.	20,44	20,47	5,93	5,40	4,89		
Sí	Media-%	61,25	33,75	6,11	6,97	3,11	53,6%	47,5%
	N	73	73	74	74	74	15	58
	Desv. típ.	20,18	20,18	5,37	5,71	2,72		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa.

Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y los nevos melanocíticos intradérmicos (tabla 3.24).

Nevus intradérmico		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	61,11	33,96	6,89	7,26	3,73	96,4%	96,7%
	N	145	145	147	147	147	27	118
	Desv. típ.	19,86	19,88	5,72	5,50	4,05		
Sí	Media-%	53,00	42,00	6,70	8,20	4,40	3,6%	3,3%
	N	5	5	5	5	5	1	4
	Desv. típ.	31,54	31,54	5,33	7,39	3,20		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa.

Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y los melanomas.

1. Tipo histológico de melanoma

Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y todos los melanomas (tabla 3.25).

Melanomas		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	61,38	33,72	6,21	7,10	2,95	78,6%	70,5%
	N	106	106	108	108	108	22	86
	Desv. típ.	20,60	20,63	5,43	5,62	2,57		
Sí	Media-%	59,55	35,45	8,55	7,77	5,70	21,4%	29,5%
	N	44	44	44	44	44	6	36
	Desv. típ.	19,55	19,55	6,05	5,39	5,90		
p		NS	NS	0,018	NS	0,019		NS

Se aprecia una asociación estadísticamente significativa entre el diagnóstico de melanoma y el número de linfocitos marcados con FoxP3 ($p=0,018$; U de Mann-Whitney) y granzima B ($p=0,019$; U de Mann-Whitney).

Los melanomas muestran un 27,3% y un 48,2% más positividad para FoxP3 y granzima B en el infiltrado linfocitario que las lesiones que no son melanomas.

Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y los tipos histológicos más frecuentes en esta serie.

- Melanomas de extensión superficial (MES) (tabla 3.26).

MES		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	61,62	33,46	6,48	7,02	3,07	82,1%	82,0%
	N	121	121	123	123	123	23	100
	Desv. típ.	19,67	19,70	5,85	5,64	2,78		
Sí	Media-%	57,59	37,41	8,62	8,45	6,62	17,9%	18,0%
	N	29	29	29	29	29	5	22
	Desv. típ.	22,58	22,58	4,70	5,03	6,55		
p		NS	NS	0,012	NS	0,012		NS

Se demuestra una asociación estadísticamente significativa entre el diagnóstico de melanoma de extensión superficial y el número de linfocitos marcados con FoxP3 ($p=0,012$; U de Mann-Whitney) y granzima B ($p=0,012$; U de Mann-Whitney).

Los melanomas de extensión superficial muestran un 24,8% más positividad para FoxP3 en el infiltrado linfocitario respecto a las lesiones que no son melanomas de extensión superficial.

Los melanomas de extensión superficial muestran un 53,6% más positividad para granzima B en el infiltrado linfocitario respecto a las lesiones que no son melanomas de extensión superficial.

- **Melanomas sobre léntigo maligno (LMM) (tabla 3.27).**

LMM		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	60,65	34,42	6,88	7,34	3,76	96,4%	91,8%
	N	139	139	141	141	141	27	112
	Desv. típ.	20,86	20,88	5,54	5,55	4,02		
Sí	Media-%	63,18	31,82	7,00	6,73	3,64	3,6%	8,2%
	N	11	11	11	11	11	1	10
	Desv. típ.	9,81	9,81	7,74	5,64	4,17		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa.

Dado que en esta serie, tras confeccionar las matrices tisulares sólo disponíamos de dos melanomas lentiginosos acrales y un melanoma nodular para realizar estudios inmunohistoquímicos, no se han realizado estudios de asociaciones.

2. Tipo de crecimiento en el melanoma

Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y el tipo de crecimiento en el melanoma (tabla 3.28).

Tipo de crecimiento melanoma		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
Radial	Media-%	57,83	37,17	8,90	8,20	4,70	10,7%	20,5%
	N	30	30	30	30	30	3	25
	Desv. típ.	19,05	19,05	5,76	5,38	4,66		
Vertical	Media-%	61,92	33,08	7,62	6,92	6,54	10,7%	8,2%
	N	13	13	13	13	13	3	10
	Desv. típ.	21,06	21,06	7,04	5,72	6,15		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa.

3. Índice de Breslow

Asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y el índice de Breslow en los melanomas.

No existe una correlación estadísticamente significativa entre el índice de Breslow y ninguno de los marcadores inmunohistoquímicos evaluados (tabla 3.29).

BRESLOW	Número	Coefficiente de correlación	p	test
CD4	44	0,083	NS	Rho de Spearman
CD8	44	-0,083	NS	Rho de Spearman
FOXP3	44	0,024	NS	Rho de Spearman
CD25	44	-0,128	NS	Rho de Spearman
GRANZIMA	44	0,192	NS	Rho de Spearman

BRESLOW	Número	Media	Desviación típica	p	test
L-Fas minoritario	6	0,45 mm	± 0,40 mm	NS	U de Mann-Whitney
L-Fas mayoritario	32	1,03 mm	±1,74 mm		

La siguiente tabla 3.30 resume el análisis descriptivo de las densidades medias o los porcentajes de células inmunomarcadas en los distintos tipos de lesiones melanocíticas estudiadas.

	n	CD4	CD8	FOXP3	CD25	GRANZIMA B	L-FAS minoritario	L-FAS mayoritario
NEVUS MELANOCÍTICOS								
No displásicos y displásicos	93	62,11	33,00	5,74	6,94	2,83	71,4%	61,5%
No displásicos	33	65,39	29,61	5,63	6,50	2,56	13,9%	86,1%
Displasia convencional	51	60,84	34,16	6,59	7,54	2,86	46,4%	30,3%
Displasia severa	22	56,59	38,86	6,24	7,00	3,74	14,3%	14,8%
Halo nevus	9	53,33	41,67	9,78	8,33	4,89	7,1%	5,7%
Nevus de Spitz	2	85,00	10,00	12,50	9,00	1,00	0%	1,6%
Regresión completa	2	40,00	55,00	6,50	7,00	2,50	0%	1,6%
Unión	25	64,60	30,80	6,31	7,21	2,35	21,4%	17,2%
Compuesto	73	61,25	33,75	6,11	6,97	3,11	53,6%	47,5%
Intradérmico	5	53,00	42,00	6,70	8,20	4,40	3,6%	3,3%
MELANOMAS								
Todos los melanomas	44	59,55	35,45	8,55	7,77	5,70	21,4%	29,5%
MES	29	57,59	37,41	8,62	8,45	6,62	17,9%	18,0%
LMM	11	63,18	31,82	7,00	6,73	3,64	3,6%	8,2%
MLA	2	72,50	22,50	13,5	0,50	3,00	0%	1,6%
MN	1	70,00	25,00	12,00	5,00	10,00	0%	0,8%
Crecimiento radial	30	57,83	37,17	8,90	8,20	4,70	10,7%	20,5%
Crecimiento vertical	13	61,92	33,08	7,62	6,92	6,54	10,7%	8,2%

Al caracterizar inmunofenotípicamente las células que constituyen los infiltrados inflamatorios existe un predominio de linfocitos TCD4+ sobre TCD8+ en todos los tipos de lesiones melanocíticas excepto en los casos con regresión completa, aunque la magnitud de las diferencias no permitiría establecer diferencias entre nevus y melanomas. A pesar de ello, se aprecia un aumento progresivo de la densidad de linfocitos TCD8+ a medida que aumenta la atipia histológica de los nevus melanocíticos, de forma opuesta a lo que sucede con el CD4, cuya expresión es menor a medida que aumenta el grado de displasia de los mismos.

Los resultados que se han obtenido en los melanomas están acorde a los de otros autores, ya que en el melanoma en regresión el infiltrado linfocitario está constituido

preferentemente por linfocitos T, con un predominio de células T CD4+ sobre CD8+
27,222-225 .

El incremento gradual en los linfocitos infiltrantes del tumor durante la génesis del melanoma también puede reflejar un aumento en la antigenicidad de las células tumorales, ya que, en esta serie, la densidad del infiltrado linfocitario es máxima en los nevos con displasia severa y en los melanomas.

Por otro lado, se observa que la inmunotinción con granzima B, proteasa que se libera por los linfocitos citotóxicos y que provoca apoptosis de la célula diana, muestra un incremento progresivo a medida que aumenta la atipia de la lesión estudiada, hallazgo que coincide con los resultados histológicos, que también relacionaban de forma directa la atipia con el grado de apoptosis.

Algunos de los leucocitos infiltrantes pueden ser células T reguladoras (Tregs), ya que expresan el factor de transcripción FoxP3. Si ejecutan sus capacidades reguladoras pueden ser responsables de la inducción de inmunotolerancia, favoreciendo la progresión del melanoma. En nuestra serie se evidencia que los melanomas son las lesiones en las que la densidad de linfocitos FoxP3+ es mayor. Por otro lado, también es más abundante en los nevos displásicos que en los nevos sin displasia.

El CD25 y el L-Fas son los marcadores que muestran menos diferencias entre los distintos tipos de lesiones melanocíticas.

3.1.5.3. ASOCIACIONES DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS CON LOS PARÁMETROS HISTOLÓGICOS.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y la fibrosis.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y la intensidad de la fibrosis (tabla 3.31).

FIBROSIS		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
Leve	Media-%	60,55	34,64	7,89	8,93	3,48	35,7%	36,9%
	N	55	55	56	56	56	10	45
	Desv. típ.	21,00	21,05	6,04	5,88	3,36		
Moderada	Media-%	60,68	34,32	6,42	6,38	3,80	46,4%	45,1%
	N	68	68	69	69	69	13	55
	Desv. típ.	19,48	19,48	5,88	5,28	4,14		
Extensa	Media-%	61,85	33,15	6,00	6,22	4,19	17,9%	18,0%
	N	27	27	27	27	27	5	22
	Desv. típ.	21,31	21,31	4,16	4,84	4,97		
p		NS	NS	NS	0,031	NS		NS

Se demuestra una asociación estadísticamente significativa entre la intensidad de la fibrosis y la inmunotinción con CD25 ($p=0,031$; Kruskal-Wallis).

Se observan diferencias llamativas en la distribución del número de células CD25+ en los casos en los que la fibrosis era leve, con un porcentaje 28,7% superior que los casos con fibrosis moderada y 30,3% superior comparado con los casos con fibrosis extensa. El resto de marcadores inmunohistoquímicos se distribuyó de forma casi equitativa en las tres intensidades de fibrosis.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y los tipos de fibrosis.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y la fibrosis laminar

FIBROSIS LAMINAR		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	62,88	32,13	6,79	5,34	4,70	42,9%	22,1%
	N	40	40	40	40	40	12	27
	Desv. típ.	16,63	16,63	5,46	4,79	4,41		
Sí	Media-%	60,10	34,99	6,92	7,99	3,41	57,1%	77,9%
	N	110	110	112	112	112	16	95
	Desv. típ.	21,43	21,45	5,80	5,65	3,83		
p		NS	NS	NS	0,009	NS		0,024

Se demuestra una asociación estadísticamente significativa entre la fibrosis laminar y la inmunotinción con CD25 ($p=0,009$; U de Mann-Whitney), y con L-Fas ($p=0,024$; Chi-cuadrado).

Se observan un 24,7% más linfocitos CD25+ en las lesiones con fibrosis laminar respecto a las que no tienen dicho tipo de fibrosis.

El porcentaje de casos con fibrosis laminar en los que la inmunotinción con L-Fas es mayoritaria es un 20,8% superior a la de aquellos en los que los linfocitos teñidos con L-Fas son minoritarios (**tabla 3.32**).

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y la fibrosis compacta

FIBROSIS COMPACTA		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	59,41	35,68	6,80	7,72	3,53	60,7%	82,0%
	N	116	116	118	118	118	17	100
	Desv. típ.	21,45	21,47	5,72	5,64	3,97		
Sí	Media-%	65,74	29,26	7,19	5,81	4,50	39,3%	18,0%
	N	34	34	34	34	34	11	22
	Desv. típ.	14,67	14,67	5,68	4,99	4,15		
p		NS	NS	NS	NS	NS		0,014

Se observa una asociación estadísticamente significativa entre la fibrosis compacta y la inmunotinción con L-Fas ($p=0,014$; Chi-cuadrado).

Los casos con fibrosis compacta e inmunotinción minoritaria para L-Fas son un 21,3% más frecuentes que aquellos con inmunotinción mayoritaria para L-Fas (**tabla 3.33**).

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y la fibrosis indeterminada

FIBROSIS INDETERMINADA		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	61,43	33,64	6,99	7,48	3,66	96,4%	95,9%
	N	144	144	146	146	146	27	117
	Desv. típ.	20,14	20,16	5,76	5,56	3,92		
Sí	Media-%	46,67	48,33	4,50	2,67	5,83	3,6%	4,1%
	N	6	6	6	6	6	1	5
	Desv. típ.	19,14	19,14	3,45	2,16	6,04		
p		NS	NS	NS	0,026	NS		NS

Se demuestra una asociación estadísticamente significativa entre la fibrosis indeterminada y la inmunotinción con CD25 ($p=0,026$; U de Mann-Whitney).

Se observan un 64,3% menos linfocitos CD25+ en las lesiones con fibrosis indeterminada respecto a las que no tienen fibrosis indeterminada (**tabla 3.34**).

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y la fibrosis delicada

FIBROSIS DELICADA		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	60,61	34,45	6,95	7,35	3,77	100%	97,5%
	N	148	148	150	150	150	28	119
	Desv. típ.	20,27	20,29	5,71	5,55	4,04		
Sí	Media-%	77,50	17,50	2,50	3,00	2,00	0%	2,5%
	N	2	2	2	2	2	0	3
	Desv. típ.	10,60	10,60	0,70	2,82	1,41		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa (**tabla 3.35**).

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y la fibrosis de tipo esclerosis.

FIBROSIS ESCLEROSIS		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	60,72	34,35	6,90	7,22	3,82	92,9%	93,4%
	N	140	140	142	142	142	26	114
	Desv. típ.	20,25	20,27	5,71	5,55	4,11		
Sí	Media-%	62,50	32,50	6,70	8,30	2,70	7,1%	6,6%
	N	10	10	10	10	10	2	8
	Desv. típ.	21,24	21,24	5,85	5,63	2,16		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa (**tabla 3.36**).

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y la localización de la fibrosis.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y la fibrosis de localización superficial.

FIBROSIS SUBEPIDÉRMICA		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	59,89	35,20	7,19	7,24	4,09	64,3%	77,0%
	N	111	111	113	113	113	18	94
	Desv. típ.	20,73	20,75	5,46	5,37	4,36		
Sí	Media-%	63,54	31,46	6,01	7,45	2,77	35,7%	23,0%
	N	39	39	39	39	39	10	28
	Desv. típ.	18,81	18,81	6,31	6,07	2,64		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa (**tabla 3.37**).

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y el infiltrado inflamatorio.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y el infiltrado inflamatorio parcheado (tabla 3.38).

INFILTRADO PARCHEADO		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	56,82	38,18	7,68	5,68	4,50	17,9%	18,9%
	N	28	28	28	28	28	5	23
	Desv. típ.	21,65	21,65	5,39	5,44	3,27		
Sí	Media-%	61,76	33,32	6,71	7,66	3,58	82,1%	81,1%
	N	122	122	124	124	124	23	99
	Desv. típ.	19,89	19,92	5,77	5,52	4,16		
p		NS	NS	NS	NS	0,031		NS

Se demuestra una asociación estadísticamente significativa entre el infiltrado inflamatorio parcheado y la inmunotinción con granzima B ($p=0,031$; U de Mann-Whitney).

Hay un 20,4% menos linfocitos granzima B+ en las lesiones con infiltrado inflamatorio parcheado respecto a aquellas que no tienen este tipo de infiltrado.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y el infiltrado inflamatorio difuso (tabla 3.39).

INFILTRADO DIFUSO		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	62,05	33,03	6,73	7,72	3,60	82,1%	81,1%
	N	122	122	124	124	124	23	99
	Desv. típ.	19,90	19,93	5,75	5,48	4,15		
Sí	Media-%	55,57	39,43	7,57	5,39	4,43	17,9%	18,9%
	N	28	28	28	28	28	5	23
	Desv. típ.	21,27	21,27	5,52	5,52	3,34		
p		NS	NS	NS	0,033	NS		NS

Se demuestra una asociación estadísticamente significativa entre el infiltrado inflamatorio difuso y la inmunotinción con CD25 ($p=0,033$; U de Mann-Whitney).

Se observan un 30,1% menos linfocitos CD25+ en las lesiones con infiltrado inflamatorio difuso respecto a las que no tienen infiltrado inflamatorio difuso.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y el infiltrado inflamatorio intratumoral (tabla 3.40).

INFILTRADO INTRATUMORAL		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	59,77	35,23	6,51	8,06	3,18	42,9%	46,7%
	N	66	66	68	68	68	12	57
	Desv. típ.	20,37	20,37	5,61	5,73	3,25		
Sí	Media-%	61,68	33,44	7,19	6,67	4,21	57,1%	53,3%
	N	84	84	84	84	84	16	65
	Desv. típ.	20,24	20,28	5,78	5,34	4,52		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y el infiltrado inflamatorio peritumoral (tabla 3.41).

INFILTRADO PERITUMORAL		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	70,56	24,44	6,11	6,89	2,11	10,7%	4,9%
	N	9	9	9	9	9	3	6
	Desv. típ.	16,66	16,66	6,25	6,77	1,26		
Sí	Media-%	60,22	34,85	6,94	7,32	3,85	89,3%	95,1%
	N	141	141	143	143	143	25	116
	Desv. típ.	20,35	20,37	5,68	5,48	4,11		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y la pérdida de melanocitos (tabla 3.42).

PÉRDIDA DE MELANOCITOS		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
Leve	Media-%	58,92	36,25	7,85	9,21	3,49	35,7%	38,5%
	N	56	56	55	57	57	10	47
	Desv. típ.	20,06	20,09	6,34	5,87	3,37		
Moderada	Media-%	64,39	30,62	6,38	5,95	3,21	21,4%	33,6%
	N	46	46	47	47	47	6	41
	Desv. Típ	17,96	17,96	5,61	5,29	3,54		
Intensa	Media-%	60,56	34,43	6,52	6,29	4,67	42,9%	27,0%
	N	46	46	46	46	46	12	33
	Desv. Típ	22,48	22,48	4,97	4,73	5,09		
Total	Media-%	40,00	55,00	6,50	7,00	2,50	0%	0,8%
	N	2	2	2	2	2	0	1
	Desv. Típ	7,07	7,07	4,94	8,48	2,12		
p		NS	NS	NS	0,006	NS		NS

Se demuestra una asociación estadísticamente significativa entre la pérdida de melanocitos y la inmunotinción con CD25 ($p=0,006$; Kruskal-Wallis).

Se observan un 35,3% más linfocitos CD25+ en las lesiones en las que la pérdida de melanocitos es leve en relación a los casos en los que es moderada, un 31,7% más en relación a los que es intensa, y un 23,9% más en relación a los que la pérdida es total.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y la apoptosis (tabla 3.43).

APOPTOSIS		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
Nula	Media-%	63,23	31,77	6,45	7,37	2,98	57,1%	57,4%
	N	86	86	86	86	86	16	70
	Desv. típ.	19,75	19,75	5,90	5,81	3,67		
Escasa	Media-%	56,28	38,94	6,56	7,06	4,47	39,3%	30,3%
	N	47	47	49	49	49	11	37
	Desv. típ.	20,46	20,48	5,07	5,19	4,34		
Intensa	Media-%	61,35	33,65	10,06	7,59	5,59	3,6%	12,3%
	N	17	17	17	17	17	1	15
	Desv. típ.	21,18	21,18	5,65	5,43	4,01		
p		NS	NS	0,038	NS	0,001		NS

Se demuestra una asociación estadísticamente significativa entre la apoptosis y la inmunotinción con FoxP3 ($p=0,038$; Kruskal-Wallis), y con granzima B ($p=0,001$; Kruskal-Wallis).

Se observa un 35,8% más células positivas para FoxP3 en las lesiones con apoptosis intensa que en aquellas con apoptosis nula, y un 34,7% superior respecto a las que tienen apoptosis escasa.

Se observa un 46,6% más células positivas para granzima B en las lesiones con apoptosis intensa en relación a las lesiones sin apoptosis, y un 20% superior respecto a las que tienen apoptosis escasa.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y la atrofia epidérmica (tabla 3.44).

ATROFIA		CD4	CD8	FOXP3	CD25	Granzima	L-Fas minoritario	L-Fas mayoritario
No	Media-%	63,39	31,61	6,42	7,15	3,31	71,4%	54,1%
	N	85	85	86	86	86	20	66
	Desv. típ.	19,71	19,71	5,65	5,62	3,26		
Sí	Media-%	57,51	37,65	7,50	7,48	4,32	28,6%	45,9%
	N	65	65	66	66	66	8	56
	Desv. típ.	20,60	20,62	5,74	5,48	4,80		
p		NS	NS	NS	NS	NS		NS

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa.

Correlaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y la densidad de melanófagos, vasos y linfocitos (tabla 3.45).

			MELANÓFAGOS	VASOS	INFILTRADO
Rho de Spearman	CD4	Coeficiente de correlación	0,038	-0,065	-0,272
		p	0,644	0,428	0,001
		N	150	150	150
	CD8	Coeficiente de correlación	-0,038	0,069	0,275
		p	0,641	0,403	0,001
		N	150	150	150
	FOXP3	Coeficiente de correlación	-0,096	0,048	0,284
		p	0,238	0,557	0,000
		N	152	152	152
	CD25	Coeficiente de correlación	-0,158	0,025	-0,038
		p	0,052	0,761	0,645
		N	152	152	152
GRANZIMA	Coeficiente de correlación	-0,140	0,048	0,451	
	p	0,085	0,556	0,000	
	N	152	152	152	

L-FAS		MELANOFAGOS	VASOS	INFILTRADO
Minoritario	Media	58,32	137,46	12,32
	N	28	28	28
	Desv. típica	42,02	137,85	5,25
Mayoritario	Media	37,94	160,26	14,38
	N	122	122	122
	Desv. típica	40,80	149,97	6,18
p		0,003	0,526	0,161

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y el número de melanófagos.

Se observa una asociación estadísticamente significativa entre el aumento del número de melanófagos y la inmunotinción minoritaria con L-Fas ($p=0,003$).

El número de melanófagos es un 34,9% superior en los casos en los que el infiltrado linfocitario presenta una inmunotinción minoritaria por L-Fas. Por tanto, los casos en los que los infiltrados linfocitarios presentan un menor número de células L-Fas positivas tienen un mayor número de melanófagos respecto a aquellos casos en los que más de la mitad de las células del infiltrado presentan marcaje para L-Fas.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y el número de vasos.

No se observa ninguna asociación estadísticamente significativa entre ninguna inmunotinción y el número de vasos.

Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y el infiltrado inflamatorio.

Se observa una correlación estadísticamente significativa entre las células marcadas con CD4, CD8, FoxP3 y granzima B con la densidad del infiltrado linfocitario.

Esta correlación es negativa ($-0,272$) con el CD4 y positiva con el resto ($0,275$ con el CD8, $0,284$ con el FoxP3, y $0,451$ con la granzima).

Por tanto, a medida que aumenta el número de linfocitos en el infiltrado disminuye el número de los mismos que son positivos para CD4.

Por el contrario, a medida que aumenta el número de linfocitos que constituyen el infiltrado también se incrementa el número de los mismos que son positivos para CD8, Fox P3, y granzima B. La correlación es muy fuerte en el caso de la granzima B ($p<0,0001$).

Las siguientes tablas resumen las asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos y los diferentes parámetros histológicos estudiados:

CD4							
		N	Media	Desv.típica	Correlación	p	Estadístico de contraste
FIBROSIS							
Intensidad							
Leve		55	60,55	21,009		NS	Kruskal-Wallis
Moderada		68	60,68	19,485			
Extensa		27	61,85	21,31			
Tipo							
Laminar	SÍ	110	60,1	21,437		NS	U de Mann-Whitney
	NO	40	62,88	16,637			
Compacta	SÍ	34	65,74	14,675		NS	U de Mann-Whitney
	NO	116	59,41	21,458			
Indeterminada	SÍ	6	46,67	19,149		NS	U de Mann-Whitney
	NO	144	61,43	20,143			
Delicada	SÍ	2	77,5	10,607		NS	U de Mann-Whitney
	NO	148	60,61	20,276			
Esclerosis	SÍ	10	62,5	21,246		NS	U de Mann-Whitney
	NO	140	60,72	20,254			
Localización							
Superficial	SÍ	39	63,54	18,81		NS	U de Mann-Whitney
	NO	111	59,89	20,733			
INFILTRADO INFLAMATORIO							
Densidad					-0,272	0,001	Rho de Spearman
Tipo							
Parcheado	SÍ	122	61,76	19,896		NS	U de Mann-Whitney
	NO	28	56,82	21,654			
Difuso	SÍ	28	55,57	21,273		NS	U de Mann-Whitney
	NO	122	62,05	19,904			
Localización							
Intratumoral	SÍ	84	61,68	20,241		NS	U de Mann-Whitney
	NO	66	59,77	20,37			
Peritumoral	SÍ	141	60,22	20,352		NS	U de Mann-Whitney
	NO	9	70,56	16,667			
MELANOFAGIA							
Densidad					0,038	NS	Rho de Spearman
PROLIFERACIÓN VASCULAR							
Densidad					-0,065	NS	Rho de Spearman
PÉRDIDA DE MELANOCITOS							
Leve		56	58,92	20,061		NS	Kruskal-Wallis
Moderada		46	64,39	17,963			
Intensa		46	60,56	22,486			
Total		2	40	7,071			
APOPTOSIS							
Ausente		86	63,23	19,759		NS	Kruskal-Wallis
Escasa		47	56,28	20,469			
Intensa		17	61,35	21,181			
ATROFIA							
Ausente		85	63,29	19,718		NS	U de Mann-Whitney
Presente		65	57,51	20,608			

Tabla 3.46. Asociaciones de la inmunotinción con CD4 y los parámetros histológicos evaluados.

CD8							
		N	Media	Desv.típica	Coef.correl.	p	Estadístico de contraste
FIBROSIS							
Intensidad							
Leve		55	34,68	21,057		NS	Kruskal-Wallis
Moderada		68	34,32	19,485			
Extensa		27	33,15	21,31			
Tipo							
Laminar	SÍ	110	34,99	21,459		NS	U de Mann-Whitney
	NO	40	32,12	16,637			
Compacta	SÍ	34	29,26	14,675		NS	U de Mann-Whitney
	NO	116	36,68	21,476			
Indeterminada	SÍ	6	48,33	19,149		NS	U de Mann-Whitney
	NO	144	33,64	20,166			
Delicada	SÍ	2	17,5	10,607		NS	U de Mann-Whitney
	NO	148	34,45	20,295			
Esclerosis	SÍ	10	62,5	21,246		NS	U de Mann-Whitney
	NO	140	60,72	20,254			
Localización							
Superficial	SÍ	39	31,46	18,81		NS	U de Mann-Whitney
	NO	111	35,2	20,754			
INFILTRADO INFLAMATORIO							
Densidad					0,275	0,001	Rho de Spearman
Tipo							
Parcheado	SÍ	122	33,32	19,924		NS	U de Mann-Whitney
	NO	28	38,18	21,654			
Difuso	SÍ	28	39,43	21,273		NS	U de Mann-Whitney
	NO	122	33,03	19,933			
Localización							
Intratumoral	SÍ	84	33,44	20,281		NS	U de Mann-Whitney
	NO	66	35,23	20,37			
Peritumoral	SÍ	141	34,85	20,37		NS	U de Mann-Whitney
	NO	9	24,44	16,667			
MELANOFAGIA							
Densidad					-0,038	NS	Rho de Spearman
PROLIFERACIÓN VASCULAR							
Densidad					0,069	NS	Rho de Spearman
PÉRDIDA DE MELANOCITOS							
Leve		56	36,25	20,096		NS	Kruskal-Wallis
Moderada		46	30,62	17,969			
Intensa		46	34,43	22,486			
Total		2	55	7,071			
APOPTOSIS							
Ausente		86	31,77	19,759		NS	Kruskal-Wallis
Escasa		47	38,94	20,482			
Intensa		17	33,65	21,181			
ATROFIA							
Ausente		85	31,77	19,718		NS	U de Mann-Whitney
Presente		65	37,65	20,626			

Tabla 3.47. Asociaciones de la inmunotinción con CD8 y los parámetros histológicos evaluados.

CD25							
		N	Media	Desv.típica	Coef.correl.	p	Estadístico de contraste
FIBROSIS							
Intensidad							
Leve		56	8,93	5,88		0,031	Kruskal-Wallis
Moderada		69	6,38	5,28			
Extensa		27	6,22	4,846			
Tipo							
Laminar	SÍ	112	7,99	5,65		0,009	U de Mann-Whitney
	NO	40	5,34	4,792			
Compacta	SÍ	34	5,81	4,991		NS	U de Mann-Whitney
	NO	118	7,72	5,645			
Indeterminada	SÍ	6	2,67	2,16		0,026	U de Mann-Whitney
	NO	146	7,48	5,564			
Delicada	SÍ	2	3	2,828		NS	U de Mann-Whitney
	NO	150	7,35	5,557			
Esclerosis	SÍ	10	8,3	5,638		NS	U de Mann-Whitney
	NO	142	7,22	5,554			
Localización							
Superficial	SÍ	39	7,45	6,079		NS	U de Mann-Whitney
	NO	113	7,24	5,379			
INFILTRADO INFLAMATORIO							
Densidad					-0,038	NS	Rho de Spearman
Tipo							
Parcheado	SÍ	124	7,66	5,526		NS	U de Mann-Whitney
	NO	28	5,68	5,444			
Difuso	SÍ	28	5,39	5,527		0,033	U de Mann-Whitney
	NO	124	7,72	5,483			
Localización							
Intratumoral	SÍ	84	6,67	5,344		NS	U de Mann-Whitney
	NO	68	8,06	5,735			
Peritumoral	SÍ	143	7,32	5,489		NS	U de Mann-Whitney
	NO	9	6,89	6,772			
MELANOFAGIA							
Densidad					-0,158	NS	Rho de Spearman
PROLIFERACIÓN VASCULAR							
Densidad					0,025	NS	Rho de Spearman
PÉRDIDA DE MELANOCITOS							
Leve		57	9,21	5,875		0,006	Kruskal-Wallis
Moderada		47	5,95	5,299			
Intensa		46	6,29	4,735			
Total		2	7	8,485			
APOPTOSIS							
Ausente		86	7,37	5,813		NS	Kruskal-Wallis
Escasa		49	7,06	5,198			
Intensa		17	7,59	5,432			
ATROFIA							
Ausente		86	7,15	5,62		NS	U de Mann-Whitney
Presente		66	7,48	5,487			

Tabla 3.48. Asociaciones de la inmunotinción con CD25 y los parámetros histológicos evaluados.

FOX P3							
		N	Media	Desv.típica	Coef.correl.	p	Estadístico de contraste
FIBROSIS							
Intensidad							
Leve		56	7,89	6,044		NS	Kruskal-Wallis
Moderada		69	6,42	5,882			
Extensa		27	6	4,163			
Tipo							
Laminar	SÍ	112	6,02	5,806		NS	U de Mann-Whitney
	NO	40	6,79	5,462			
Compacta	SÍ	34	7,19	5,686		NS	U de Mann-Whitney
	NO	118	6,8	5,725			
Indeterminada	SÍ	6	4,5	3,45		NS	U de Mann-Whitney
	NO	146	6,99	5,76			
Delicada	SÍ	2	2,5	0,707		NS	U de Mann-Whitney
	NO	150	6,95	5,715			
Esclerosis	SÍ	10	6,7	5,851		NS	U de Mann-Whitney
	NO	142	6,9	5,71			
Localización							
Superficial	SÍ	39	6,01	6,317		NS	U de Mann-Whitney
	NO	113	7,19	5,468			
INFILTRADO INFLAMATORIO							
Densidad					0,284	0,000	Rho de Spearman
Tipo							
Parcheado	SÍ	124	6,71	5,772		NS	U de Mann-Whitney
	NO	28	7,68	5,396			
Difuso	SÍ	28	7,57	5,521		NS	U de Mann-Whitney
	NO	124	6,73	5,75			
Localización							
Intratumoral	SÍ	84	7,19	5,782		NS	U de Mann-Whitney
	NO	68	6,51	5,616			
Peritumoral	SÍ	143	6,94	5,684		NS	U de Mann-Whitney
	NO	9	6,11	6,254			
MELANOFAGIA							
Densidad					-0,096	NS	Rho de Spearman
PROLIFERACIÓN VASCULAR							
Densidad					0,048	NS	Rho de Spearman
PÉRDIDA DE MELANOCITOS							
Leve		55	7,85	6,343		NS	Kruskal-Wallis
Moderada		47	6,38	5,616			
Intensa		46	6,52	4,979			
Total		2	6,5	4,949			
APOPTOSIS							
Ausente		86	6,45	5,905		0,038	Kruskal-Wallis
Escasa		49	6,56	5,078			
Intensa		17	10,06	5,651			
ATROFIA							
Ausente		86	6,42	5,654		NS	U de Mann-Whitney
Presente		66	7,5	5,745			

Tabla 3.49. Asociaciones de la inmunotinción con FoxP3 y los parámetros histológicos evaluados.

GRANZIMA B							
		N	Media	Desv.típica	Coef.correl.	p	Estadístico de contraste
FIBROSIS							
Intensidad							
Leve		56	3,48	3,368		NS	Kruskal-Wallis
Moderada		69	3,8	4,143			
Extensa		27	4,19	4,977			
Tipo							
Laminar	SÍ	112	3,41	3,838		NS	U de Mann-Whitney
	NO	40	4,7	4,416			
Compacta	SÍ	34	4,5	4,151		NS	U de Mann-Whitney
	NO	118	3,53	3,978			
Indeterminada	SÍ	6	5,83	6,047		NS	U de Mann-Whitney
	NO	146	3,66	3,926			
Delicada	SÍ	2	2	1,414		NS	U de Mann-Whitney
	NO	150	3,77	4,044			
Esclerosis	SÍ	10	2,7	2,163		NS	U de Mann-Whitney
	NO	142	3,82	4,118			
Localización							
Superficial	SÍ	39	2,77	2,64		NS	U de Mann-Whitney
	NO	113	4,09	4,36			
INFILTRADO INFLAMATORIO							
Densidad					0,415	0,000	Rho de Spearman
Tipo							
Parcheado	SÍ	124	3,58	4,167		0,031	U de Mann-Whitney
	NO	28	4,5	3,272			
Difuso	SÍ	28	4,43	3,349		NS	U de Mann-Whitney
	NO	124	3,6	4,157			
Localización							
Intratumoral	SÍ	84	4,21	4,521		NS	U de Mann-Whitney
	NO	68	3,18	3,25			
Peritumoral	SÍ	143	3,85	4,116		NS	U de Mann-Whitney
	NO	9	2,11	1,269			
MELANOFAGIA							
Densidad					-0,14	NS	Rho de Spearman
PROLIFERACIÓN VASCULAR							
Densidad					0,048	NS	Rho de Spearman
PÉRDIDA DE MELANOCITOS							
Leve		57	3,49	3,37		NS	Kruskal-Wallis
Moderada		47	3,21	3,544			
Intensa		46	4,67	5,09			
Total		2	2,5	2,121			
APOPTOSIS							
Ausente		86	2,98	3,675		0,001	Kruskal-Wallis
Escasa		49	4,47	4,34			
Intensa		17	5,59	4,017			
ATROFIA							
Ausente		86	3,31	3,269		NS	U de Mann-Whitney
Presente		66	4,32	4,801			

Tabla 3.50. Resumen de las asociaciones de la granzima B y los parámetros histológicos evaluados.

L-FAS		Total	Minoritario			Mayoritario				
		N	N	%	Media	N	%	Media	p	Estadístico de contraste
FIBROSIS										
Intensidad										
Leve		55	10	35,7		45	36,9		NS	Chi-cuadrado
Moderada		69	13	46,4		55	45,1			
Extensa		27	6	17,9		22	18			
Tipo										
Laminar	SÍ	111	16	57,1		95	77,9		0,024	Chi-cuadrado
	NO	39	12	42,9		27	22,1			
Compacta	SÍ	33	11	39,3		22	18		0,014	Chi-cuadrado
	NO	117	17	60,7		100	82			
Indeterminada	SÍ	6	1	3,6		5	4,1		NS	Chi-cuadrado
	NO	144	27	96,4		117	95,9			
Delicada	SÍ	3	0	0		3	2,5		NS	Chi-cuadrado
	NO	147	28	100		119	97,5			
Esclerosis	SÍ	10	2	7,1		8	6,6		NS	Chi-cuadrado
	NO	140	26	92,9		114	93,4			
Localización										
Superficial	SÍ	38	10	35,7		28	23		NS	Chi-cuadrado
	NO	112	18	64,3		94	77			
INFILTRADO INFLAMATORIO										
Densidad		150	28		137,46	122		160,26	NS	U de Mann-Whitney
Tipo										
Parcheado	SÍ	122	23	82,1		99	81,1		NS	Chi-cuadrado
	NO	28	5	17,9		23	18,9			
Difuso	SÍ	28	5	17,9		23	18,9		NS	Chi-cuadrado
	NO	122	23	82,1		99	81,1			
Localización										
Intratumoral	SÍ	81	16	57,1		65	53,3		NS	Chi-cuadrado
	NO	69	12	42,9		57	46,7			
Peritumoral	SÍ	141	25	89,3		116	95,1		NS	Chi-cuadrado
	NO	9	3	10,7		6	4,9			
MELANOFAGIA										
Densidad		150	28		58,32	122		37,94	0,003	U de Mann-Whitney
PROLIFERACIÓN VASCULAR										
Densidad		150	28		12,32	122		14,38	NS	U de Mann-Whitney
PÉRDIDA DE MELANOCITOS										
Leve		57	10	35,7		47	38,5		NS	Chi-cuadrado
Moderada		47	6	21,4		41	33,6			
Intensa		45	12	42,9		33	27			
Total		1	0	0		1	8			
APOPTOSIS										
Ausente		86	16	57,1		70	57,3		NS	Chi-cuadrado
Escasa		48	11	39,3		37	30,3			
Intensa		16	1	3,6		15	12,3			
ATROFIA										
Ausente		86	20	71,4		66	54,1		NS	Chi-cuadrado
Presente		64	8	28,6		56	45,9			

Tabla 3.51. Resumen de las asociaciones de la inmunotinción con ligando de Fas y los parámetros histológicos evaluados.

3.1.5.4. RESUMEN DE LOS RESULTADOS INMUNOHISTOQUÍMICOS

Tipo de lesión melanocítica:

Hallazgos estadísticamente significativos:

Al analizar las asociaciones entre los marcadores inmunohistoquímicos CD4, CD8, CD25, FoxP3, granzima B y L-Fas, y el tipo de lesión melanocítica evaluada, se evidenciaron las siguientes diferencias estadísticamente significativas:

- El aumento del número de linfocitos marcados con FoxP3 y con granzima B se asocia de forma estadísticamente significativa al diagnóstico de melanoma ($p=0,018$ y $p=0,019$ respectivamente), y de forma exclusiva, al tipo histológico de extensión superficial ($p=0,012$ ambas).
- La disminución del número de linfocitos marcados con FoxP3 y con granzima B se asocia de forma estadísticamente significativa al diagnóstico de nevo melanocítico ($p<0,0001$ y $p=0,048$ respectivamente).

Hallazgos relevantes estadísticamente no significativos

Por otro lado, también se objetivaron diversas asociaciones llamativas, a pesar de que no resultaron estadísticamente significativas:

- En los melanomas de esta serie existe un claro predominio de linfocitos CD4 respecto a los CD8 (59,55 frente a 35,45), hecho constante en todos los tipos histológicos de melanoma. Del mismo modo, la densidad de linfocitos CD4+ también es muy superior a la de CD8+ en los nevos melanocíticos (62,11 frente a 33,00). En los nevos melanocíticos se observa un incremento progresivo de la densidad de linfocitos CD4 a medida que disminuye el grado de displasia de las lesiones estudiadas (56,59 en los nevos con displasia severa, 60,84 en los nevos displásicos y 65,39 en los nevos sin displasia. En cuanto a los melanomas, la densidad es máxima en los melanomas lentiginosos acrales (72,50) y en los melanomas nodulares (70,00), aunque el número de casos de estos dos tipos de melanomas es muy reducido. Los nevos de Spitz son los que presentan una

mayor densidad de linfocitos CD4 (85,00), claramente superior al resto de lesiones melanocíticas, aunque el escaso número de casos también hace que los resultados deban interpretarse con cautela.

De forma opuesta, en los nevos melanocíticos también se observa un aumento progresivo de la densidad de linfocitos CD8 a medida que aumenta el grado de displasia de las lesiones estudiadas, siendo mínimo en los nevos sin displasia (29,61), intermedio en los nevos displásicos (34,16), y máximo en los nevos con displasia severa (38,86). Los nevos con regresión completa son los que presentan una mayor densidad de linfocitos CD8 (55,00), y de hecho, son los únicos en los que existe un predominio de linfocitos CD8 respecto a los CD4. En cuanto a los melanomas, la densidad de linfocitos CD8 es máxima en los melanomas de extensión superficial (37,41).

- FoxP3 se expresa mucho más en melanomas (8,55) que en nevos melanocíticos (5,74), y sobre todo en melanomas lentiginosos acrales (13,50) y melanomas nodulares (12,00), que clásicamente son los que tienen un peor pronóstico. Los nevos melanocíticos displásicos (6,59) y aquellos con displasia severa (6,24) presentan una mayor densidad de linfocitos FoxP3+ que los nevos sin displasia (5,63). Los nevos de Spitz son los que presentan una mayor densidad de linfocitos FoxP3+ (12,50), aunque esta serie sólo incluye dos casos.
- Los linfocitos CD25+ son más abundantes en los melanomas (7,77) que en los nevos melanocíticos (6,94). Los nevos de Spitz son los que presentan una mayor densidad de linfocitos CD25+ (9,00).
- La densidad de células positivas para granzima B es muy superior en los melanomas (5,70), en especial en los melanomas nodulares (10,00) y en los de extensión superficial (6,62), respecto a los nevos melanocíticos (2,83), en los que experimentó un aumento progresivo cuanto mayor era el grado de displasia (2,56 en los nevos sin displasia, 2,86 en los nevos displásicos y 3,74 en los nevos con displasia severa).

- El porcentaje de nevos en los que se apreció inmunotinción con L-Fas en el infiltrado inflamatorio es muy superior al de los melanomas. Existe un gradiente decreciente de expresión de L-Fas a medida que aumenta el grado de displasia de las lesiones estudiadas. Los halo nevos son los que presentan una mayor densidad de linfocitos L-Fas positivos. Dentro de los melanomas, las células marcadas con L-Fas prevalecen con claridad en los de extensión superficial respecto al resto de tipos histológicos.

Los parámetros histológicos que han demostrado asociaciones llamativas han sido los siguientes:

Fibrosis:

- El aumento del número de linfocitos marcados con CD25 se asocia de forma estadísticamente significativa a la fibrosis leve y a la fibrosis laminar.
- La fibrosis laminar se asocia de forma estadísticamente significativa a las lesiones en las que los linfocitos se tiñen de forma mayoritaria con L-Fas.
- La fibrosis compacta se asocia de forma estadísticamente significativa a las lesiones en las que los linfocitos se tiñen minoritariamente con L-Fas.

Infiltrado inflamatorio:

- Un menor número de linfocitos marcados con granzima B se asocia de forma estadísticamente significativa al infiltrado linfocitario parcheado. Este hallazgo se ve corroborado con el hecho de que un mayor número de linfocitos marcados con granzima B también mostró una tendencia de asociación al infiltrado linfocitario difuso, aunque no fue estadísticamente significativa ($p=0,055$).
- La disminución del número de linfocitos marcados con CD25 se asocia de forma estadísticamente significativa al infiltrado linfocitario difuso. Este hallazgo se ve corroborado con el hecho de que el aumento del número de linfocitos marcados con CD25 también mostró una tendencia de asociación al infiltrado linfocitario parcheado, aunque no fue estadísticamente significativa ($p=0,075$).

Pérdida de melanocitos:

- El aumento del número de linfocitos marcados con CD25 se asocia de forma estadísticamente significativa con la pérdida leve de melanocitos.

Apoptosis:

- El aumento del número de linfocitos marcados con FoxP3 se asocia de forma estadísticamente significativa con la apoptosis intensa.
- El aumento de linfocitos marcados con granzima B se asocia de forma estadísticamente significativa al aumento del grado de apoptosis.

3.1.6. DISCUSIÓN DE LOS PARÁMETROS INMUNOHISTOQUÍMICOS

3.1.6.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS INFILTRADOS LINFOCITARIOS EN LAS LESIONES MELANOCÍTICAS.

Como se aprecia en los resultados histológicos de esta serie de lesiones melanocíticas con regresión, la densidad de linfocitos es máxima en los melanomas. En cuanto a su caracterización fenotípica, se ha constatado que los principales componentes de los infiltrados linfocitarios que infiltran el melanoma son los linfocitos T colaboradores CD4+ y los citotóxicos CD8+. Coincidiendo con la mayoría de estudios, en esta serie también existe un predominio de linfocitos TCD4+ sobre TCD8+ ^{27,222-225,238}. Del mismo modo, también se aprecia un predominio de linfocitos TCD4+ en todos los tipos de lesiones melanocíticas que no son melanomas, que no permitiría discriminar entre nevos y melanomas. Dentro de los nevos melanocíticos existe un aumento progresivo de la densidad de linfocitos TCD4+ a medida que disminuye su atipia histológica, de forma opuesta a lo que sucede con el CD8, ya que se observa un incremento progresivo de la densidad de linfocitos TCD8+ a medida que aumenta su grado de displasia.

Por otro lado, se observa una correlación negativa (-0,272), estadísticamente significativa (p=0,001), entre un aumento en el número de linfocitos CD4+ y la densidad de linfocitos, de modo que cuanto mayor es el número de linfocitos que constituyen el infiltrado inflamatorio, menor es el número de los mismos que son positivos para CD4. También se constata una correlación positiva (0,275), estadísticamente significativa (p=0,001), entre un aumento en el número de linfocitos CD8+ y la densidad de linfocitos, de modo que cuanto mayor es el número de linfocitos que constituyen el infiltrado inflamatorio, mayor es el número de los mismos que son CD8 positivos. Por tanto, a mayor número de linfocitos, más probabilidad de que ese incremento sea para producir una respuesta citotóxica.

También se observa una correlación positiva estadísticamente significativa entre las células marcadas con FoxP3 (0,284) y granzima B (0,451) con la densidad del infiltrado linfocitario. Por tanto, a medida que aumenta el número de linfocitos que constituyen el infiltrado también se incrementa el número de los mismos que son positivos para FoxP3, y granzima B. La correlación es muy fuerte en el caso de la granzima B (p<0,0001).

En cuanto a la asociación de los marcadores inmunohistoquímicos con los distintos tipos de lesiones melanocíticas, un aumento del número de linfocitos marcados con FoxP3 y con granzima B se asocia de forma estadísticamente significativa al diagnóstico de melanoma, mientras que la disminución del número de linfocitos marcados con FoxP3 y con granzima B se asocia de forma estadísticamente significativa al diagnóstico de nevo melanocítico. Por tanto, se llega a la misma conclusión por dos vías distintas.

Existen evidencias sustanciales que implican a la participación del sistema inmune en la patogénesis del cáncer, ya que se ha constatado su contribución tanto a la progresión como a la inhibición del crecimiento tumoral. La capacidad de las células tumorales para evitar la vigilancia inmune representa un paso crítico en la progresión tumoral ³⁰⁵. Se ha sugerido que el impacto clínico de la respuesta inmune antitumoral se decide esencialmente en el lugar donde asienta el tumor, donde las condiciones microambientales dictan el estado funcional de las células T ³⁰⁶. Se ha propuesto que los linfocitos T CD4+ juegan un papel crucial en el establecimiento y mantenimiento de los linfocitos T CD8+ específicos en los infiltrados tumorales ^{307,308}.

La respuesta efectora principal se encuentra dirigida a la eliminación de células infectadas por virus o células cancerosas. Los linfocitos T citotóxicos reconocen péptidos unidos a moléculas de histocompatibilidad de clase I, y tras su activación, se expanden gracias a la IL-2 secretada por los linfocitos Th1, aumentando de ésta manera el número de células efectoras contra el antígeno. Una vez activados, son capaces de inducir apoptosis de la célula diana.

Como ya se ha mencionado anteriormente, existe evidencia acumulada que establece una asociación estrecha entre las células T citotóxicas CD8+ y una evolución clínica favorable en diversos tipos de cánceres. De forma opuesta, la presencia en los tumores de elementos reguladores inmunes negativos, como las células T FoxP3+ (Tregs) o las moléculas coestimuladoras PD-1/PD-L1, se asocia con una supervivencia inferior de los pacientes ²²⁸.

Como se constata en los resultados, la existencia de infiltrados linfocitarios tumorales es una constante en todo el espectro de lesiones melanocíticas con regresión, y se encuentran ubicados tanto dentro del espesor del tumor como en su periferia.

Algunos estudios que han tratado de caracterizar los infiltrados linfocitarios, además de en melanomas, en nevos displásicos y nevos convencionales, demostraron que los infiltrados linfocitarios fueron muy escasos o casi ausentes en los nevos benignos, y elevados en nevos displásicos y en la mayoría de melanomas en fase de crecimiento radial. En los melanomas en fase de crecimiento vertical y en las metástasis de melanoma, los infiltrados linfocitarios también eran reducidos ³⁰⁹. Estos hallazgos sugerirían que se produciría una activación precoz de la respuesta inmune, que alcanzaría su apogeo en las fases iniciales del desarrollo del melanoma, con la finalidad de intentar frenar la progresión del mismo.

Aunque la evaluación de los infiltrados linfocitarios tumorales parece estar influida por la variabilidad interobservador, algunos autores han sugerido que además de la densidad, su patrón de distribución también constituye un parámetro histológico con valor pronóstico en el melanoma.

La presencia de infiltrados intratumorales densos de células T en la fase de crecimiento vertical de melanomas primarios se ha correlacionado de forma estrecha con una reducción de la incidencia de enfermedad metastásica, y por tanto con un aumento de la supervivencia ^{48,92}. En contraposición, los infiltrados linfocitarios no tienen valor pronóstico en la fase de crecimiento radial.

Del mismo modo, se ha demostrado que los infiltrados prominentes de células T en los melanomas que metastatizan en los ganglios linfáticos son predictores de una mayor supervivencia, al compararlos con melanomas que no presentan infiltrados inflamatorios ³¹⁰.

Debido a que las células tumorales son inherentemente células autólogas y su inmunogenicidad es muy débil cuando se compara con la de los patógenos que invaden al organismo, las células neoplásicas pueden evadir la inmunovigilancia y continuar proliferando ^{311,312}. Además, es conocido que varios factores solubles secretados por las células tumorales inducen fallos en la respuesta inmune del huésped ³¹³.

Otro de los mecanismos adoptados por los tumores para destruir la vigilancia del sistema inmune consiste en contraatacar a los infiltrados linfocitarios tumorales, ya que las células tumorales también expresan ligandos especiales que inducen apoptosis de los infiltrados linfocitarios tumorales en el microambiente tumoral.

Por otro lado, existen una serie de áreas denominadas de privilegio inmune en las cuales las células tumorales no se reconocen como peligrosas y pueden continuar proliferando.

También se ha demostrado que los infiltrados linfocitarios tumorales poseen defectos de transducción de señal, que los hacen ineficientes o inducen su apoptosis^{314,315}.

3.1.6.1.1. LINFOCITOS T REGULADORES

Linfocitos T reguladores (Tregs) CD4+CD25+FoxP3+

Dentro del maremagno de células encargadas de la regulación del sistema inmune, las que más destacan, por ser las más estudiadas, son una subpoblación de linfocitos T CD4+ que expresan de forma constitutiva altas concentraciones de la cadena α del receptor de alta afinidad de la IL-2, el CD25, y que son denominadas genéricamente como células T reguladoras (Tregs) (CD4+CD25^{high}). La mayoría de los linfocitos T CD4+ quiescentes son constitutivamente CD25 negativos, y sólo expresan este marcador (en concentración muy baja y de forma transitoria) en cuanto se activan tras el reconocimiento del antígeno (CD4+CD25^{low})³¹⁶. Por tanto, si bien es cierto que todos los linfocitos T que se han activado recientemente expresan CD25, los linfocitos Treg son los únicos que lo hacen cuando son vírgenes. Las células Tregs representan un subtipo de células inmunes efectoras, descritas por primera vez por Sakaguchi et al³¹⁷ en 1995, que desempeñan un papel esencial en la homeostasis inmune³¹⁸⁻³²⁵. Su función primaria consiste en regular la función y proliferación de células T, por lo que son esenciales para el control de las respuestas inmunes, ya que inhiben las células T autoreactivas que pueden haber escapado del timo, y regulan por tanto el mantenimiento de la inmunotolerancia^{318,326-328}. El CD25 es una molécula indispensable en la generación y mantenimiento de las células Tregs, y por este motivo, constituye un excelente marcador funcional de la población Treg.

En la actualidad, se han descrito distintos tipos de Tregs, que se subdividen en base a la diferente expresión de marcadores en la superficie de las células, producción de citocinas y mecanismo de acción.

Células CD4+ reguladoras naturales e inducibles

Las Tregs constituyen entre el 5-10% del total de linfocitos T CD4+ que se encuentran en la sangre periférica y en tejidos linfoides. Se trata de una subpoblación de células T

CD4+, que se desarrolla de forma natural en el timo o también en la periferia en presencia del antígeno y de TGF- β ^{228,316,318,329,330}.

- La mayoría de las células Treg se originan en el timo de forma natural, y se conocen como células Treg naturales (nTregs). Estas células adquieren su capacidad reguladora durante la timogénesis y fenotípicamente se caracterizan por ser CD25+, y por la expresión constitutiva de marcadores como el factor de transcripción *Forkhead box P3* (FoxP3), el cual controla su desarrollo y es esencial en su función^{325,331,332}. FoxP3 se considera el marcador más específico de esta subpoblación de células T y ejerce una regulación transcripcional positiva induciendo un aumento en la expresión de CD25, del antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA-4), y del receptor del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides (GITR).

Las células nTregs son potencialmente autoreactivas, expresan receptores de células T α/β , y al parecer, son seleccionadas en el timo mediante una unión de alta afinidad a complejos MHC que cargan péptidos propios. De esta forma, estas células evaden la delección clonal tímica y cuando son activadas por autoantígenos no se diferencian en células capaces de generar una respuesta autoinmunitaria, sino que lo hacen en potentes células supresoras capaces de inhibir a otras células autoreactivas. Este proceso se conoce como tolerancia reguladora o supresión inmunitaria dominante³³³.

- Otro grupo de células Tregs CD4+CD25+ está representado por las células Tregs inducidas por antígeno o adaptativas (aTregs). Estas Tregs se sitúan en los órganos linfoides periféricos y parecen actuar de forma específica frente al antígeno, a través de señales dependientes del contacto celular y de la secreción de determinadas interleucinas.

La función supresora de estas células Tregs inducidas está mediada por la producción de las citocinas supresoras IL-10 y TGF- β ³³⁴.

Entre las células T reguladoras inducibles que se originan en tejidos periféricos, las Tr1 y las Th3 son las que mejor se conocen³¹⁶.

Se ha especulado mucho sobre los motivos por los cuales el sistema inmune es incapaz de prevenir el desarrollo de tumores en algunas circunstancias.

Existen múltiples mecanismos que generan inmunosupresión en el microambiente tumoral, que pueden restringir la intensidad y la magnitud de las reacciones citotóxicas en el huésped. Entre ellas destaca esta pequeña población de células T, que se caracteriza por la expresión de FoxP3³³⁵⁻³³⁸.

El papel significativo de las células Tregs en suprimir la respuesta inmune antitumoral está bien establecido³³⁹. Diversos autores han demostrado que la progresión tumoral puede estar asociada con un incremento en el número de células Tregs, ya que un aumento en el número de estas células podría afectar a la respuesta inmune citotóxica que se desencadena frente a determinados antígenos expresados por las células tumorales. De este modo, el aumento intratumoral de células Tregs se ha correlacionado con una reducción en el número de células T CD8+, protegiendo a las células tumorales de la citotoxicidad mediada por estas células, y también se ha demostrado que la depleción de las células Tregs aumenta la destrucción tumoral inducida por el sistema inmunitario. Por otro lado, se ha especulado con que las células Tregs pueden ejercer un efecto antitumoral por ellas mismas, especialmente en neoplasias de células T^{340,341}.

La relevancia clínica de la inmunosupresión mediada por Tregs es una disminución de la supervivencia de los pacientes que poseen una mayor cantidad de células intratumorales FoxP3+³⁴². Por otro lado, los infiltrados linfocitarios ricos en linfocitos citotóxicos T CD8+ pero deficitarios en células Tregs FoxP3+ se correlacionan estrechamente con un mejor pronóstico de los pacientes, constituyendo el balance entre las vías citotóxica y reguladora un índice que refleja la destrucción tumoral, y un determinante crítico de la inmunidad protectora (cociente entre células T CD8+ y células T FoxP3+)^{228,343-345}.

La pérdida de células Tregs puede facilitar la persistencia y propagación en la piel de células T reactivas³¹⁸. De hecho, los sujetos que presentan mutaciones en el gen FoxP3 padecen el síndrome inmunodisregulación, poliendocrinopatía y enteropatía ligada al cromosoma X (IPEX), una enfermedad que se caracteriza por afectación intestinal y endocrina de origen autoinmune. Así mismo, los ratones con esta alteración genética sufren un síndrome autoinmune letal^{318,336}. Tanto los enfermos como los ratones presentan concentraciones muy bajas de Tregs en la sangre, y las escasas células que poseen tienen una funcionalidad muy deficiente. La función específica de FoxP3 parece

ser indirecta a través de amplificar y estabilizar la transcripción de diversos genes específicos de regulación.

Por otro lado, se ha propuesto que una reducción en el número de Tregs o un defecto en su función podría provocar potencialmente una pérdida de la tolerancia inmune y el desarrollo de autoinmunidad. Las Tregs pueden modular tanto la inmunidad innata como la adquirida. Actuando a través de múltiples modos de supresión, están implicadas en la respuesta inmune en un amplio espectro de trastornos incluyendo enfermedades autoinmunes, trasplante de órganos, enfermedades infecciosas, alergias y cáncer ³²⁶.

De este modo, numerosas enfermedades autoinmunes o mediadas por el sistema inmune presentan una depleción en el número o un defecto en la función de las Tregs como en la gastritis, tiroiditis, diabetes tipo I, miastenia gravis, artritis reumatoide, esclerosis múltiples, penfigoide ampolloso, psoriasis, esclerodermia, dermatomiositis, lupus y enfermedad injerto contra huésped ³²⁶.

Los distintos mecanismos por los cuales las células T reguladoras permiten un control de la actividad inmunitaria pueden resumirse en los siguientes puntos:

- ***Mecanismo de supresión directo:*** se lleva a cabo por contacto célula-célula, y está relacionado con el aumento de moléculas CTLA-4. Se ha implicado un papel crítico del CTLA-4 en atenuar la inmunidad antitumoral ³⁴⁶. Las células T reguladoras expresan de forma constitutiva CTLA-4, que es necesario para su función ^{343,347}, y proporciona señales inhibitorias que derivan en la inactivación de células efectoras ^{318,333}. El principal mecanismo de acción del ipilimumab, un anticuerpo monoclonal completamente humano IgG1 que se ha aprobado recientemente para su uso en pacientes con melanoma metastásico, es bloquear el CTLA-4. De este modo, al potenciar la respuesta inmune evita que éste desempeñe su papel fundamental en la supresión de la respuesta inmunológica frente al cáncer (**figura 1.9**).
- ***Mecanismo de supresión indirecto:*** por secreción de citoquinas inmunosupresoras ³³¹, pero también por una regulación transcripcional negativa inhibiendo la producción de IL-2, NFAT (factor nuclear de linfocitos T activados) y NF- κ B (factor nuclear Kappa Beta). El transcriptor FoxP3 interfiere

en la interacción entre AP-1 (proteína activadora 1) y NFAT en el promotor de la IL-2, lo cual impide la activación transcripcional del gen de la IL-2, y en consecuencia provoca una reducción en la producción de IL-2³³³.

- **Otros mecanismos:** las Tregs pueden secretar perforinas y granzimas e inducir la apoptosis de los linfocitos efectores. Además, los linfocitos Tregs liberan galectina-1, la cual también tiene la capacidad de inducir apoptosis en linfocitos T^{331,333}.

Papel de los Tregs en el cáncer

Diversos estudios han puesto de manifiesto un incremento en el número de células Tregs en sangre periférica, ganglios linfáticos, y tejido tumoral en pacientes con distintos tipos de cánceres^{321,332}. La cantidad de estas células también está significativamente aumentada en tejido tumoral cuando se compara con la que se observa en la sangre periférica del mismo paciente o de donantes sanos.

En cuanto al pronóstico, el aumento de las células Tregs se ha asociado con una menor supervivencia en pacientes con diferentes estirpes tumorales^{342,348-353}, incluido en neoplasias epiteliales malignas, donde la acumulación de las mismas se ha asociado tanto con progresión de la enfermedad como con un aumento del riesgo de recurrencia local^{354,355}.

Papel de los Tregs en el melanoma

Las Tregs también son capaces de inducir inmunotolerancia en el melanoma^{356,357}. Se ha demostrado que estas células pueden inhibir “in vitro” la proliferación de células T CD8+ capaces de reconocer el antígeno tumoral Melan A/Mart 1. Por este motivo, diversos autores sugieren que es posible que las células Tregs puedan provocar una supresión de los infiltrados linfocitarios citotóxicos asociados al melanoma, atenuando la inmunidad específica de células T CD8+ frente a determinados antígenos del melanoma y contribuyendo de este modo al crecimiento tumoral³⁵⁸.

Mourmouras et al³⁰⁹ demostraron una prevalencia fuertemente aumentada de células Tregs CD25+FoxP3+ tanto en nevos displásicos como en melanomas en fase de crecimiento radial. Nuestros casos apuntan en esa misma dirección, ya que la expresión de FoxP3 también ha sido superior (un 14,3% mayor) en melanomas en fase de

crecimiento radial que en fase vertical, aunque esas diferencias carecen de significación estadística.

Por otro lado, parece que la tolerancia al sistema inmunitario se produce durante las fases iniciales del desarrollo del melanoma, lo que favorece el crecimiento del mismo ³⁵⁹⁻³⁶¹.

En este sentido, los resultados de Mourmournas et al ³⁰⁹ también evidenciaron un reclutamiento precoz de células Tregs CD4+CD25+FoxP3+ en el lugar donde asienta el tumor. Las Tregs pueden ser atraídas dentro del parénquima tumoral y en la vecindad del estroma del mismo, y pueden mantenerse ahí debido a la presencia de diversos antígenos tumorales y citocinas. El mantenimiento y/o prevalencia de las células Tregs en el lugar donde asienta el tumor podría contribuir a una inadecuada respuesta inmune, originando un crecimiento incontrolado del melanoma ³⁶².

Se ha podido demostrar que hay un incremento selectivo en la cantidad de células Tregs en las áreas intratumorales, comparado con aquellas localizadas en el estroma peritumoral, lo que sugiere una migración y su acumulación selectiva entre las células tumorales ³³². En esta serie, sólo se observan un 3,4% más linfocitos FoxP3+ en los infiltrados intratumorales que en los peritumorales.

Por otro lado, las células Tregs también se expresan de forma más intensa en nevos displásicos, al compararlos con nevos no displásicos ³⁰⁹. Los casos de esta serie aportan resultados similares, ya que se ha objetivado un porcentaje de células FoxP3+ en los infiltrados linfocitarios un 27% mayor en melanomas que en nevos displásicos, y un 34,1% superior en melanomas respecto a nevos sin displasia. Por otro lado, los nevos displásicos presentaron un 9,7% más células FoxP3+ que los nevos sin displasia.

De forma opuesta, otros autores han observado un incremento de células FoxP3+ en melanomas en fase de crecimiento vertical respecto a aquellos en fase radial en el mismo estadio, y en estadios avanzados respecto a estadios precoces ³⁵⁸.

En nuestros casos, aunque la expresión de FoxP3 es mayor en los melanomas en fase de crecimiento radial que en fase vertical, ni FoxP3 ni ninguno de los marcadores inmunohistoquímicos empleados demostraron diferencias estadísticamente significativas en función de la fase de crecimiento del melanoma.

Se ha observado una correlación entre el aumento en la proporción de Tregs y el aumento del grosor de melanomas primarios ³⁶². En esta serie tampoco se confirma que

la inmunotinción con FoxP3 de los linfocitos se correlacione con un mayor espesor tumoral.

Se ha objetivado que pacientes con melanoma metastásico tienen una mayor proporción de células Tregs comparado con controles normales^{318,363}. Viguier et al³³⁴ encontraron un aumento considerable de la expresión de células Tregs en ganglios linfáticos invadidos por metástasis, al compararlos con los ganglios linfáticos satélites libres de tumor. Ma et al³⁶⁴ también hallaron una elevación de los Tregs en la sangre de pacientes que padecieron metástasis ganglionares.

En relación a los resultados obtenidos de las asociaciones de FoxP3 con el resto de variables estudiadas:

- La inmunotinción con FoxP3 de los linfocitos es mayor en los melanomas que en los nevos melanocíticos, y más abundante también en los nevos displásicos que en los nevos sin displasia, aunque esas diferencias no son estadísticamente significativas.
- Un mayor número de células marcadas con FoxP3 se asocia con significación estadística ($p=0,038$) a la apoptosis intensa.
- Se observa una correlación positiva estadísticamente significativa ($p<0,0001$) entre un aumento en el número de linfocitos FoxP3+ y la densidad de los linfocitos que constituyen el infiltrado. De este modo, como sucedía con la inmunotinción con CD8, cuanto mayor es el número de linfocitos en el infiltrado inflamatorio, mayor es el número de los mismos que son FoxP3 positivos.

Por tanto, FoxP3 se asocia al diagnóstico de melanoma, a la apoptosis intensa y a un aumento en el número de los linfocitos que constituyen los infiltrados inflamatorios, parámetros histológicos que también se asocian a los melanomas.

Se considera que una mayor expresión de linfocitos FoxP3+ favorece la progresión tumoral, ya que provoca un freno de la respuesta inmune, por lo que hipotéticamente FoxP3 debería evitar la apoptosis, que es el reflejo de que existe destrucción de células tumorales. Se puede especular que dado que se trata de lesiones con regresión, un determinado número de estos linfocitos intentaría frenar la respuesta inmune, pero si no lo consigue, es decir, si la regresión avanza, se produciría una respuesta en forma de un

incremento en el número de linfocitos FoxP3+ con el objetivo de conseguir un freno adicional más potente.

Otra hipótesis alternativa que podría teóricamente plantearse es que los linfocitos FoxP3+ tuviesen la capacidad de eludir la apoptosis que provocan en algunos linfocitos infiltrantes las propias células tumorales como un mecanismo de defensa, y aumentarían así su proporción en relación al resto de linfocitos constituyentes del infiltrado, que probablemente sí se vean afectadas por esa destrucción.

También es posible que algunos antígenos puedan estimular preferentemente células Tregs, mientras que otras activen otros tipos linfocitarios, por mecanismos no del todo esclarecidos. Una antigenicidad alterada de las células tumorales, con una expresión preferente de antígenos capaces de atraer a células Tregs, quizás podría ser otro de los mecanismos de escape al control inmune de las células de melanoma.

Dado que FoxP3 también se encuentra presente en células T activadas y no reguladoras de humanos, algunos autores han puesto en duda que FoxP3 sea definitorio de las Tregs. Como las células con mayor capacidad supresora que son FoxP3 positivas presentan en su membrana concentraciones muy bajas del receptor de la IL-7 (CD127), se considera que el fenotipo CD4+ CD25+ CD127- sería el mejor marcador de células Treg en humanos ³²⁶.

Otras células reguladoras

Como se ha visto con anterioridad, aunque las células reguladoras más conocidas sean los linfocitos T CD4+CD25+FoxP3+, hay varios tipos celulares con capacidad reguladora (los más conocidos se recogen en la **tabla 3.52**). Su existencia se ha deducido por datos funcionales, pero al igual que en el caso de las Tr1 o Th3, no se conocen marcadores específicos que permitan distinguirlas de otras poblaciones celulares con capacidad colaboradora o citotóxica ³¹⁶.

- Los linfocitos T CD8+ reguladores desempeñan un papel en procesos fisiológicos, como el mantenimiento de la tolerancia de órganos inmunoprivilegiados, la tolerancia oral, y en situaciones especiales como procesos autoinmunes, trasplante de órganos y control de la enfermedad del injerto contra el huésped. Las células T CD8+ tolerogénicas que mejor se conocen tienen el fenotipo CD8+CD28- y realizan su función a través del

reconocimiento de antígenos en las células dendríticas, a las que convierten en tolerógenas mediante el bloqueo de la expresión de moléculas coestimuladoras.

- Las células NKT se definen por ser linfocitos T que expresan, además del CD3 como receptor de linfocito T- $\alpha\beta$, receptores propios de células NK como CD161. Reconocen glucolípidos presentados en el contexto de CD1d. Su función tolerogénica no se conoce lo suficiente, si bien parece estar mediada por interacciones con otras células reguladoras y la secreción de citocinas moduladoras de la respuesta, como IL-4, IL-10 y TGF- β .
- Los linfocitos B reguladores han sido identificados en relación con la pérdida de la tolerancia en modelos experimentales de autoinmunidad, infecciones y cáncer, y son fácilmente identificables debido a que son CD1d+ y CD5+. Su actividad reguladora parece estar mediada por un doble mecanismo: la producción de citocinas inmunomoduladoras como IL-10 y TGF- β , y la capacidad de interactuar directamente con linfocitos T reactivos, a los que son capaces de inhibir. La función reguladora de la respuesta inmune por parte de los linfocitos B se atribuyó a la capacidad de producir anticuerpos inhibitorios.

Tabla 3.52. Principales tipos de células reguladoras ³¹⁶.

Tipo celular	Fenotipo	Efecto regulador que depende de:
Treg	T CD4+ CD25+ FOXP3+, CD127-	Contacto directo, IL-35
Tr1	T CD4+ CD25-	IL-10 y TGF- β
TH3	T CD4+ CD25-	TGF- β
Ts	T CD8+ CD28-	IL-10, TGF- β , IDO
NKT	CD3+ CD161+	IL-4, IL-10, TGF- β
Br	No definido	Contacto directo, IL-10, TGF- β

Br: linfocitos B reguladores; IDO: indolamina-2,3-dioxigenasa; IL: interleucina; NKT: linfocitos T citotóxicos naturales; TGF- β : factor del crecimiento transformante β ; TH: linfocito T *helper*; Treg: linfocitos T reguladores; Tr1: linfocitos T reguladores inducibles; Ts: linfocitos T supresores.

3.1.6.1.2. MARCADORES DE ACTIVACIÓN LINFOCITARIA (CD25)

Entre los diferentes factores de activación, el CD25 (IL 2 R α), expresado en una porción relativamente pequeña de los infiltrados linfocitarios de muchos tipos de tumores, se considera un antígeno de estimulación reciente antigénica, y al mismo tiempo, posee un significado funcional, ya que desempeña un papel crucial en la regulación de la proliferación de células T en pacientes con melanoma, carcinoma de cabeza y cuello o carcinoma colorectal ^{365,366}.

Los pacientes con melanomas con un espesor superior a 1mm y una elevada densidad peritumoral de linfocitos CD25+, presentan una menor incidencia de enfermedad metastásica, y en consecuencia una mayor supervivencia al compararlos con los que poseen un menor número de este tipo de células ³⁶⁷. En cambio, en aquellos en los que el CD25 se expresa a nivel intratumoral no se altera el pronóstico. Los linfocitos CD25+ podrían ser considerados linfocitos CD4 efectores, que no necesitan el contacto directo con las células tumorales ³⁶⁷.

En relación a los resultados de la tinción con CD25 en esta serie:

- Se observa un aumento en el número de linfocitos CD25+, estadísticamente significativo ($p=0,031$), en las lesiones con regresión que muestran fibrosis leve respecto a las que presentan fibrosis moderada e intensa.
- Por otro lado, un aumento en el número de linfocitos CD25+ también se asocia de forma estadísticamente significativa a la fibrosis de tipo laminar ($p=0,009$) y a la pérdida leve de melanocitos ($p=0,006$), y se correlaciona de forma inversa, también con significación estadística, a la fibrosis indeterminada ($p=0,026$), y cercana a la significación estadística ($p=0,086$), a la fibrosis de tipo compacto, más propias de melanomas que de nevos.
- Finalmente, un menor número de linfocitos CD25+ también presenta una asociación estadísticamente significativa ($p=0,033$) con el infiltrado de tipo difuso.

Los datos obtenidos sugieren que un aumento en la expresión de CD25+ se podría relacionar con la fase precoz de la regresión, ya que se asocia a una pérdida leve de melanocitos y a fibrosis leve y de tipo laminar. Se podría considerar, por tanto, un

marcador de la fase inicial de la regresión. Estos hallazgos estarían justificados por el hecho de que el CD25 es un marcador de linfocitos que se han activado recientemente. Por otro lado, aunque el CD25 es un marcador de activación linfocitaria, parece asociarse con un freno a la potencia de la respuesta inmune, ya que un menor número de células CD25+ se asocian al infiltrado difuso, y un mayor número a una pérdida leve de melanocitos.

3.1.6.1.3. MARCADORES DE APOPTOSIS ESTUDIADOS.

El porcentaje de nevos en los que se apreció inmunotinción con L-Fas en el infiltrado inflamatorio es muy superior al de los melanomas. En los nevos melanocíticos, existe un gradiente decreciente de expresión de L-Fas a medida que aumenta el grado de displasia de las lesiones estudiadas.

Por otro lado, como cabría esperar, el aumento del número de linfocitos marcados con granzima B se asocia de forma estadísticamente significativa al incremento del grado de apoptosis, y como se apreciaba en los resultados histológicos, la apoptosis intensa también se asocia de forma consistente al diagnóstico de melanoma. Por tanto, se aprecia que los dos marcadores de apoptosis funcionan de manera aparentemente distinta:

- Granzima B: cuanto mayor es la displasia de la lesión, se observa un mayor número de linfocitos que son granzima B+, circunstancia que también sucede entre los distintos subtipos histológicos de melanoma, ya que es máxima en los melanomas nodulares, que son los que asocian un peor pronóstico.
- L-Fas: pasaría lo contrario que con la granzima B, ya que cuanto mayor es el grado de displasia, menor es la apoptosis de las células diana mediada por L-Fas.

L-FAS

Fas es una proteína transmembrana de tipo I de 43 kD que se expresa en varios tipos de células. El ligando de Fas (L-Fas), también conocido como CD95L y ApoI-L es una proteína transmembrana de tipo II, de 40 kD, que se sintetiza y se expresa fundamentalmente en linfocitos T citotóxicos activados y en células *natural killer*, aunque se ha demostrado que un número cada vez mayor de células neoplásicas presentan este ligando ³⁶⁸. En condiciones normales sólo algunos tejidos como el ojo, el testículo o algunas partes del sistema nervioso central expresan de forma constitutiva esta molécula. La vía extrínseca o mediada por receptores de la apoptosis se desencadena tras la unión de ligandos a receptores de muerte celular presentes en la superficie de la célula diana.

Cuando se activan las células T CD8+ citotóxicas expresan en su superficie la molécula L-Fas, en forma de homotrímero. L-Fas interactúa con la molécula Fas (CD95), expresada en la célula diana e induce su trimerización. La reacción L-Fas-Fas provoca un reclutamiento de proteínas adaptadoras al dominio de muerte de Fas (FADD), que conducen a la activación de la caspasa 8 y a la apoptosis de la célula diana. Por tanto, Fas y su ligando desempeñan importantes papeles en la relación entre las neoplasias y la inmunidad.

La expresión anómala de L-Fas se considera un privilegio inmune de algunas células tumorales, y explica la falta de rechazo y la connivencia por parte del sistema de defensa del huésped ¹⁰⁰.

La expresión de Fas y de su ligando es un hallazgo prácticamente constante en todo el espectro de las lesiones melanocíticas ³⁶⁸, y se ha especulado respecto a su influencia en la progresión del melanoma. Aunque los resultados de esta serie evidencian lo contrario, diversos estudios coinciden en que la expresión de L-Fas es mayor en melanomas que en lesiones melanocíticas benignas ³⁶⁸⁻³⁷¹. Existen también diferencias significativas en la expresión de L-Fas cuando se comparan nevos melanocíticos y metástasis cutáneas o ganglionares de melanoma ³⁶⁸, siendo mayor en las metástasis.

Los datos acumulados en relación a la expresión de Fas y L-Fas cuando se comparan melanomas primarios con metastásicos generan controversia, ya que los resultados son dispares. Algunos estudios encuentran una expresión de L-Fas mayor en los melanomas primarios que en los metastásicos ^{368,372,373}. Por el contrario, otros autores han hallado

una expresión mayor de L-Fas en metástasis que en tumores primarios^{370,374,375}. La expresión de moléculas de L-Fas por las células del melanoma se asocia a apoptosis de los linfocitos citotóxicos que llegan al lecho tumoral, lo que provocaría una menor capacidad de destrucción tumoral y por tanto un peor pronóstico. También se ha demostrado un incremento de L-Fas en el suero de pacientes con melanoma metastásico. Este L-Fas soluble puede inducir apoptosis de linfocitos citotóxicos circulantes que son Fas positivos. Por tanto, además de la apoptosis paradójica de los linfocitos que infiltran el tumor, los pacientes con melanoma metastásico pueden presentar inmunosupresión sistémica por esta vía¹⁰⁰. Por último, en metástasis cutáneas también se ha determinado una correlación positiva entre la expresión de L-Fas y la densidad de linfocitos.

Por tanto, existe una estrecha relación entre la participación del L-Fas y la citotoxicidad mediada por los linfocitos T CD8+. La inactivación de las señales vía Fas debida a la baja expresión de este antígeno en la membrana de la célula diana puede originar una supervivencia anormal de la célula y contribuir al desarrollo y progresión de las células tumorales.

En este estudio hemos medido la expresión de L-Fas en los linfocitos que atacan las células de melanomas y de nevos melanocíticos, que provocarían la apoptosis de la célula diana. El porcentaje de nevos con regresión en los que se apreció inmunotinción con L-Fas en sus infiltrados linfocitarios es muy superior al de los melanomas. Existe un gradiente decreciente de expresión de L-Fas, que es inversamente proporcional grado de displasia de las lesiones estudiadas, de modo que a medida que aumenta la atipia de las células, la expresión de L-Fas en los linfocitos es menor. En el grupo de los nevos melanocíticos, los halo nevos son los que presentan una mayor densidad de linfocitos L-Fas positivos. Dentro de los melanomas, los linfocitos marcados con L-Fas prevalecen con claridad en los de extensión superficial respecto al resto de tipos histológicos (**tabla 3.30**).

En cuanto a la inmunotinción con ligando de Fas y su asociación con los distintos parámetros histológicos evaluados, la tinción mayoritaria con L-Fas de los linfocitos también se asocia de forma estadísticamente significativa, como sucedía con el CD25, a la fibrosis laminar ($p=0,024$), que es la variedad de fibrosis que más se asocia a los nevos melanocíticos, y una inmunotinción minoritaria con L-Fas de linfocitos a la fibrosis compacta, más propia de melanomas ($p=0,014$).

Por otro lado, se observa una asociación estadísticamente significativa ($p=0,003$) entre la densidad de melanófagos y la inmunotinción minoritaria de linfocitos con L-Fas. Los casos en los que los infiltrados linfocitarios presentan un menor número de células L-Fas positivas se asocian a una mayor densidad de melanófagos. Se podría especular que quizás la apoptosis mediada por L-Fas no es tan destructiva como la mediada por granzima B.

A pesar de estos hallazgos, en lo que parecen coincidir la mayoría de autores es que este marcador tiene una aplicación limitada en la práctica diaria.

GRANZIMA B

Las granzimas están constituidas por componentes con actividad serina esterasa que se encuentran específicamente en los gránulos de los linfocitos T citotóxicos. Penetran en la célula diana a través de los poros generados por las perforinas y activan las procaspasas 3 y 8, induciendo así la apoptosis. Existen cinco tipos de granzimas: A, B, H, K y M. Las granzimas A y B son las más abundantes y las más estudiadas. La de mayor relevancia es la granzima B.

Los interferones de tipo I dirigen la inflamación citotóxica, ya que inducen respuestas inmunes de tipo Th1, con el reclutamiento de linfocitos T CD8+, que parecen ser las células efectoras predominantes en la regresión tumoral.

La activación de la célula T CD8+ citotóxica conduce a la movilización de sus gránulos hacia el sitio de contacto con la célula diana. Este movimiento es guiado por microtúbulos que se polimerizan en respuesta a la activación celular. En los gránulos, la granzima B forma un complejo con la perforina. Al desgranularse la célula T CD8+, el complejo se libera a la zona de contacto y es endocitado por la célula diana. Merced a la acción de las perforinas, que ejercen efectos desestabilizantes sobre la membrana de la célula endocítica, la granzima B accede al citoplasma de la célula diana y activa el sistema de caspasas, que son las verdaderas ejecutoras del proceso apoptótico.

Estudios recientes han sugerido que el reclutamiento de linfocitos vía CXCR3, que también es característico para una respuesta inmune de tipo Th1, podría ser importante para la inmunidad cutánea específica contra antígenos.

En el melanoma, existe una señalización endógena aumentada de interferon tipo I, con reclutamiento de linfocitos positivos para el receptor de la citocina CXCR3+ y de

linfocitos citotóxicos granzima B+. Por otro lado, se ha demostrado que el interferón alfa es capaz de inducir la expresión lesional de las quimiocinas CXCL10/IP10 y CXCL9/MIG, que se unen y atraen a las células T CXCR3³⁷⁶. De hecho, se ha observado una inflamación citotóxica similar en la regresión de metástasis de melanoma tras tratamiento tópico con imiquimod, un agonista de los receptores *toll-like* (TLR)⁷.

Las quimiocinas son citocinas quimiotácticas de bajo peso molecular que permiten la migración celular, atrayendo a células que expresan sus receptores. Como algunas quimiocinas son abundantes en órganos que son asiento común de metástasis, y sus receptores son expresados por las células tumorales, se ha sugerido que un gradiente de estas quimiocinas facilitaría selectivamente las metástasis a esos órganos. Por otro lado, se ha constatado una producción de estas quimiocinas por las propias células tumorales, y su efecto autocrino. Además, muchas quimiocinas tienen efectos contrapuestos dependiendo del tipo celular sobre el que actúan, su estado funcional y otras interacciones moleculares. En el melanoma las células tumorales adquieren ventajas de la expresión de quimiocinas y receptores alterando su microambiente, estimulando la angiogénesis y evadiendo la respuesta inmune, facilitando así la progresión tumoral. Las variaciones en la expresión de determinadas quimiocinas y sus correspondientes receptores han sido propuestas como mecanismos moleculares que intervienen de forma relevante, favoreciendo o dificultando la diseminación metastásica del melanoma

Existen cada vez más evidencias de que las quimiocinas presentes en los tumores humanos contribuyen más al crecimiento tumoral, progresión e inmunosupresión que a producir una respuesta antitumoral efectiva. Pero lo cierto es que las interacciones quimiocina-receptor en unos casos potencian y en otros dificultan la respuesta inmune.

La participación de quimiocinas y sus receptores en la progresión del melanoma es importante, compleja y dinámica, y depende tanto de características de las células tumorales como de aquellas otras presentes en el microambiente tumoral del huésped. Estas interacciones celulares y moleculares determinan si predomina un efecto potenciador que favorezca la progresión tumoral, o un efecto antitumoral, que permita la regresión o al menos la estabilización del melanoma. En cuanto a los linfocitos se ha propuesto que una respuesta Th1, que es mayor en melanomas en regresión, tiene un efecto antitumoral, mientras que una Th2 facilita la progresión tumoral, pero la situación es más compleja³⁷⁷.

Algunos estudios han revelado un elevado número de células granzima B+ en los infiltrados linfocitarios de lesiones melanocíticas cutáneas en regresión activa. Se observaron cifras muy altas de linfocitos granzima B+ en los melanomas con regresión precoz, y también se constató una fuerte expresión de este marcador en halo nevos, en nevos displásicos con infiltrado inflamatorio, y en melanomas en regresión en estadios intermedios ³⁷⁸.

Estos mismos autores hallaron que la mayoría de linfocitos T infiltrantes también expresaban la molécula CXCR3. Se apreciaron cifras significativamente elevadas de linfocitos CXCR3 positivos en todos los tipos de melanomas en regresión, halo nevos y nevos displásicos, al compararlos con muestras de individuos sanos que se usaron como controles. Del mismo modo, también evidenciaron una fuerte expresión del ligando de CXCR3 (IP10/CXCL10) en los melanomas en regresión ³⁷⁹.

Por todo ello, se ha hipotetizado que la estimulación endógena de la producción de interferón de tipo I, presumiblemente por células dendríticas, conduce al reclutamiento de linfocitos positivos para CXCR3 y para granzima B.

Un estudio previo de nuestro grupo de trabajo mostró inmunoreactividad de CXCR3 en las células tumorales de un 31,7% de los melanomas cutáneos primarios invasivos, y se constató una correlación positiva de la inmunoreactividad tumoral de CXCR3 con un índice de Breslow >1 mm y con la ausencia de infiltrado linfocitario intratumoral, lo que apoyaría la implicación biológica de CXCR3 en la progresión tumoral del melanoma cutáneo ²²⁶.

Por otro lado, también se ha constatado que unos cocientes bajos de la expresión intratumoral de ARNm de los ligandos de las quimiocinas y sus receptores CCL27/CCR10 y CXCL12/CXCR4 se asocian a progresión del melanoma, y su combinación con el índice de Breslow mejora significativamente la capacidad para predecir el desarrollo de metástasis a distancia en el melanoma primario cutáneo ³⁸⁰.

En relación a los resultados de las asociaciones de la granzima B con el resto de variables estudiadas:

- Al caracterizar inmunofenotípicamente las células que constituyen los infiltrados inflamatorios se obtiene que la inmunotinción con granzima B muestra un

incremento progresivo a medida que aumenta la atipia de la lesión estudiada, y esas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,013$).

- Se observa una correlación positiva estadísticamente significativa ($p<0,0001$) entre un aumento en el número de células granzima B+ y la densidad de infiltrado linfocitario, de modo que a medida que aumenta el número de células marcadas con la granzima B también lo hace la densidad de infiltrado linfocitario, de forma similar a lo que sucedía con la inmunotinción con CD8.
- La granzima B ha mostrado una asociación estadísticamente significativa ($p=0,031$) con el infiltrado con distribución parcheada, de forma que se aprecia un menor número de células marcadas con granzima B en las lesiones con regresión e infiltrado linfocitario parcheado.
- Por otro lado, la inmunotinción con granzima B también se asocia de forma estadísticamente significativa a la apoptosis intensa. La granzima B, que es un marcador de apoptosis, muestra una correlación como cabría esperar, ya que se evidencia un incremento en el número de linfocitos positivos para granzima B de forma proporcional al aumento del grado de la apoptosis.

Como conclusión, la presencia de inmunotinción positiva para granzima B sería un marcador de la fase precoz de la regresión, que se caracterizaría por índices elevados de apoptosis mediada por linfocitos citotóxicos, y por consiguiente, por una fuerte expresión de interferón de tipo I y por el reclutamiento de linfocitos CD8 positivos para granzima B.

En función de nuestros resultados, analizando el número de linfocitos citotóxicos infiltrantes con expresión de granzima B, que está presente en los granulos citotóxicos, se ha constatado un elevado número de células granzima B+ en los melanomas con regresión al compararlos con los nevos melanocíticos. Como se verá posteriormente, la granzima B es el marcador inmunohistoquímico que el estudio multivariante ha demostrado que tiene más utilidad para discriminar entre nevo melanocítico y melanoma en caso de regresión muy extensa o completa.

3.1.7. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

REGRESIÓN LOGÍSTICA BINARIA MULTIVARIANTE

Se ha realizado un análisis de regresión logística univariante analizando la variable melanoma con todas las demás variables estudiadas, y posteriormente para la obtención del modelo final de regresión logística multivariante se han utilizado los métodos de inclusión por pasos hacia delante y hacia atrás, combinados con la inclusión y/o exclusión manual de variables. Los criterios de inclusión y exclusión por pasos de las variables en los modelos se realizaron con la prueba de razón de verosimilitud, con el criterio de inclusión $p \leq 0,05$ y de exclusión $p > 0,10$. Se ha fijado el modelo final con aquellas variables que quedaban incluidas en el último paso y que no obedecían exclusivamente a criterios de significación estadística, sino que permanecían en el modelo si producían un cambio importante en el resto de coeficientes. El modelo final seleccionado se calibró con la prueba de Hosmer y Lemeshow, y se exponen las variables que lo componen, los coeficientes β , la *odds ratio*, su intervalo de confianza y el grado de significación. Se calculó la curva ROC (*receiver operating characteristic*), exponiendo las áreas bajo la curva y sus intervalos de confianza, para valorar la discriminación del modelo en distinguir las lesiones que son melanomas de los nevos melanocíticos.

Análisis de regresión logística

Gracias al análisis multivariante se obtuvo una ecuación de predicción de que la lesión en la que se apreciaba regresión era un melanoma que incluía las variables edad, fibrosis laminar, densidad de melanófagos, densidad de vasos e inmunotinción con granzima B. Este modelo sería capaz de clasificar correctamente un 87% de las lesiones en las que la regresión se había producido en un melanoma (IC 95%: 81,1% a 92,9%) (**figura 3.16**).

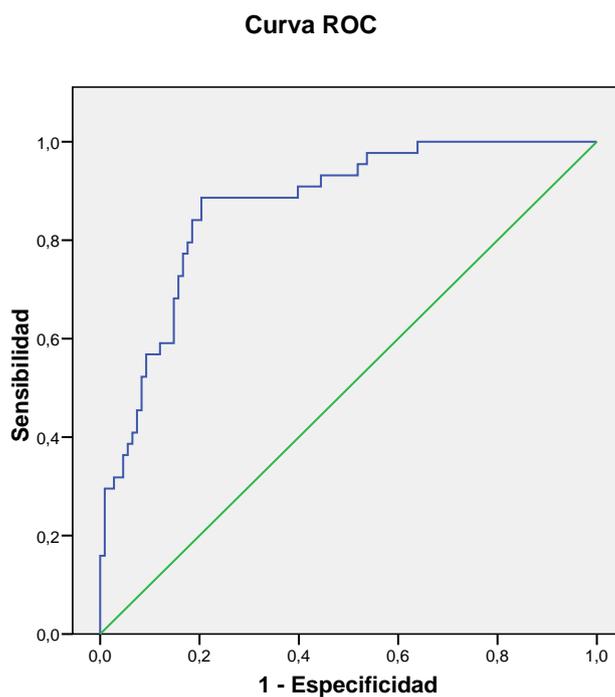
La ecuación resultante con las variables obtenidas en el análisis de esta muestra, que predice la probabilidad de que la lesión con regresión sea un melanoma sería la siguiente: Probabilidad melanoma = $1 / 1 + e^{-(\beta_0 + \sum \beta_i X_i)}$, donde X_i son las variables independientes (edad, fibrosis laminar, densidad de vasos, de melanófagos y de células granzima B+), y los β_i son los coeficientes de regresión, que al igual que β_0 , se estiman en el análisis (**figura 3.16**). Si el resultado de esta ecuación matemática fuera igual o mayor de 0,5 la lesión melanocítica con regresión sería clasificada como melanoma.

Figura 3.16. Análisis de regresión logística y área bajo la curva (ROC): probabilidad de detectar que la lesión es un melanoma.

Análisis de regresión logística.

	β	OR	IC 95%	P
Edad	0,048	1,049	1,023 - 1,075	<0,0001
Fibrosis laminar	-1,505	0,222	0,086 - 0,572	0,002
Melanófagos	0,012	1,012	0,999 - 1,024	0,062
Vasos	0,096	1,100	1,016 - 1,191	0,019
Granzima B	0,136	1,146	1,014 - 1,295	0,029

Constante del modelo β_0 : -4,719; R^2 Nagelkerke: 0,453; OR: *odds ratio*; IC: intervalo de confianza



Área bajo la curva	Error típico ^a	Significación asintótica ^b	IC 95%
0,870	0,030	< 0,0001	0,811 - 0,929

a. Bajo el supuesto no paramétrico; b. Hipótesis nula: área verdadera= 0,5.

3.2. ESTUDIO MOLECULAR

3.2.1. INTRODUCCIÓN

Las alteraciones cromosómicas representan la principal característica de prácticamente todos los cánceres sólidos. A nivel molecular, éstas constituyen la diferencia esencial entre las neoplasias malignas y su contrapartida benigna ³⁸¹. Algunas de esas aberraciones cromosómicas son provocadas por una disfunción telomérica durante el proceso denominado “crisis” ³³. El término “crisis” se emplea para definir la muerte celular masiva que ocurre cuando las células sobrepasan su período de vida replicativo.

La mayoría de células humanas diferenciadas dejan de dividirse tras un determinado número de divisiones, para entrar en un estado senescente en el cual se encuentran metabólicamente activas, y se pueden mantener en medios de cultivo durante varios años ³⁸². Los mecanismos moleculares que determinan el número de divisiones de las células humanas parece que se controlan exclusivamente por el acortamiento de telómeros ³⁸³. Los telómeros son secuencias repetitivas de ADN que están unidas al final de los cromosomas por un complejo de proteínas. Los telómeros se acortan un poco con cada división celular hasta que alcanzan una longitud crítica que conduce a una detención permanente del ciclo celular. La señal de daño que induce la detención permanente requiere entre otros de los genes p53 y Rb (Retinoblastoma) ^{33,382}. Esta senescencia replicativa limita el número de divisiones celulares y se considera uno de los principales mecanismos de supresión tumoral. Las células en las que esta señal de daño está desactivada continúan proliferando más allá de su límite replicativo, y tras varias rondas adicionales de división celular, el desgaste del telómero es crítico, lo que provoca una apertura de la porción final del ADN y la fusión de las cromátidas por sus extremos. Durante este estado, denominado crisis, las células continúan dividiéndose, pero muestran unos altos índices de apoptosis, que está desencadenada por anomalías cromosómicas severas, ya que se producen fusiones termino-terminales, cromosomas dicéntricos y ganancia y pérdida de fragmentos cromosómicos en las sucesivas mitosis. Estas anomalías cromosómicas otorgan a la célula la posibilidad de desprenderse de genes supresores de tumores o acumular copias extras de oncogenes ^{167,384-387}.

Las crisis constituyen un período transitorio de reestructuración y selección genética, que finalmente conduce a la aparición de nuevos clones de células tumorales que tienen un genoma alterado pero estabilizado. Se caracterizan por tratarse de un período en el cual el índice de apoptosis es mayor que el de proliferación, conduciendo a una

reducción temporal en el número de células. A pesar de ello, la reestructuración genómica representa un período de rápida evolución, que puede conducir en última instancia a la creación de un fenotipo potencialmente más agresivo.

Posteriormente, para mantener cualquier constelación genética que emerge de la crisis y que resulte favorable para el tumor, las células cancerosas deben reestablecer sus telómeros. Algunas células humanas, incluyendo las de melanoma, pueden estabilizar sus telómeros gracias a la activación de la telomerasa, que inserta los fragmentos de ADN que se pierden tras cada división, lo que permite que la célula evite la senescencia^{164,166,388}. Si las células pierden la telomerasa, la crisis se prolonga y la inestabilidad genómica se hace más marcada³⁸⁹.

Tanto la presencia de anomalías cromosómicas groseras como el acortamiento de los telómeros y una mayor heterogeneidad de los mismos puede ser la evidencia de que un cáncer se dirige hacia una crisis³³. Las células en senescencia presentan unos telómeros muy cortos, pero si se produce una extensión de la vida celular, por heterogeneidad en el proceso de degradación, se observa como la mayoría de las mismas contienen al menos un cromosoma con telómeros críticamente acortados o ausentes, generando una inestabilidad cariotípica característica de las células en crisis³⁹⁰.

En animales de experimentación se ha podido demostrar que la regresión en el melanoma es directamente proporcional al acortamiento de los telómeros y a la presencia de fusiones termino-terminales en los cromosomas, indicativas de crisis¹⁶⁵. Por tanto, como ya se ha mencionado, la regresión espontánea del melanoma puede inducir un remodelado del genoma, por el cual el tumor paga el tributo de una aniquilación temporal pero gana en última instancia la recompensa hacia la inmortalidad.

Por otra parte, es posible que en el proceso de regresión puedan contribuir de forma sinérgica otros mecanismos adicionales como la respuesta inmune, ya que los cuerpos apoptóticos que se producen durante la crisis por el agotamiento de los telómeros son un poderoso estímulo antigénico³⁹¹.

El objetivo de este apartado del trabajo de tesis es estudiar la posible asociación entre la longitud de los telómeros y la presencia de regresión en todo el espectro de neoplasias melanocíticas cutáneas, y evaluar también si existen diferencias entre las mismas y un grupo de melanomas sin evidencia de regresión histológica.

3.2.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO MOLECULAR

3.2.2.1. COMPARACIONES ENTRE LAS CÉLULAS TUMORALES Y LAS EPIDÉRMICAS EN TODAS LAS LESIONES.

A. Medición de la intensidad media de las señales teloméricas.

La intensidad media de las señales en las células tumorales, en las células epidérmicas, y el cociente entre ambas fue el siguiente (tabla 3.53):

	n	Tumor (intensidad/célula)	Epidermis (intensidad/célula)	Cociente Tumor/Epidermis
Melanomas sin regresión	14	9,30±3,81	13,34±10,72	0,69
Melanomas con regresión	19	10,45±5,27	10,00±6,46	1,04
Nevus con displasia severa y regresión	10	11,95±7,81	15,56±3,74	0,76
Nevus con displasia convencional y regr.	10	9,83±4,10	9,63±3,74	1,02
Nevus sin displasia y regresión	15	12,08±3,56	13,02±6,10	0,92
		p=0,30	p=0,11	p=0,82

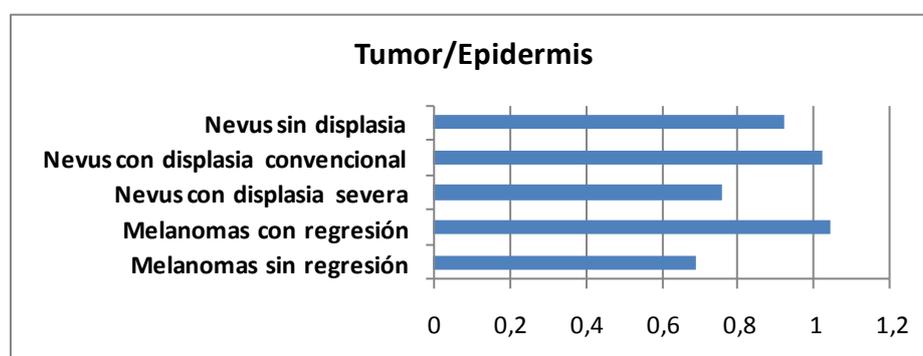


Figura 3.17. Las lesiones en las que el cociente entre la intensidad media de las señales en las células tumorales y en las epidérmicas es <1 son aquellas en las que los telómeros de las células tumorales son más cortos que los de las células epidérmicas. Las lesiones en las que el cociente es >1 son aquellas en las que los telómeros de las células tumorales son más largos que los de las células epidérmicas.

El valor de la intensidad media fluorescente de las señales se relaciona directamente con la longitud de los telómeros. El grupo de lesiones melanocíticas en el que se constata un mayor acortamiento en la longitud de los telómeros de las células tumorales son los melanomas sin regresión, seguidos por los nevos con displasia convencional y regresión. Por el contrario, las lesiones que mejor conservan la longitud de los telómeros en sus células tumorales son los nevos sin displasia con regresión. En relación a la longitud de los telómeros de las células epidérmicas adyacentes, los nevos con displasia convencional y regresión son los que tienen unos telómeros más cortos (intensidad de la señal un 38,1% menor que la que se observa en aquellas lesiones que mejor preservan los telómeros de las células epidérmicas, que son los nevos con displasia severa).

Cuando se realiza el cociente entre la intensidad media de las señales de las células tumorales y la de las epidérmicas para corregir la variabilidad de la hibridación, como se aprecia en la **tabla 3.53** y en la **figura 3.17**, los melanomas sin regresión y los nevos con displasia severa y regresión son las lesiones con un mayor acortamiento de los telómeros en las células tumorales respecto a sus propias células epidérmicas.

Los melanomas con regresión y los nevos con displasia convencional y regresión son las lesiones que muestran menos diferencias en la longitud de los telómeros de las células tumorales y de las células epidérmicas adyacentes, aunque la longitud es discretamente mayor en las células epidérmicas en ambos casos.

A pesar de estos hallazgos, la longitud de los telómeros de las células tumorales y de las epidérmicas no muestra diferencias estadísticamente significativas en función del tipo de lesión melanocítica evaluada (**figura 3.18**).

B. Evaluación del coeficiente de variación de los telómeros.

Coeficiente de variación de los telómeros (tabla 3.54):

Coeficiente de variación			
	n	Media	Rango promedio
Melanomas sin regresión	14	0,44	45,50
Melanomas con regresión	19	0,28	30,79
Nevus displásicos con regresión	20	0,29	31,35
Nevus sin displasia con regresión	15	0,37	33,13

p=0,13

El coeficiente de variación mide la dispersión respecto a la media de las intensidades fluorescentes de las señales de las células tumorales, reflejando la homogeneidad o heterogeneidad de las mismas. Este coeficiente se ha calculado realizando el cociente entre la desviación típica y la media.

Como muestra la **tabla 3.54**, los melanomas con regresión tienen una heterogeneidad de sus telómeros que prácticamente es análoga a la de las lesiones benignas con regresión (nevus displásicos y no displásicos). Por el contrario, los melanomas sin regresión son las lesiones que muestran una mayor heterogeneidad en la longitud de sus telómeros, muy superior a la del resto de lesiones melanocíticas con regresión. A pesar de estos hallazgos, el estudio estadístico de los distintos tipos de lesiones por separado no permite establecer que esas diferencias sean significativas ($p=0,13$).

Al estudiar las asociaciones entre los melanomas sin regresión (n=14) y el resto de lesiones con regresión agrupadas (n=54), se obtiene que los melanomas sin regresión tienen un coeficiente de variación medio de sus telómeros de 0,44 (IC 95%: 0,34-0,54), superior al conjunto de lesiones melanocíticas con regresión (0,31; IC 95%: 0,24-0,38), diferencias que sí son estadísticamente significativas (p=0,020). Por tanto, la longitud de los telómeros de las células tumorales de los melanomas sin regresión es más heterogénea que la de las lesiones melanocíticas con regresión (**tabla 3.55**).

Coefficiente de variación de los telómeros (tabla 3.55).

Coefficiente de variación				
	n	Media	IC 95%	p
Melanomas sin regresión	14	0,44±0,046	0,34-0,57	
Resto de lesiones con regresión	54	0,31±0,036	0,24-0,38	
				0,020

En base a estos resultados, se puede establecer que existe una asociación que es estadísticamente significativa entre la presencia de regresión en una lesión melanocítica y una menor heterogeneidad en la longitud de los telómeros de las células tumorales que la constituyen.

3.2.2.2. COMPARACIONES ENTRE LOS MELANOMAS CON Y SIN REGRESIÓN.

A. Medición de la intensidad media de las señales teloméricas.

La intensidad media de las señales en las células tumorales, en las células epidérmicas, y el cociente entre ambas fue el siguiente (tabla 3.56):

		Tumor (señales/célula)	Epidermis (señales/célula)	Cociente Tumor/Epidermis
Melanomas sin regresión	14	9,30±3,81	13,34±10,72	0,69
Melanomas con regresión	19	10,45±5,27	10,00±6,46	1,04
p		p=0,74	p=0,36	p=0,16

La intensidad media de las señales en las células tumorales de los melanomas sin regresión fue de 9,30, considerablemente inferior a la de las células epidérmicas adyacentes (13,34). Dado que el valor de la intensidad media de las señales se correlaciona con la longitud de los telómeros, se puede aseverar que los telómeros de las células neoplásicas de los melanomas sin regresión son más cortos que los de las células epidérmicas adyacentes (intensidad media un 30,2% menor).

La intensidad media de las señales en las células tumorales de los melanomas con regresión fue de 10,45, ligeramente superior a la de las células epidérmicas adyacentes (10,00). Por tanto, los telómeros de las células tumorales de los melanomas con regresión son ligeramente más largos que los de las células epidérmicas adyacentes (intensidad media un 4,3% mayor).

El cociente entre la intensidad media de las señales en las células tumorales y la de las células epidérmicas adyacentes fue <1 en los melanomas con regresión (0,69), y >1 en aquellos sin regresión (1,04).

A pesar de la magnitud de alguna de las diferencias observadas, el estudio estadístico no permitiría establecer que éstas sean significativas.

B. Evaluación del coeficiente de variación de los telómeros.

Coefficiente de variación de los telómeros (tabla 3.57):

Coefficiente de variación				
	n	Media	Desviación típica	p
Melanomas sin regresión	14	0,44	0,17	
Melanomas con regresión	19	0,28	0,18	
				0,024

Las células tumorales de los melanomas sin regresión (n=14) tienen un coeficiente de variación medio de 0,44, mientras que el de los melanomas con regresión (n=19) es de 0,28. Por tanto, la longitud de los telómeros de las células tumorales de los melanomas sin regresión es más heterogénea que la de los melanomas con regresión.

El coeficiente de variación de los telómeros sí muestra diferencias estadísticamente significativas al comparar los melanomas con regresión y los melanomas sin regresión (p=0,024), que se traducen en que a mayor heterogeneidad en la longitud de los telómeros de las células neoplásicas que los constituyen, existe una menor probabilidad de que nos hallemos ante un melanoma en regresión espontánea.

3.2.2.3. COMPARACIONES EXCLUSIVAMENTE ENTRE LAS DISTINTAS LESIONES MELANOCÍTICAS CON REGRESIÓN.

A. Medición de la intensidad media de las señales teloméricas.

Diferencias en la intensidad media de las señales teloméricas en función del tipo de lesión melanocítica con regresión estudiada (tabla 3.58):

		Tumor Intensidad/célula	Epidermis Intensidad/célula	Cociente Tumor/Epidermis
Melanomas con regresión	19	10,45±5,27	10,00±6,46	1,04
Nevus con displasia severa y regresión	10	11,95±7,81	15,56±3,74	0,76
Nevus con displasia convencional y regr.	10	9,83±4,10	9,63±3,74	1,02
Nevus sin displasia y regresión	15	12,08±3,56	13,02±6,10	0,92
		p=0,30	p=0,11	p=0,82

El grupo de lesiones melanocíticas con regresión en el que se constata un mayor acortamiento en la longitud de los telómeros de las células tumorales son los nevos con displasia convencional, que presentan una intensidad media de las señales de los telómeros un 18,6% más corta que la de las lesiones que mejor conservan la longitud de los telómeros en sus células tumorales, que son los nevos sin displasia. En relación a la longitud de los telómeros de las células epidérmicas adyacentes, los nevos con displasia convencional son los que tienen unos telómeros más cortos, intensidad un 38,1% menor que la que se observa en aquellas lesiones que mejor preservan los telómeros de las células epidérmicas, que son los nevos melanocíticos con displasia severa.

Los melanomas y los nevos con displasia convencional son las lesiones que muestran menos diferencias en la longitud de los telómeros de las células tumorales y de las células epidérmicas adyacentes, aunque la longitud es discretamente mayor en las células epidérmicas en ambos casos.

Ninguna de las diferencias halladas alcanza la significación estadística, aunque en algunos casos son sustanciales.

B. Evaluación del coeficiente de variación de los telómeros.

Coeficiente de variación de los telómeros (tabla 3.59):

	Coeficiente de variación			p
	n	Media	Rango promedio	
Melanomas con regresión	19	0,28	30,79	
Nevus displásicos con regresión	20	0,29	31,35	
Nevus sin displasia con regresión	15	0,37	33,13	
				NS

Al evaluar si existen diferencias en el coeficiente de variación de los telómeros de las distintas lesiones melanocíticas con regresión no se objetivan diferencias estadísticamente significativas, ya que las medias y los rangos promedio que se obtienen son muy similares.

3.2.3. DISCUSIÓN

La longitud de los telómeros se ha implicado como un regulador crítico de la capacidad de las células para dividirse, y constituye un instrumento muy valioso para estudiar la relación de éstos con el cáncer, la senescencia, y otros eventos que influyen en la longevidad genética. La determinación de la longitud de los telómeros se considera actualmente el método más rápido y efectivo para cuantificar células senescentes^{392,393}.

La senescencia celular es el proceso iniciado como respuesta al estrés y daño ocurrido en una célula, y constituye una ruta alternativa de respuesta a la muerte celular programada^{394,395}. Es un proceso que se inicia por distintos estímulos, entre los que se encuentran el estrés oxidativo y diversos oncogenes, que convergen en un acortamiento de los telómeros, debido a la ausencia de telomerasa en la mayoría de células somáticas. La disfunción telomérica inicia la senescencia al activar una señal de daño genético persistente, y es de vital importancia para suprimir la formación de células cancerígenas, pero también se asocia a la inflamación y reparación de tejidos, procesos que se relacionan con el desarrollo de tumores. Por tanto, la senescencia celular influye tanto en procesos de supresión como de promoción de tumores³⁹⁶.

El acortamiento de los telómeros es una de las principales manifestaciones genéticas en los cánceres humanos, ya que se ha visto que el agotamiento telomérico desempeña un rol fundamental en inducir inestabilidad cromosómica y en contribuir a la progresión tumoral^{166-168,397-399}. El hallazgo de unos telómeros cortos es uno de los cambios moleculares más precoces en la carcinogénesis, por lo que la longitud del telómero se ha usado como biomarcador para predecir el riesgo de desarrollar un cáncer.

Por otro lado, también se ha propuesto que el acortamiento de los telómeros ha evolucionado como un mecanismo de supresión tumoral^{170,400}. La senescencia celular que se produce por el agotamiento de los telómeros constituye un mecanismo de protección que impide la proliferación de células potencialmente cancerígenas, y que también actúa como un sistema de defensa frente a la progresión tumoral.

El acortamiento de los telómeros ocurre tras cada división celular en las células somáticas normales debido a que las enzimas ADN polimerasas no son capaces de replicar de forma completa los extremos de los cromosomas. La activación de la vía de respuesta al daño del ADN, que conduce a senescencia celular o apoptosis, ocurre si los telómeros se acortan por debajo de una longitud crítica¹⁷⁰. En las células germinales,

ciertas células madre, y células somáticas altamente proliferativas, la longitud de los telómeros se mantiene larga como resultado de complejos mecanismos regulatorios, entre los que destaca la sobrerregulación de telomerasa ^{164,401,402}. La integridad de la telomerasa en esas células es esencial para soportar su extenso potencial replicativo. De forma similar, la mayoría de los cánceres humanos sobrerregulan la expresión de la telomerasa ^{164,165,169}.

Las mutaciones en los genes p53, Rb (Retinoblastoma) o la adición de secuencias de ADN virales puede conferir a la célula la capacidad de eludir las señales de daño celular. Las mutaciones producidas en genes que actúan detectando anomalías cromosómicas o regulando el ciclo celular pueden permitir a una población clonal escapar de la senescencia y continuar proliferando, causando pérdidas teloméricas continuas, inestabilidad cromosómica y fusiones término-terminales, originando una crisis. La mayor parte de las células que padecen una crisis mueren, mientras que una pequeña subpoblación de células con defectos cromosómicos sobreviviría a la misma y renovarían la producción de telomerasa, con la consiguiente estabilización de sus telómeros, lo que originaría una proliferación celular indefinida.

Además de la división celular, otro de los mecanismos que también conducen al acortamiento de los telómeros es el estrés oxidativo que se produce como consecuencia del daño celular ^{392,403}. Dado que el sistema inmunitario desempeña un papel fundamental en la regresión, es posible que el ataque desencadenado por los infiltrados linfocitarios sobre las células tumorales también provoque daños colaterales en las células epidérmicas colindantes, que podrían inducir un acortamiento de sus telómeros. Al igual que sucede con las células tumorales, unos telómeros cortos también pueden inducir una detención del crecimiento celular y senescencia en las células epiteliales.

Por tanto, se puede especular con que dos mecanismos fundamentales provocarían el acortamiento de los telómeros e inducirían senescencia en los melanocitos tumorales y en las células epidérmicas de las lesiones melanocíticas en las que se objetiva regresión; por un lado, las sucesivas divisiones celulares y por el otro, el estrés oxidativo generado por el ataque inmunitario. Estos mecanismos pueden coincidir de forma simultánea en una misma lesión.

Hipotéticamente, cuanta más capacidad de dividirse tenga la célula, más cortos serán sus telómeros. La excepción a esta circunstancia se daría en algunos melanomas si

tienen la capacidad de sobrerregular telomerasa, circunstancia que suele producirse en fases avanzadas de la evolución de la neoplasia.

La respuesta del sistema inmunitario estaría condicionada por dos factores esenciales. Por un lado, por la presencia de antígenos con capacidad inmunogénica. Cuantos más antígenos de este tipo tenga la lesión, más capacidad tendrá para originar una respuesta inmune. Es de esperar que los melanomas y los nevos con displasia severa, que son las lesiones que acumulan un mayor número de mutaciones, sean las que induzcan con más facilidad una respuesta linfocitaria, como de hecho confirmaban los resultados del apartado histológico (son las lesiones con más densidad de linfocitos). Por otro lado, por la capacidad del huésped para desarrollar una respuesta inmunitaria eficaz. Cuanto más potente sea la respuesta inmune desarrollada por el huésped, mayor destrucción y más daño oxidativo se originará, por lo que cabría esperar una mayor reducción en la longitud de los telómeros de las células afectadas. Esta circunstancia es más difícil de preveer, ya que existen notables variaciones interpersonales, que tienen que ver fundamentalmente con el individuo más que con la naturaleza de la lesión. La ausencia de signos histológicos de regresión que se objetiva en más del 70% de los melanomas, o la existencia de una respuesta inmunitaria muy potente frente a lesiones no atípicas, como sucede con los halo nevos, serían dos ejemplos representativos de esta variabilidad.

En cuanto a las células epiteliales, la senescencia se puede inducir por mecanismos relacionados con la edad del individuo (número de divisiones celulares), o por el estrés oxidativo producido por factores como la exposición a la radiación ultravioleta o la magnitud y proximidad de la respuesta citotóxica que se origina frente a las células tumorales, que puede condicionar la existencia de daños colaterales en las células colindantes⁴⁰⁴. En las lesiones melanocíticas las células epiteliales están, por lo general, muy próximas a los melanocitos tumorales que expresan los antígenos que atraen a los infiltrados linfocitarios. Corroborando esta idea, como se ha visto ampliamente, la regresión en el melanoma es mucho más frecuente en la fase de crecimiento radial que en la vertical⁵².

La presencia de anomalías cromosómicas groseras puede ser la evidencia de que la neoplasia se dirige hacia una crisis. Del mismo modo, el acortamiento de los telómeros y un coeficiente de variación elevado de los mismos, que implica una mayor heterogeneidad, también puede ser la antesala de que el tumor se dirige hacia una crisis,

que puede culminar con la destrucción de parte de sus células y una reestructuración del genoma de las células supervivientes.

Melanomas

Melanomas con regresión

En los melanomas con regresión existe una longitud telomérica acortada, prácticamente en la misma proporción, tanto en las células del tumor como en las de la epidermis (cociente=1,04). Se puede especular que la participación del sistema inmune induciría un daño tanto en los melanocitos tumorales como en los queratinocitos adyacentes, que provocaría un acortamiento de los telómeros en las dos poblaciones celulares.

Apoyando alguna de las ideas mencionadas anteriormente, en los melanomas con regresión los telómeros son más cortos en las células tumorales (señal un 13,4% menor) y en las epidérmicas (señal un 23,1% menor) que en los nevos sin displasia con regresión, probablemente porque el daño debido a la respuesta inflamatoria es mucho mayor en melanomas que en nevos, ya que el número de antígenos capaces de inducir una activación de la respuesta inmunitaria es superior en el melanoma. Por otro lado, el que la longitud de los telómeros de las células tumorales sea más larga que la de las epidérmicas (los melanomas con regresión tienen una intensidad media de la señal de los telómeros un 4,3% mayor en las células tumorales que en las epidérmicas) quizás pueda deberse a la sobreexpresión de telomerasa por las células tumorales, circunstancia que puede producirse en melanomas pero de forma infrecuente en nevos melanocíticos

En base a los resultados, se puede establecer que existe una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de regresión en un melanoma y el coeficiente de variación de la longitud de los telómeros de sus células neoplásicas, de modo que cuanto más homogénea sea la longitud de los telómeros de las células tumorales, es más probable que exista evidencia histológica de regresión, y cuanto más heterogénea sea dicha longitud, será más probable que el melanoma no muestre signos histológicos de regresión.

En los melanomas con regresión, las células neoplásicas que escapan de la destrucción inmune presentan una homogeneidad de sus telómeros que prácticamente es análoga a

la de los nevos comunes y nevos displásicos. Como en los melanomas sin regresión el coeficiente de variación es superior, reflejo de unos telómeros más heterogéneos, se puede especular que las células tumorales eliminadas quizás son las que presentaban las mayores anomalías cromosómicas y por tanto las mayores variaciones en la longitud telomérica. Las células tumorales supervivientes constituirían una población más homogénea, que podría restaurar los telómeros de manera uniforme mediante sobreexpresión de telomerasa, lo que permitiría adquirir un genoma más estable.

Melanomas sin regresión

En los melanomas en los que no hay regresión, se aprecia la mayor diferencia entre la intensidad media de las señales de las células tumorales y la de las células epidérmicas (un 30,2% menor en las células tumorales que en las epidérmicas). Esta circunstancia podría justificarse por la distinta capacidad de proliferación de las dos poblaciones celulares. Al tratarse de células de melanoma tienen una capacidad de proliferar muy superior a la de los queratinocitos, que conllevaría un mayor desgaste de sus telómeros. Aunque las células tumorales de los melanomas sin regresión presentan una marcada reducción de los telómeros respecto a las células epidérmicas adyacentes (cociente=0,69), y también respecto a las células tumorales de los melanomas con regresión (intensidad media de las señales un 11% menor), el estudio estadístico no permite corroborar esas diferencias, probablemente debido al tamaño de la muestra.

En este grupo de lesiones se podría plantear que el acortamiento de los telómeros se produciría exclusivamente como consecuencia de las sucesivas divisiones celulares. Al no haber participación del sistema inmunitario, los queratinocitos epidérmicos colindantes resultarían indemnes y conseguirían de este modo preservar sus telómeros, con lo cual no presentarían un acortamiento telomérico equiparable al de las células epidérmicas de los melanomas con regresión.

Los telómeros son más cortos y más heterogéneos (tienen un coeficiente de variación mayor) en las células tumorales de los melanomas sin regresión cuando se comparan con los melanomas con regresión, señal de que la regresión puede haber provocado un reordenamiento del genoma de las células supervivientes, quizás desencadenado por una “crisis” previa, en la que se pueden haber eliminado las células más inestables y seleccionado clones de células más estables.

Nevos melanocíticos

Nevos con displasia severa y regresión

Dentro de los nevos melanocíticos, la mayor diferencia entre la longitud de los telómeros de las células tumorales y la de las epidérmicas se constata en los nevos con displasia severa y regresión. La intensidad media de las señales es un 23,2% menor en las células tumorales que en las epidérmicas. Al compararlos con el resto de lesiones con regresión, si se corrige la variabilidad de la hibridación realizando el cociente entre la intensidad media de las señales de las células tumorales y la de las epidérmicas, que sirven como control interno en cada caso, sólo los nevos con displasia severa y regresión muestran una reducción clara de la longitud telomérica de las células neoplásicas respecto a las células controles (cociente=0,76).

En esta variedad de lesiones melanocíticas, que son las lesiones benignas potencialmente más peligrosas, además de la respuesta inmune, que dañaría tanto a las células tumorales como a las epidérmicas, la reducción adicional de la longitud de los telómeros de las células tumorales quizás puede producirse para evitar su transformación en melanomas, al inducirse la senescencia de las células con potencial riesgo de malignización.

La existencia de unos telómeros muy cortos constituye una frecuente alteración genética en lesiones premalignas^{167,388,406}. Del mismo modo, la disfunción telomérica también se asocia a anomalías genéticas severas y es un evento precoz en la carcinogénesis⁴⁰⁷.

El acortamiento de los telómeros en ausencia de otras alteraciones constituye un potente mecanismo de supresión de tumores, ya que el propósito biológico de la senescencia replicativa es bloquear la capacidad de dividirse de las células premalignas³⁸⁸.

La senescencia celular impide la proliferación de células potencialmente cancerígenas, ya que cuando se encuentra en este estado la célula deja de dividirse, manteniéndose en un estado premaligno³⁸⁴, pero también actúa como un mecanismo de defensa frente a la progresión tumoral. Sin embargo, cuando este freno no funciona correctamente, por ejemplo por mutaciones oncogénicas que afecten a las señales de daño celular, se puede producir la transformación maligna o la progresión del tumor³⁸⁸.

Por este motivo, es de esperar que los telómeros de las células que integran los nevos con displasia severa sean mucho más cortos que los del resto de lesiones,

independientemente de que el ataque generado por los linfocitos citotóxicos pueda inducir un acortamiento adicional.

Las diferencias que se constatan con los melanomas con regresión, que son lesiones con una capacidad similar de activar la respuesta inmune, se podrían deber a que en este caso, las células displásicas son incapaces de restituir los telómeros como sucede en las del melanoma, ya que no disponen de la misma actividad de telomerasa^{408,409}.

Nevos con displasia convencional y regresión

Los nevos con displasia convencional y regresión son el grupo de lesiones en las que la longitud de los telómeros de las células tumorales muestra menos diferencias en relación a la de las células epidérmicas (cociente=1,02). Al no ser lesiones con tanto riesgo de desarrollar un melanoma no se activaría una respuesta inmune tan intensa como en los melanomas o en los nevos con displasia severa, ni se forzaría la senescencia como en los nevos con displasia severa.

Como sucede con el resto de lesiones con regresión, el acortamiento que experimentan los telómeros de las células epidérmicas se debería a que sufrirían los daños colaterales del ataque inducido por el sistema inmunitario.

Nevos sin displasia y regresión

En los nevos sin displasia, al igual que sucedía con los nevos con displasia convencional, tampoco existen prácticamente diferencias entre la longitud de los telómeros de las células tumorales y la de las células epidérmicas (cociente=0,92). Al tratarse de células sin displasia, es de esperar que la respuesta inmunitaria no sea tan intensa como la que se desencadena frente a melanomas, y que se destruya de forma casi equitativa a las células tumorales y a las epidérmicas.

El valor medio de la intensidad de las señales de las células tumorales es el más elevado de todos los tipos de tumores estudiados. Los nevos sin displasia son las lesiones que más largos tienen los telómeros de sus melanocitos tumorales supervivientes, con una intensidad media de las señales un 13,4% mayor que la de los melanomas con regresión y un 23% superior que la de los melanomas sin regresión. Esta circunstancia podría justificarse dado que al tratarse de nevos sin displasia están constituidos por células que

son tanto morfológica como molecularmente idénticas a los melanocitos normales, por lo que son las que mejor preservarían sus telómeros ya que no proliferarían del mismo modo que las células displásicas o malignas.

En general, las células neoplásicas tienen unos telómeros más cortos comparados con los tejidos normales de los que derivan, probablemente porque la división celular activa ocurre en la fase de iniciación del tumor, antes de la sobrerregulación del gen de la telomerasa¹⁷⁰. A medida que aumenta el tiempo de evolución de la neoplasia las células tumorales de muchos tipos de cánceres tienen la capacidad de restaurar parcialmente la longitud de sus telómeros gracias a la telomerasa³⁸⁸.

Principales diferencias entre los telómeros de los melanomas con y sin regresión.

Los **melanomas sin regresión** tienen unos telómeros de sus células neoplásicas más cortos y heterogéneos que los melanomas con regresión. Dado que las “crisis” se relacionan con unos telómeros muy cortos y heterogéneos, se puede especular que quizás los melanomas en los que no se constata regresión, al estar constituidos por células genéticamente más “inestables”, tienen más probabilidades de dirigirse hacia una “crisis”.

Por el contrario, los **melanomas con regresión** tienen los telómeros de sus células neoplásicas más largos y más homogéneos que los de los melanomas sin regresión. Esta circunstancia plantearía dos posibilidades; por un lado, que exista una menor probabilidad de que el melanoma con regresión se dirija a una “crisis”, ya que genéticamente se trata de una lesión relativamente estable, y por el otro, que nos hallemos ante células supervivientes de una “crisis” previa.

La homogeneidad de la longitud de los telómeros en los melanomas con regresión es equiparable a la de los nevos melanocíticos comunes y displásicos que también presentan regresión, circunstancia que sugeriría que la regresión lleva implícita una reestructuración del genoma, originando la selección de clones de células supervivientes con unos telómeros más estables.

Por tanto, la disminución de la longitud de los telómeros y el aumento de su heterogeneidad puede originar una crisis y favorecer la regresión de los melanomas.

Vías moleculares que inducen senescencia

Las señales de daño más conocidas que inician la senescencia en células humanas involucrarían mecanismos moleculares comunes mediados por p53 y p21 (la más conocida), así como también por la vía del retinoblastoma y p16, que induce senescencia de forma más rápida^{403,410}.

El inhibidor de quinasa dependiente de ciclina CDKN2A, también denominado p16, es una proteína supresora de tumores codificada por el gen CDKN2A, que desempeña un papel importante en la regulación del ciclo celular. Las mutaciones en p16 aumentan el riesgo de desarrollar diversos cánceres, especialmente melanomas, ya que se produce una abolición de la senescencia celular⁴¹¹. La expresión de p16 se reduce gradualmente a medida que aumenta el grado de atipia de los melanocitos, y su expresión también es menor en melanomas metastásicos que en aquellos sin metástasis. Por tanto, los melanomas que pierden p16 tienen mayor capacidad de producir metástasis y matar más rápidamente⁴¹². La forma más habitual de senescencia en melanocitos humanos en cultivo involucra a p16, ya que se requiere tanto una disfunción de la vía retinoblastoma-p16 como la activación de telomerasa para la inmortalización de las células. Se ha constatado que las mutaciones oncogénicas de BRAF, presentes en aproximadamente la mitad de todos los casos de melanoma y en un 80% de nevos melanocíticos pueden inducir en los melanocitos humanos la expresión de p16, pero no de p21. En los nevos comunes la senescencia está relacionada con la sobreexpresión de p16, y no requiere de una sobrerregulación de p53 o p21. Por el contrario, los nevos displásicos y melanomas en fase de crecimiento radial muestran menos expresión de p16 y, a diferencia de lo que sucedía con los nevos comunes, se aprecia expresión de p53 y p21. Los melanomas en fase de crecimiento vertical pierden tanto p16 como p21, lo que provocaría un mecanismo de escape a las dos formas de senescencia y sería una de las justificaciones de su peor pronóstico⁴¹⁰.

Resumen

Como limitación de este trabajo, no se puede saber cuál era el estado de los telómeros en las células que ya han sido eliminadas. En función de los resultados, se podría especular que las células que el sistema inmunitario tiene más facilidad para eliminar quizás son aquellas con los telómeros más heterogéneos y cortos de los melanomas en los que se objetiva regresión, que son genéticamente las más inestables y las que se dirigen a, o se encuentran en una “crisis”. Debido a la destrucción celular inducida por el infiltrado linfocitario se generarían cuerpos apoptóticos, que constituyen un potente estímulo que atraería al sistema inmune, por lo que se potenciaría aún más la respuesta inmunitaria. El infiltrado linfocitario destruiría las células que expresan los antígenos “diana”, pero los queratinocitos epidérmicos adyacentes sufrirían los daños colaterales de ese ataque inmune y también verían como se acortan sus telómeros por mecanismos como el estrés oxidativo.

El acortamiento de los telómeros sí parece estar en relación con la presencia o ausencia de regresión en la lesión. Los melanomas sin regresión tienen los telómeros más cortos que los melanomas con regresión, tanto si se considera de forma exclusiva el valor de la intensidad media de las señales en las células tumorales como cuando se corrige la variabilidad de la hibridación, realizando el cociente entre la intensidad media de las señales de las células tumorales y la de las epidérmicas.

La heterogeneidad de la longitud de los telómeros, que estaría reflejada por el coeficiente de variación, también parece estar en relación con la presencia o ausencia de regresión en la lesión, pero no con el grado de atipia de la misma. El coeficiente de variación de los telómeros muestra diferencias que son estadísticamente significativas entre los melanomas con y sin regresión. Por el contrario, el coeficiente de variación de los telómeros prácticamente no muestra diferencias al comparar las distintas lesiones melanocíticas con regresión entre sí (melanomas, nevos displásicos y nevos sin displasia).

La regresión inducida por un mecanismo de senescencia debido al acortamiento de los telómeros complementaría a otros que también intentarían destruir el tumor, como la respuesta inmune, que probablemente actúen de forma sincrónica. El desarrollo y progresión del melanoma se vería favorecido por un fallo en estos mecanismos.

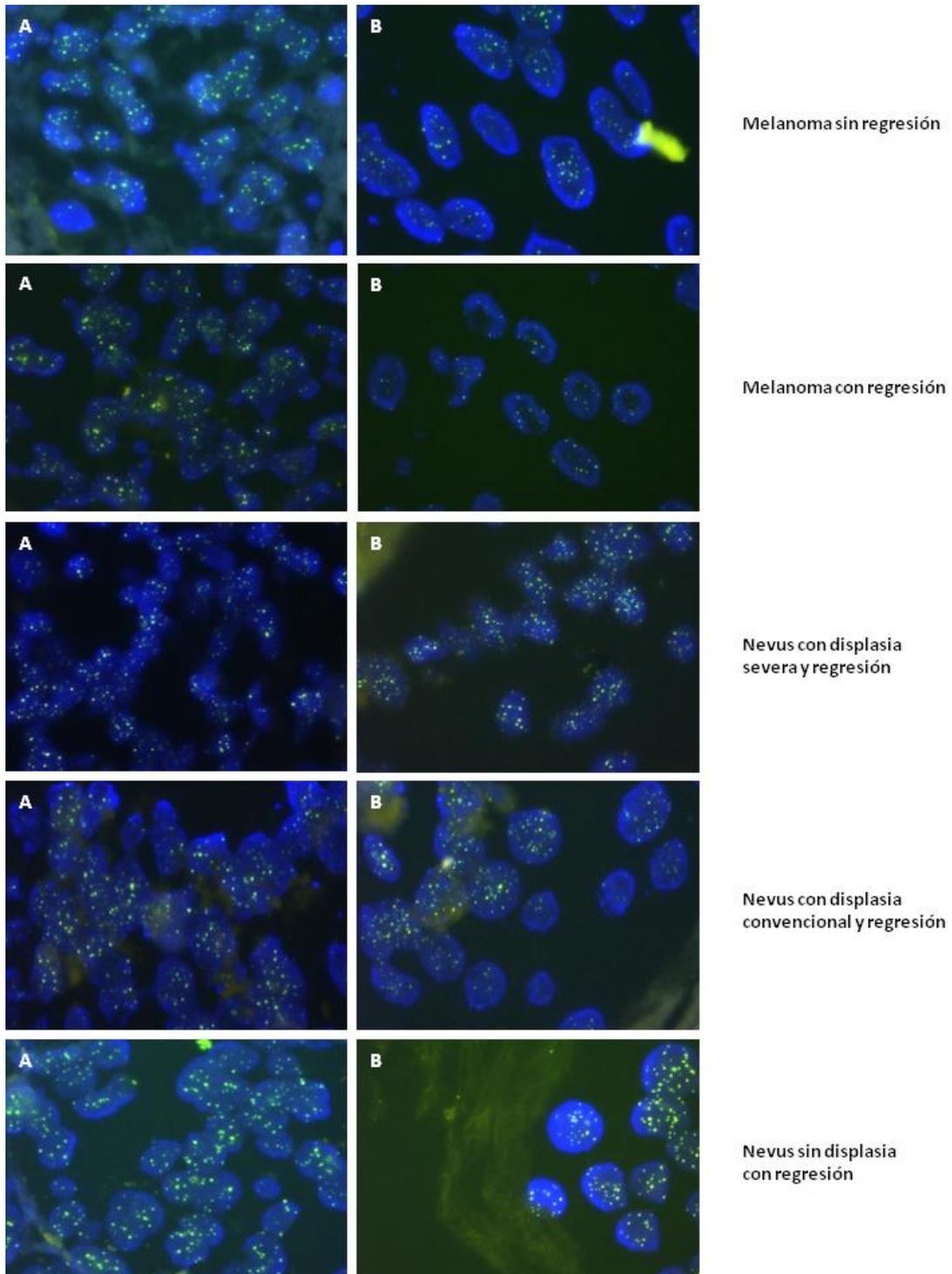


Figura 3.18. Los puntos fluorescentes representan las señales teloméricas en el interior de los núcleos teñidos con Dapi (color azul) de las células tumorales (A) y epidérmicas (B). Se ilustra un ejemplo de los distintos tipos de lesiones melanocíticas evaluadas.

3.3. PRONÓSTICO

Para establecer la asociación entre la presencia o ausencia de regresión en los melanomas y el pronóstico de los mismos, el número total de melanomas estudiados fue de 61, 47 con regresión (todos los melanomas con regresión del estudio clínico-patológico) y 14 sin regresión (los 14 melanomas sin regresión que se incluyeron de forma aleatoria en el estudio molecular).

En los 47 melanomas con regresión, la media del índice de Breslow fue de $0,82 \pm 1,20$, mientras que la de los 14 melanomas sin regresión fue de $1,09 \pm 1,47$. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Como se menciona en la metodología, a efectos de la evaluación del pronóstico, el período de seguimiento de los pacientes incluidos en este estudio concluyó el 31 de diciembre de 2013. El tiempo medio de seguimiento de los 61 pacientes con melanoma fue de 6,2 años (rango de 4 a 10 años).

Nueve de los 61 pacientes con melanoma desarrolló metástasis (14,8% de los mismos). Por el contrario, un 85,2% (52 casos) estaban libres de enfermedad en la última revisión efectuada.

Del total de casos metastásicos, 6 fueron melanomas de extensión superficial, que corresponde a un 13,9% del total de melanomas de extensión superficial (6/43), y 3 fueron melanomas nodulares, un 100% de los melanomas nodulares (3/3).

Las metástasis fueron viscerales en 7 pacientes, ganglionares en uno, y en un caso se objetivaron tanto ganglionares como viscerales. Fallecieron un total de 6 pacientes por metástasis de melanoma. Otros 3 pacientes también fallecieron, pero por motivos ajenos al melanoma.

En cuanto a los melanomas con regresión, 30/47 casos (63,8%) se hallaban en fase de crecimiento radial, y 17/47 (36,2%) casos estaban en fase de crecimiento vertical. Estos hallazgos sugerirían que la regresión se asocia en el melanoma de forma mucho más consistente a la fase de crecimiento radial, o lo que es lo mismo, a la fase de crecimiento precoz y a la que tiene menor riesgo de diseminación. Estos resultados están en concordancia con lo que se ha descrito en la literatura hasta la fecha, y también justificarían que se produzca una activación precoz de la respuesta inmune.

De los 9 melanomas que originaron metástasis, uno estaba en fase de crecimiento radial, que corresponde a un 2,9% de los melanomas en fase de crecimiento radial (1/34), y 8 en fase vertical. El único caso en que el melanoma estaba en fase de crecimiento radial y originó metástasis fue un melanoma de extensión superficial con un índice de Breslow

de 1,04 mm, que también es el único caso que de forma exclusiva presentó metástasis ganglionares. Este es un hecho excepcional, dado que el melanoma en fase de crecimiento radial sólo produce metástasis de forma muy rara.

Por el contrario, un 29,6% de los melanomas en fase de crecimiento vertical (8/27) originó metástasis. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,004$).

3.3.1. Asociación entre la presencia o ausencia de regresión en los melanomas y el pronóstico (tabla 3.60).

	SIN REGRESIÓN		CON REGRESIÓN		p
	Número	%	Número	%	
Metástasis	3/14	21,4	6/47	12,8	
Libre de enfermedad	11/14	78,6	41/47	87,2	
					0,42

La incidencia de metástasis en los 47 pacientes con melanomas con regresión ha sido un 8,6% menor que la de los 14 pacientes con melanomas sin regresión. Por tanto, en función de estos resultados parece que la regresión reduce ligeramente la probabilidad de desarrollar metástasis, aunque las diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0,42$). También hay que considerar que el índice de Breslow medio de los 14 melanomas sin regresión es 0,29 mm mayor que el de los 47 melanomas con regresión, lo que también podría justificar la existencia de un mayor número de casos que desarrollen metástasis.

En cualquier caso, en base a estos resultados y como sugieren numerosos estudios mencionados en la introducción ⁵¹⁻⁶⁰, parece que la regresión en el melanoma no constituye un factor que condicione un empeoramiento del pronóstico del paciente.

3.3.2. Asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos y el pronóstico.

Los marcadores inmunohistoquímicos se hicieron sólo en los 47 melanomas del estudio clínico-patológico, aunque se han perdido entre 3 y 5 casos por distintos problemas técnicos (tabla 3.61).

		Número	Rango promedio	p
Granzima B	Metástasis	5/44	22,0	
	Libre de enfermedad	39/44	22,5	0,92
CD4	Metástasis	5/44	23,2	
	Libre de enfermedad	39/44	22,4	0,89
CD8	Metástasis	5/44	21,8	
	Libre de enfermedad	39/44	22,5	0,91
FoxP3	Metástasis	5/44	25,4	
	Libre de enfermedad	39/44	22,1	0,61
CD25	Metástasis	5/44	28,1	
	Libre de enfermedad	39/44	21,7	0,31

L-Fas

	Mayoritario		Minoritario		p
	Número	%	Número	%	
Metástasis	3/5	60	2/5	40	
Libre de enfermedad	33/37	89,2	4/37	10,8	
					0,14

Al analizar las asociaciones entre los distintos marcadores inmunohistoquímicos y el pronóstico no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas.

Algunos estudios han evidenciado una reducción de células CD8+ y granzima B+ con la progresión tumoral, con valores significativamente más elevados en los melanomas en fase de crecimiento radial respecto a los melanomas en fase de crecimiento vertical y a las metástasis de melanoma. De forma adicional, los infiltrados linfocitarios CD8+ granzima B+ mostraron un aumento progresivo a medida que aumentaba el grado de atipia de la lesión ²⁷², circunstancia que como se aprecia en los resultados del apartado del estudio inmunohistoquímico, corrobora este trabajo.

También parece que algunos antígenos estimularían preferentemente los linfocitos Tregs, mientras que otros activarían subtipos de linfocitos infiltrantes diferentes, por mecanismos no del todo esclarecidos. Es un hecho contrastado que la presencia de linfocitos Tregs en el tumor puede provocar una reducción en el número de células efectoras y una alteración de su funcionabilidad, contribuyendo a la progresión en determinados melanomas. Una antigenicidad alterada de las células tumorales, con una expresión preferente de antígenos capaces de atraer linfocitos Tregs, podría ser uno de los mecanismos que permite escapar del sistema inmune a las células de melanoma. Se ha sugerido que la tolerancia inmunológica a las células del melanoma podría ocurrir en un momento muy precoz de la génesis del mismo ⁴¹³⁻⁴¹⁵.

Asociación entre distintos cocientes de los marcadores inmunohistoquímicos y el pronóstico.

Se han realizado varios cocientes entre los diferentes marcadores inmunohistoquímicos con la finalidad de estudiar la relación entre las distintas vías del sistema inmunitario y el riesgo de desarrollar metástasis. Los marcadores inmunohistoquímicos se evaluaron sólo en los 47 melanomas del estudio clínico-patológico, aunque se excluyeron los casos en los que el tejido tumoral incluido en la matriz tisular (TMA) fue insuficiente para la evaluación de la población linfocitaria.

Se han realizado los cocientes CD4/CD8 y CD4/granzima B como indicadores de la relación entre las vías colaboradora y citotóxica, el cociente CD8/FoxP3 como indicador de la relación entre las vías citotóxica y reguladora, y los cocientes CD8/granzima B, inmunomarcadores de citotoxicidad, y CD4/FoxP3 inmunomarcadores de regulación (tabla 3.62).

Cociente CD8/FoxP3			
	Número	Rango promedio	p
Metástasis	5/40	19,9	
Libre de enfermedad	35/40	20,5	0,90

Cociente CD8/Granzima B			
	Número	Rango promedio	p
Metástasis	4/41	19,0	
Libre de enfermedad	37/41	21,2	0,75

Cociente CD4/FoxP3

	Número	Rango promedio	p
Metástasis	5/40	17,7	
Libre de enfermedad	35/40	20,9	0,57

Cociente CD4/Granzima B

	Número	Rango promedio	p
Metástasis	4/41	15,7	
Libre de enfermedad	37/41	21,5	0,38

Cociente CD4/CD8

	Número	Rango promedio	p
Metástasis	4/41	18,2	
Libre de enfermedad	37/41	21,3	0,65

Al analizar las asociaciones entre el pronóstico y los distintos cocientes entre marcadores inmunohistoquímicos, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas, a diferencia de lo que han sugerido otros autores.

Algunos estudios han hallado una relación inversa entre el pronóstico y el número de células Tregs y de células efectoras. Un predominio de células Tregs CD25+FoxP3+ o una disminución en el cociente entre las células Tregs CD25+FoxP3+ y las células T citotóxicas se ha asociado con progresión tumoral y un peor pronóstico^{272,334}.

3.3.3. Asociación entre los telómeros y el pronóstico.

En el estudio molecular también se han analizado las asociaciones entre el pronóstico y diversas variables como el cociente entre la intensidad media de las señales de las células tumorales y el de las epidérmicas, y el coeficiente de variación de las señales de las células tumorales. Para ello se han usado los 33 melanomas que se emplearon para estudiar la longitud de los telómeros (19 con regresión y 14 sin regresión).

Asociación entre el cociente de la intensidad media de las señales teloméricas de las células tumorales y la de las epidérmicas y el pronóstico (tabla 3.63).

	Cociente de las señales	
	n	Media
Melanomas (metástasis)	6	0,75±0,55
Melanomas (libre de enfermedad)	27	1,21±0,62
p		0,67

A pesar de que los melanomas con una evolución clínica desfavorable tienen una longitud media de sus telómeros menor en las células tumorales que en las epidérmicas (cociente de la intensidad de las señales fluorescentes <1), y que en los melanomas que no han originado metástasis sucede lo contrario (cociente >1), estas diferencias no serían estadísticamente significativas.

Asociación entre el coeficiente de variación de las señales teloméricas de los melanomas incluidos en el estudio molecular y el pronóstico (tabla 3.64).

Coeficiente de variación de los telómeros		
	n	Media
Melanomas (metástasis)	6	0,46±0,25
Melanomas (libre de enfermedad)	27	0,32±0,17
p		0,34

A pesar de que los melanomas con una evolución clínica desfavorable tienen una longitud de sus telómeros más heterogénea que la de los melanomas que no han producido metástasis, estas diferencias no serían estadísticamente significativas.

El coeficiente de variación de los telómeros puede reflejar la historia proliferativa reciente de una línea celular determinada⁴⁰⁷. Una longitud telomérica uniforme entre las células sugeriría un origen clonal de las mismas. Por el contrario, una longitud heterogénea de los telómeros podría implicar la expansión de múltiples clones celulares, que podría afectar de forma desfavorable al pronóstico.

Aunque no existen estudios en melanomas, la heterogeneidad en la longitud de los telómeros se ha relacionado con un peor pronóstico en algunos tipos de cánceres, fundamentalmente en sarcomas y en tumores de células germinales⁴¹⁶⁻⁴¹⁸. Los melanomas que han originado metástasis en esta serie tienen los telómeros más cortos y más heterogéneos que los que han tenido una evolución clínica favorable. Estas dos características son propias de los melanomas sin regresión, que son las lesiones más inestables a nivel molecular, circunstancia que apoyaría la idea de que la regresión no condicionaría un empeoramiento del pronóstico en el melanoma.

La heterogeneidad de la longitud telomérica podría constituir un biomarcador de interés en la evaluación del pronóstico en pacientes con melanoma.

IV- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1- Los cambios histológicos que se aprecian en la regresión de las lesiones melanocíticas constituyen un espectro continuo y dinámico, con hallazgos diferentes e incluso solapados según la fase en que se evalúen.
- 2- La variable clínica más útil para establecer diferencias entre melanomas y nevos melanocíticos con regresión ha sido la edad. Los pacientes con melanoma tienen una edad mayor que aquellos con nevos melanocíticos, tanto convencionales como displásicos.
- 3- La regresión histológica es 8 veces más frecuente en melanomas que en nevos melanocíticos.
- 4- La intensidad de los cambios histológicos propios de la regresión se correlaciona con el grado de atipia melanocítica, siendo máxima en los melanomas, tanto en la fase destructiva (densidad linfocitaria, apoptosis y melanófagos), como en la reparativa (densidad microvascular y atrofia epidérmica).
- 5- La fibrosis laminar es más frecuente en los nevos melanocíticos; la fibrosis compacta prevalece de forma clara en los melanomas; y la fibrosis delicada es un hallazgo exclusivo de los nevos melanocíticos sin displasia.
- 6- Las características histopatológicas diferenciales de la regresión en melanomas y nevos melanocíticos no son concluyentes en los casos de nevos con displasia severa.
- 7- Existe un predominio de linfocitos T CD4+ en todos los tipos de lesiones melanocíticas en regresión. Aunque la magnitud de las diferencias no permite distinguir nevos de melanomas, se aprecia una tendencia a una mayor densidad de linfocitos T CD8+ a medida que aumenta la atipia histológica de los nevos melanocíticos.
- 8- El número de linfocitos que expresan FoxP3 y granzima B es significativamente mayor en los melanomas en comparación con los nevos melanocíticos.

- 9- En caso de regresión completa de una lesión melanocítica, una avanzada edad del paciente unida a la ausencia de fibrosis laminar y a una densidad elevada de melanófagos, de vasos y de linfocitos granzima B+, apoyaría el diagnóstico de melanoma.
- 10- Empleando la ecuación surgida del modelo final de regresión logística, que incluye las variables citadas en la conclusión número 9, la probabilidad de que una lesión melanocítica que haya experimentado una regresión completa sea un melanoma estaría entre un 81% y un 93%.
- 11- La longitud de los telómeros de los melanomas con regresión es más homogénea que la de los melanomas sin regresión, y análoga a la de los nevos melanocíticos con regresión.
- 12- Existe una tendencia a presentar telómeros más cortos y heterogéneos entre los melanomas que han desarrollado metástasis.
- 13- La heterogeneidad de la longitud telomérica podría constituir un biomarcador de interés en la evaluación del pronóstico en pacientes con melanoma.

V- BIBLIOGRAFÍA

- 1-Papac RJ. Spontaneous regression of cancer. *Cancer Treat Rev* 1996; 22: 395-423.
- 2-Caballos P, Barnhill R. Spontaneous regression of cutaneous tumors. *Adv Dermatol* 1993; 8: 229-61.
- 3-Chodorowski Z, Anand JS, Wisniewski M, Madalinski M, Wierzba K, Wisniewski J. Spontaneous regression of cancer. Review of cases from 1988 to 2006. *Przegl Lek* 2007; 64: 380-2.
- 4-Burstein HJ, Schwartz RS. Molecular origins of cancer. *N Engl J Med* 2008; 358: 527.
- 5-Papac RJ. Spontaneous regression of cancer: possible mechanisms. *In Vivo* 1998; 12: 571-8.
- 6-Elston DM. Mechanisms of regression. *Clin Med Res* 2004; 2: 85-8.
- 7-High WA, Steward D, Wilbers CR, Cockerell CJ, Hoang MP, Fitzpatrick JE. Completely regressed primary cutaneous malignant melanoma with nodal and/or visceral metastases: a report of 5 cases and assessment of the literature and diagnostic criteria. *J Am Acad Dermatol* 2005; 53: 89-100.
- 8-Berrocal A, Camps C, González JL, Guillem V, Martín S. *Tratado actualizado del melanoma*. Barcelona. Editorial Glosa. 2009
- 9-McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW. Prognosis in patients with thin malignant melanoma: influence of regression. *Histopathology* 1983; 7: 673-80.
- 10-Blessing K, McLaren KM. Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance. *Histopathology* 1992; 20: 315-22.
- 11-Emanuel PO, Mannion M, Phelps RG. Complete regression of primary malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 2008; 30: 178-81.
- 12-Vijuk G, Coates AS. Survival of patients with visceral metastatic melanoma from an occult primary lesion: a retrospective matched cohort study. *Ann Oncol* 1998; 9: 419-22.
- 13-Moretti S, Spallanzani A, Pinzi C, Prignano F, Fabbri P. Fibrosis in regressing melanoma versus nonfibrosis in halo nevus upon melanocyte disappearance: could it be related to a different cytokine microenvironment? *J Cutan Pathol* 2007; 34: 301-8.
- 14-King M, Spooner D, Rowlands DC. Spontaneous regression of metastatic malignant melanoma of the parotid gland and neck lymph nodes: a case report and a review of literature. *Clin Oncol* 2001; 13: 466-9.

- 15- Arpaia N, Cassano N, Vena GA. Regressing cutaneous malignant melanoma and vitiligo-like depigmentation. *Int J Dermatol* 2006; 45: 952-6.
- 16- Muniesa C, Ferreres JR, Moreno A, Marcoval J. Completely regressed primary cutaneous malignant melanoma with metastases. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2009; 23: 327-8.
- 17- Dudic Y. Spontaneous regression of cutaneous melanoma with subsequent metastasis. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60: 588-91.
- 18- Kalialis LV, Drzewiecki KT, Mohammadi M, Mehlsen AB, Klyver H. Spontaneous regression of metastases from malignant melanoma: a case report. *Melanoma Res* 2008; 18: 279-83.
- 19- Kalialis LV, Drzewiecki KT, Klyver H. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res* 2009; 19: 275-82.
- 20- Trau H, Kopf AW, Rigel DS, et al. Regression in malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8: 363-8.
- 21- Smith JL Jr, Stehlin JS Jr. Spontaneous regression of primary malignant melanomas with regional metastases. *Cancer* 1965; 18: 1399-1415.
- 22- Ronan SG, Han MC, Das Gupta TK. Histologic prognostic indicators in cutaneous malignant melanoma. *Semin Oncol* 1988; 15: 558-65.
- 23- Menzies SW, McCarthy WH. Complete regression of primary cutaneous malignant melanoma. *Arch Surg* 1997; 132: 553-6.
- 24- Shai A, Avinoach I, Sagi A. Metastatic malignant melanoma with spontaneous and complete regression of the primary lesion. Case report and review of the literature. *J Dermatol Surg Oncol* 1994; 20: 342-5.
- 25- Martín JM, Rubio M, Monteagudo C, Jordá E. Progressive depigmentation of a melanocytic lesion. A dermoscopic challenge for melanoma diagnosis. *Int J Dermatol* 2013; 52: 339-41.
- 26- Martín JM, Núñez J, López V, Rubio M, Monteagudo C, Jordá E. Estudio descriptivo dermatoscópico de los nevos melanocíticos con despigmentación sin halo clínico. *Actas Dermosifiliogr* 2011; 102: 344-53.
- 27- Requena C, Botella-Estrada R, Traves V, Nagore E, Almenar S, Guillén C. Regresión en el melanoma: problemas en su definición e implicación pronóstica. *Actas Dermosifilogr* 2009; 100: 759-66.
- 28- Calonje E, Brenn T, Lazar A, McKee PH. McKee's pathology of the skin. Fourth edition. London: Elsevier Saunders, 2012.

- 29- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velsulescu VE, Zhou S, Diaz Jr LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339: 1546-58.
- 30- Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol* 2002; 3: 999-1005.
- 31- Moreno C. Melanoma. *Oncología* 2004; 27: 99-101.
- 32- Parmiani G, Sensi M, Castelli C, Rivoltini L, Anichini A. T-cell response to unique and shared antigens and vaccination of cancer patients. *Cancer Immun* 2002; 2: 6.
- 33- Bastian BC. Hypothesis: a role for telomere crisis in spontaneous regression of melanoma. *Arch Dermatol* 2003; 139: 667-8.
- 34- Zindl CL, Chaplin DD. Tumor immune evasion. *Science* 2010; 328: 697-8.
- 35- Mortarini R, Piris A, Maurichi A, Molla A, Mersani I, Bono A, et al. Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8⁺ T cells at tumor site in spite of antitumor immunity to self-antigens in human metastatic melanoma. *Cancer Res* 2003; 63: 2535-45.
- 36- Martín JM, Rubio M, Bella R, Jordá E, Monteagudo C. Regresión completa de nevos melanocíticos: correlación clínica, histológica e inmunohistoquímica de una serie de 13 casos. *Actas Dermosifiliogr* 2012; 103: 401-10.
- 37- Payette MJ, Katz M 3rd, Grat-Kels JM. Melanoma prognostic factors found in the dermatopathology report. *Clin Dermatol* 2009; 27: 53-74.
- 38- Martín JM, Jordá E, Monteagudo C. Florid fibroplasia in melanocytic lesions. A retrospective study. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2014; 28: 522-4.
- 39- Ferrara G, Amantea A, Argenziano G, Broganelli P, Cesinaro AM, Donati P, et al. Sclerosing nevus with pseudomelanomatous features and regressing melanoma with nevoid features. *J Cutan Pathol* 2009; 36: 913-915.
- 40- Paladugu RR, Yonemoto RH. Biologic behaviour of thin malignant melanomas with regressive changes. *Arch Surg* 1983; 118: 41-4.
- 41- Sondergaard K, Hou-Jensen K. Partial regression in thin primary cutaneous malignant melanomas clinical stage I. A study of 486 cases. *Wirchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1985; 408: 241-7.
- 42- Ronan SG, Eng AM, Briele HA, Shioura NN, Das Gupta TK. Thin malignant melanomas with regression and metastases. *Arch Dermatol* 1987; 123: 1326-30.
- 43- Slingluff CL Jr, Seigler HF. “Thin” malignant melanoma: risk factors and clinical management. *Ann Plast Surg* 1992; 28: 89-94.

- 44- Morton DL, Cochram AJ, Thompson JF, et al. Sentinel node biopsy for early-stage melanoma: accuracy and morbidity in MSLT-I, an international multicenter trial. *Ann Surg* 2005; 242: 302-11.
- 45- Olah J, Gyulai R, Korom I, Varga E, Dobozy A. Tumor regression predicts higher risk of sentinel node involvement in thin cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 2003; 149: 662-3.
- 46- Gromet MA, Epstein WL, Blois MS. The regressing thin malignant melanoma: a distinctive lesion with metastatic potential. *Cancer* 1978; 42: 2282-92.
- 47- Guitart J, Lowe L, Piepkorn M, Prieto VG, Rabkin MS, Ronan SG, et al. Histological characteristics of metastasizing thin melanomas: a case control study of 43 cases. *Arch Dermatol* 2002; 138: 603-8.
- 48- Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1893-904.
- 49- Blessing K, McLaren KM, McLean A, Davidson P. Thin malignant melanoma (less than 1.5 mm) with metastasis: a histological study and survival analysis. *Histopathology* 1990; 17: 389-95.
- 50- Kelly JW, Sagebiel RW, Blois MS. Regression in malignant melanoma. A histologic feature without independent prognostic significance. *Cancer* 1985; 56: 2287-91.
- 51- Trau H, Rigel DS, Harris MN, et al. Metastases of thin melanomas. *Cancer* 1983; 51: 553-6.
- 52- Brogelli L, Reali UM, Moretti S, Urso C. The prognostic significance of histologic regression in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 1992; 20: 315-22.
- 53- Ribero S, Osella-Abate S, Sanlorenzo M, Savoia P, Astrua C, Cavaliere G. Favourable prognostic role of regression of primary melanoma in stage I-II AJCC patients. *Br J Dermatol* 2013; 169: 1240-5.
- 54- Morris KT, Busam KJ, Bero S, Patel A, Brady MS. Primary cutaneous melanoma with regression does not require a lower threshold for sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 316-22
- 55- Fontaine D, Parkhill W, Gree W, Walsh N. Partial regression of primary cutaneous melanoma: is there an association with sub-clinical sentinel lymph node metastasis? *Am J Dermatopathol* 2003; 25: 371-6.

- 56- Kaur C, Thomas RJ, Desai N, Green MA, Lovell D, Powel BW, et al. The correlation of regression in primary melanoma with sentinel lymph node status. *J Clin Pathol* 2008; 61: 297-300.
- 57- Cooper PH, Wanebo HJ, Hagar RW. Regression in thin malignant melanoma. Microscopic diagnosis and prognostic importance. *Arch Dermatol* 1985; 121: 1127-31.
- 58- White RL Jr, Ayers GD, Stell VH, et al. Factors predictive of the status of sentinel lymph nodes in melanoma patients from a large multicenter database. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 3593-600.
- 59- Ma MW, Medicherla RC, Qian M, et al. Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node. *Mod Pathol* 2012; 25: 1000-10.
- 60- Liskay G, Orosz Z, Peley G, et al. Relationship between sentinel lymph node status and regression of primary malignant melanoma. *Melanoma Res* 2005; 15: 509.
- 61- Barnhill RL, Levy MA. Regressing thin cutaneous malignant melanomas (<or=1.0 mm) are associated with angiogenesis. *Am J Pathol* 1993; 143: 99-104.
- 62- Lock-Andersen J, Hou-Jensen K, Hansen JP, Jensen NK, Sogaard H, Andersen PK. Observer variation in histological classification of cutaneous malignant melanoma. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1995; 29: 141.
- 63- Massi G, LeBoit P. Histological diagnosis of nevi and melanoma. Germany: Steinkopff Verlag Darmstadt; 2004.
- 64- Morris KT, Busam KT, Bero S, Patel A, Brady MS. Primary cutaneous melanoma with regression does not require a lower threshold for sentinel lymph node biopsy. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 316-22.
- 65- Nagore E, Monteagudo C, Pinazo MI, Botella-Estrada R, Oliver V, Bañuls J, et al. Propuesta de protocolo para el informe histológico del tumor primario de los pacientes con un melanoma cutáneo del grupo de trabajo para el melanoma cutáneo de la Comunidad Valenciana. *Actas Dermosifiliogr* 2007; 98: 459-65.
- 66- Zettersten E, Shaikh L, Ramirez R, et al. Prognostic factors in primary cutaneous melanoma. *Surg Clin North Am* 2003; 83: 61-75.
- 67- Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Mod Pathol* 2006; 19 (Supl 2): S71-S87.

- 68- Payette MJ, Katz M 3rd, Grant-Kels JM. Melanoma prognostic factors found in the dermatopathology report. *Clin Dermatol* 2009; 27: 53-74.
- 69- Shaw HM, Mc Carthy SW, Mc Carthy WH, Thompson JF, Milton GW. Thin regressing malignant melanoma: significance of concurrent regional lymph node metastases. *Histopathology* 1989; 15: 257-65.
- 70- Martín JM, Pinazo I, Monteagudo C, Markovic J, Allende A, Jordá E. Spontaneous regression of multiple melanocytic nevi after melanoma: report of 3 cases. *Am J Dermatopathol*. In press 2013.
- 71- Speeckaert R, Van Geel N, Luiten RM, Van Gele M, Speeckaert M, Lambert J, et al. Melanocyte-specific immune response in a patient with multiple regressing nevi and a history of melanoma. *Anticancer Res* 2011; 31: 3697-3703.
- 72- Massi D, Franchi A, Borgognoni L, et al. Thin cutaneous malignant melanomas (<or=1.5 mm) are associated with angiogenesis. *Am J Pathol* 1993; 143: 99-104.
- 73- Menzies S, Ingvar C, Mc Carthy W. A sensitivity and specificity analysis of the surface microscopy features of invasive melanoma. *Melanoma Res* 1996; 6: 55-62.
- 74- Argenziano G, Fabbrocini G, Carli P, de Giorgi V, Sabijnmarco E, Delfino M. Epiluminiscence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. Comparison of the ABCD rule of dermatoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis. *Arch Dermatol* 1998; 134: 1563-70.
- 75- Bahmer FA, Fritsch P, Kreusch J, Pehamberger H, Roher C, Schindera I, Smolle J, et al. Terminology in surface microscopy. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23: 1159-62.
- 76- Menzies SW, Gutenev A, Avramidis M, Baltrac A, McCarthy WH. Short-term digital surface microscopic monitoring of atypical or changing melanocytic lesions. *Arch Dermatol* 2001; 137: 1583-9.
- 77- Martín JM, Bella R, Jordá E. Vascularización en dermatoscopia. *Actas Dermosifiliogr* 2012; 103: 357-75.
- 78- Zalaudek I, Argenziano G, Ferrara G, et al. Clinically equivocal melanocytic lesions with features of regression: a dermoscopic-pathological study. *Br J Dermatol* 2004; 150: 64-71.
- 79- Massi D, De Giorgi V, Carli P, Santucci M. Diagnostic significance of the blue hue in dermoscopy of melanocytic lesions: a dermoscopic-pathologic study. *Am J Dermatopathol* 2001; 23: 463-9.

- 80- Paredes BE. Regression in malignant melanoma. Definition, etiopathogenesis, morphology and differential diagnosis. *Pathologie* 2007; 28: 453-63.
- 81- Kang S, Barnhill RL, Mihm MC, Sober AJ. Histologic regression in malignant melanoma: an interobserver concordance study. *J Cutan Pathol* 1993; 20: 126-9.
- 82- Barr RJ. The many faces of completely regressed malignant melanoma. *Pathology* 1994; 2: 359-730.
- 83- Chang WY. Complete spontaneous regression of cancer: four case reports, review of literature, and discussion of possible mechanisms involved. *Hawaii Med J* 2000; 59: 379-87.
- 84- Finn OJ. Molecular origins of cancer. *Cancer immunology*. *N Engl J Med* 2008; 358: 2704-15.
- 85- Hwu P. Treating cancer by targeting the immune system. *N Engl J Med* 2010; 363: 779-81.
- 86- Renno T, Lebecque S, Renard N, Saeland S, Vicari A. What's new in the field of cancer vaccines? *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 1296-310.
- 87- Trau H, Kopf AW, Rigel DS. Regression in malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8: 363-368.
- 88- McGovern VJ, Shaw HM, Milton GW, Farago GA. Prognostic significance of the histological features of malignant melanoma. *Histopathology* 1979; 3: 385-393.
- 89- Elenitsas R, Halpern AC. Eczematous halo reaction in atypical nevi. *J Am Acad Dermatol* 1996; 34: 357-61.
- 90- Speeckaert R, Van Geel N, Lambert J, Boone B, Chevolet I, Van Gele M, et al. Immune mediated mechanisms of melanocyte destruction. Paving the way for efficient immunotherapeutic strategies against melanoma. *Oncoimmunology* 2012; 1: 526-8.
- 91- Clark W, Elder D, Guerry D, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* 1989; 81: 1893
- 92- Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 1996; 77: 1303-10.
- 93- Ferneiny M, Panse I, Scharz N, Battistella M, Verola O, Morel P, et al. Phenomene de Meyerson perinaevique dissemine revelateur d'un melanoma. *Ann Dermatol Venereol* 2012; 139: 137-41.

- 94- Merimsky O, Shoenfeld Y, Yechezkel G. Vitiligo and melanoma-associated hypopigmentation: a similar appearance but a different mechanism. *Cancer Immunol Immunother* 1994; 38: 411-16.
- 95- Regueiro JR. *Inmunología. Biología y patología del sistema inmunitario*, 4ª edición. Madrid: Editorial médica Panamericana. 2010
- 96- Anichini A, Maccalli C, Mortarini R, Salvi S, Mazzocchi A, Squarcina P, et al. Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J Exp Med* 1993; 177: 989-998.
- 97- Noris García E, Torella A. Inmunoterapia en melanoma. *Oncologia* 2004; 27: 16-21.
- 98- Fang L, Lonsdorf AS, Hwang ST. Immunotherapy for advanced melanoma. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 1596-2605.
- 99- Disis ML, Bernhard H, Jaffee EM. Use of tumour-responsive T cells as cancer treatment. *Lancet* 2009; 21: 373: 673-83.
- 100- Redondo P. Actualización en melanoma: incidencia, desarrollo y aspectos biológicos. *An Sist Sanit Navar* 2000; 23: 67-92.
- 101- Boon T, Old LJ. Cancer tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 681-3.
- 102- Kawakami Y, Rosenberg SA. Human tumor antigens recognized by T-cells. *Immunol Res* 1997; 16: 313-39.
- 103- Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 684-93.
- 104- Garbelli S, Mantovani S, Palermo B, Giachino C. Melanocyte-specific, cytotoxic T cell responses in vitiligo: the effective variant of melanoma immunity?. *Pigment Cell Res* 2005; 18: 234-42
- 105- Gattoni-Celli S, Cole DJ. Melanoma-associated tumor antigens and their clinical relevance to immunotherapy. *Semin Oncol* 1996; 23: 754-8.
- 106- Mortarini R, Piris A, Maurichi A, Molla A, Mersani I, Bono A, et al. Lack of terminally differentiated tumor-specific CD8⁺ T cells at tumor site in spite of antitumor immunity to self-antigens in human metastatic melanoma. *Cancer Res* 2003; 63: 2535-45.
- 107- Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Eng J Med* 2012; 366: 2455-65.

- 108- Goldsmith MA, Weiss A. Early signal transduction by the antigen receptor without commitment to T cell activation. *Science* 1988; 240: 1029-31.
- 109- Natali PG, Hamby CV, Felding-Habermann B, Liang B, Nicotra MR, Di Filippo F et al. Clinical significance of alpha (v) beta 3 integrin and intercellular adhesion molecule-1 expression in cutaneous malignant melanoma lesions. *Cancer Res* 1997; 57: 1554-60.
- 110- Lowes MA, Bishop GA, Crotty K, Barnetson RS, Halliday GM. T helper 1 cytokine mRNA is increased in spontaneously regressing primary melanomas. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 914-9.
- 111- Kruger-Krasagakes S, Krasagakis K, Garbe C, Schmitt E, Huls C, Blankenstein T et al. Expression of interleukin 10 in human melanoma. *Br J Cancer* 1994; 70: 1182-5.
- 112- Dummer W, Bastian BC, Ernst N, Schanzle C, Schwaaf A, Brocker EB. Interleukin-10 production in malignant melanoma: preferential detection of IL-10 secreting tumor cells in metastatic lesions. *Int J Cancer* 1996; 66: 607-10.
- 113- Dummer W, Becker JC, Schwaaf A, Leverkus M, Moll T, Brocker EB. Elevated serum levels of interleukin-10 in patients with metastatic malignant melanoma. *Melanoma Res* 1995; 5: 67-8.
- 114- Becker JC, Czerny C, Brocker EB. Maintenance of clonal anergy by endogenously produced IL-10. *Int Immunol* 1994; 6: 1605-12.
- 115- Balch CM, Houghton AN, Sober AJ, Soong, editores. *Cutaneous melanoma*. 4^a ed. St. Louis: Quality Medical Publishing, Inc.; 2003.
- 116- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010; 363: 711-23.
- 117- Simeone E, Ascierto PA. Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD137, and anti-PD1. *Immunotoxicol* 2012; 9: 241-7.
- 118- Croce CM. Molecular origins of cancer. *Oncogenes and cancer*. *N Engl J Med* 2008; 358: 502-11.
- 119- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-8.
- 120- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269-90

- 121- Cooper GM, Hausman RE. La célula. 6ª edición. Madrid: Ediciones Marban. 2014.
- 122- Staunton MJ, Gaffney EF. Tumor type is a determinant of susceptibility to apoptosis. *Am J Clin Pathol* 1995; 103: 300-7.
- 123- Redondo P, Iglesias ME. Apoptosis. En: Vázquez J, Quintanilla E, eds. *Fisiopatología de las enfermedades cutáneas*. MCR 1996; 241-68
- 124- McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, et al. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 2002; 14: 707-18.
- 125- Tang L, Tron VA, Reed JC, Mah KJ, Krajewska M, Li G, et al. Expression of apoptosis regulators in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 1865-71.
- 126- Serrone L, Hersey P. The chemoresistance of human malignant melanoma: an update. *Melanoma Res* 1999; 9: 51-8.
- 127- Grossman D, Altieri DC. Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets. *Cancer Metastasis Rev* 2001; 30: 3-11.
- 128- Selzer E, Schlagbauer-Wald H, Okamoto I, Pehamberger H, Potter R, Jansern B. Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines. *Melanoma Res* 1998; 8: 197-203.
- 129- Soengas MS, Capodieci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, et al. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 2001; 409: 207-11.
- 130- Hahne M, Rimoldi D, Schröther M, Romero P, Schreiber M, French I et al. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274: 1363-6.
- 131- Zaks TZ, Chappell DB, Rosenberg SA, Restifo NP. Fas-mediated suicide of tumor-reactive cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J Immunol* 1999; 162: 3273-79.
- 132- Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Cell Biol* 2002; 3: 401-10.
- 133- Chen N, Gong J, Chen X, Meng W, Huang Y, Zhao F, et al. Caspases and inhibitor of apoptosis proteins in cutaneous and mucosal melanoma: expression profile and clinicopathologic significance. *Hum Pathol* 2009; 40: 950-6.

- 134- Schirmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res* 2004; 64: 7183-90
- 135- Reed JC. Apoptosis-regulating proteins as targets for drug discovery. *Trends Mol Med* 2001; 7: 314-9.
- 136- Emanuel PO, Phelps RG, Mudgil A, Shafir M, Bursteins DE. Immunohistochemical detection of XIAP in melanoma. *J Cutan Pathol* 2008; 35: 292-97.
- 137- Takeuchi H, Morton DL, Elashoff D, Hoon DS. Survivin expression by metastatic melanoma predicts poor disease outcome in patients receiving adjuvant polyvalent vaccine. *Int J Cancer* 2005; 117: 1032-38.
- 138- Pennati M, Colella G, Folini M, Citti L, Daidone MG, Zaffaroni N. Ribozyme-mediated attenuation of surviving expression sensitizes human melanoma cells to cisplatin-induced apoptosis. *J Clin Invest* 2002; 109: 285-6.
- 139- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, et al. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388: 190-5.
- 140- Bullani RR, Huard B, Viard-Leveugle I, Byers HR, Irmeler M, Saurat JH, et al. Selective expression of FLIP in malignant melanocytic skin lesions. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 360-4.
- 141- Gerecitano J, Perle MA, Vilcek J. Transcriptional basis for the difference in inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression between nonmetastatic and metastatic murine melanoma cell lines. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 393-405.
- 142- Xie, Huang S, Dong Z, Juang SH, Gutman M, Xie QW, et al. Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *J Exp Med* 1995; 181: 1333-43.
- 143- Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003; 22: 3138-3151.
- 144- Ruitter D, Bogenrieder T, Elder D, Herlyn M. Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol* 2002; 3: 35-43.
- 145- Zhai S, Yaar M, Doyle SM, Gilchrist BA. Nerve growth factor rescues pigment cells from ultraviolet-induced apoptosis by upregulating BCL-2 levels. *Exp Cell Res* 1996; 224: 335-43.
- 146- Kerbel RS. Molecular origins of cancer. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358: 2039-49.

- 147- Denckamp J. Review article: angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br J Radiol* 1993; 66: 181-96.
- 148- Lassau N, Lamuraglia M, Koscielny S, et al. Prognostic value of angiogenesis evaluated with high-frequency and colour Doppler sonography for preoperative assessment of primary cutaneous melanomas: correlation and recurrence after a 5 year follow-up period. *Cancer Imaging* 2006; 6: 24-9.
- 149- Fallowfield ME, Cook MG. The vascularity of primary cutaneous melanoma. *J Pathol* 1991; 164: 241-4.
- 150- Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, et al. Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1826-31.
- 151- Barnhill RL, Frandey K, Levy MA, et al. Angiogenesis and tumor progression of melanoma. Quantification of vascularity in melanocytic nevi and cutaneous malignant melanoma. *Lab Invest* 1992; 67: 331-7.
- 152- Vlaykova T, Muhonen T, Hanka-Kemppinen M, et al. Vascularity and prognosis of metastatic melanoma. *Int J Cancer* 1997; 74: 326-9.
- 153- Srivastasa A, Laidler P, Davies RP, et al. The prognostic significance of tumor vascularity in intermediate-thickness (0.76-4.0 mm thick) skin melanoma. A quantitative histologic study. *Am J Pathol* 1988; 133: 419-23.
- 154- Depasquale I, Thompson WD. Microvessel density for melanoma prognosis. *Histopathology* 2005; 47: 186-94.
- 155- Neitzel LT, Neitzel CD, Magee KL, et al. Angiogenesis correlates with metastasis in melanoma. *Ann Surg Oncol* 1999; 6: 70-4.
- 156- Vlaykova T, Laurila P, Muhonen T, et al. Prognostic value of tumour vascularity in metastatic melanoma and association of blood vessel density with vascular endothelial growth factor expression. *Melanoma Res* 1999; 9: 59-68.
- 157- Wang Y, Becker D. Antisense targeting of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor-1 in human melanomas blocks intratumoral angiogenesis and tumor growth. *Nature Med* 1997; 8: 887-93.
- 158- Semenza GL. A new weapon for attacking tumor blood vessels. *N Engl J Med* 2008; 358: 2066-7.
- 159- Gray MR, Martin del Campo S, Zhang X, Zhang H, Souza FF, Carson WE 3rd. Metastatic melanoma: lactate dehydrogenase levels and CT imaging findings of

- tumor devascularization allow accurate prediction of survival in patients with bevacizumab. *Radiology* 2014; 270: 425-34.
- 160- Prehn RT. The paradoxical association of regression with a poor prognosis in melanoma contrasted with a good prognosis in keratoacanthoma. *Cancer Res* 1996; 56: 937-40.
- 161- Sato A, Imaizumi M, Saito T, Yoshinari M, Suzuki H, Hayashi Y, Ilinuma K. Detection of apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells in vivo during differentiation-induced with all-trans retinoic acid in combination with chemotherapy. *Leuk Res* 1999; 23: 827-32.
- 162- Cuendet M, Christov K, Lantvit DD, Deng Y, Hedayat S, Helson L, et al. Multiple myeloma regression mediated by bruceantin. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1170-9.
- 163- Modjtahedi H, Affleck K, Stubberfield C, Dean C. EGFR blockade by tyrosine kinase inhibitor or monoclonal antibody inhibits growth, directs terminal differentiation and induces apoptosis in the human squamous cell carcinoma HN5. *Int J Oncol* 1998; 13: 335-342.
- 164- Kim NW. Clinical implications of telomerase in cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 781-6.
- 165- Pathak S, Multani AS, McConkey DJ, Imam AS, Amoss MS Jr. Spontaneous regression of cutaneous melanoma in sinclair swine is associated with defective telomerase activity and extensive telomere erosion. *Int J Oncol* 2000; 17: 1219-24.
- 166- Hansel DE, Meeker AK, Hicks J, De Marzo AM, Lillemoe KD, Schulick R, et al. Telomere length variation in biliary tract metaplasia, dysplasia, and carcinoma. *Mod Pathol* 2006; 19: 772-9.
- 167- Kuhn E, Meeker AK, Visvanathan K, Gross AL, Wang TL, Kurman RJ, et al. Telomere length in different types of ovarian carcinoma with emphasis on clear cell carcinoma. *Mod Pathol* 2011; 24: 1139-45.
- 168- Zhou X, Meeker AK, Makambi KH, Kosti O, Kallakury BVS, Sidawy MK. Telomere length variation in normal epithelial cells adjacent to tumor: potential biomarker for breast cancer local recurrence. *Carcinogenesis* 2012; 33: 113-8.
- 169- Meeker AK, Gage WR, Hicks JL, Simon I, Coffman JR, Platz EA, et al. Telomere length assessment in human archival tissues. Combined telomere fluorescence in situ hybridization and immunostaining. *Am J Pathol* 2002; 160: 1259-68.

- 170- Kuhn E, Meeker A, Wang TL, Sehdev AS, Kurman RJ, Shih IM. Shortened telomeres in serous tubal intraepithelial carcinoma: an early event in ovarian high-grade serous carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 2010; 34: 829-36.
- 171- Sáenz S, Conejo-Mir J, Cayuela A. Epidemiología del melanoma en España. *Actas Dermosifiliogr* 2005; 96: 411-8.
- 172- McLennan R, Green AC, McLeod GR, Martin NG. Increasing incidence of cutaneous melanoma in Queensland, Australia. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1427-32.
- 173- Rigel DS. Trends in dermatology. Melanoma incidence. *Arch Dermatol* 2010; 146: 318.
- 174- Rigel DS. Malignant melanoma: incidence issues and their effect on diagnosis and treatment in the 1990s. *Mayo Clin Proc* 1997; 72: 362-366.
- 175- Ríos L, Nagore E, López JL, Redondo P, Martí RM, Fernández de Misa R, et al. Registro nacional de melanoma cutáneo. Características del tumor en el momento del diagnóstico: 15 años de experiencia. *Actas Dermosifiliogr* 2013; 104: 789-99.
- 176- Ródenas JM, Delgado M, Herranz MT. Sun exposure, pigmentary traits and risk of cutaneous malignant melanoma: a case-control study in a Mediterranean population. *Cancer Causes Control* 1996; 7: 275-83.
- 177- Ocaña-Riola R, Martínez-García C, Serrano S. Population-based study of cutaneous malignant melanoma in the Granada province (Spain), 1985-1992. *Eur J Epidemiol* 2001; 17: 169-74.
- 178- Jordá Cuevas E, Martín Hernández JM. *Dermatología para Pediatras*; Madrid: Editorial Médica Panamericana 2012.
- 179- Morales-Callaghan AM, Castrodeza-Sanz J, Martínez-García G, Peral-Martínez I, Miranda-Romero A. Estudio de correlación clínica, dermatoscópica e histopatológica de nevus melanocíticos atípicos. *Actas Dermosifiliogr* 2008; 99: 380-9.
- 180- Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005; 353: 2135-47.
- 181- Viros A, Fridlyand J, Bauer J, Lasithiotakis K, Garbe C, Pinkel D, et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med* 5: e120.

- 182- Botella-Estrada R, Sanmartin Jimenez O. Diferentes alteraciones genéticas causan diferentes melanomas y nuevas posibilidades terapéuticas. *Actas Dermosifiliogr* 2010; 101: 394-400.
- 183- Berger MF, Hodis E, Heffernan TP, et al. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 2012; 485: 502-6.
- 184- Hodis E, Watson IR, Kryukov GV. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012; 150: 251-63.
- 185- Koga Y, Pelizzola M, Cheng E, et al. Genome-wide screen of promoter methylation identifies novel markers in melanoma. *Genome Res* 2009; 19: 1462-70.
- 186- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velsulescu VE, Zhou S, Diaz Jr LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339: 1546-58.
- 187- Bartkova J, Lukas J, Goldberg P, et al. The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. *Cancer Res* 1996; 56: 5475-83.
- 188- Ibrahim N, Haluska FG. Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 551-79.
- 189- Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003; 33: 19-20
- 190- Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-54.
- 191- Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000; 100: 387-90.
- 192- Flaherty KT, Hodi FS, Fisher DE. From genes to drugs: targeted strategies for melanoma. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 349-61.
- 193- Arumi-Uria M, McNutt S, Finnerty B. Grading of atypia in nevi: correlation with melanoma risk. *Mod Pathol* 2003; 16: 764-71.
- 194- Pozo L, Naase M, Cerio R, Blanes A, Diaz-Cano S. Critical analysis of histological criteria for grading atypical (dysplastic) melanocytic nevi. *Am J Clin Pathol* 2001; 115: 194-204.
- 195- Clemente C, Cochran AJ, Elder DE, Levene A, Mackie RM, Mihm Jr M, et al. Histopathologic diagnosis of dysplastic nevi: concordance among pathologists convened by the World Health Organization melanoma programme. *Hum Pathol* 1991; 22: 313-9.

- 196- Weedon D. Weedon`s skin pathology. Third edition. London: Churchill Livingstone Elsevier, 2010.
- 197- Barnhill RL. Tumors of melanocytes. Barnhill RL, Crowson AN, Magro CM, Piepkorn MW. Dermatopathology. Third edition. Columbus: McGraw Hill, 2010. p. 615-687.
- 198- Calonje E, Brenn T, Lazar A, McKee PH. McKee`s pathology of the skin. Fourth edition. London: Elsevier Saunders, 2012.
- 199- Elder D, Elenitsas R. Lesiones pigmentadas benignas y melanoma maligno. En Elder E, Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson B. Lever: histopatología de la piel. Octava edición. Buenos Aires: Editorial Intermédica, 1999.
- 200- Ko CJ, Bologna JL, Glusac EJ. "Clark/dysplastic" nevi with florid fibroplasia associated with pseudomelanomatous features. J Am Acad Dermatol 2011; 64: 346-51.
- 201- Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Inmunohistoquímica en dermatopatología: revisión de los anticuerpos utilizados con mayor frecuencia (parte II). Actas Dermosifiliogr 2013; 104. 181-203.
- 202- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J Immunol 1995; 155: 1151-64.
- 203- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T-cells in immunological tolerance to self and non-self. Nat Immunol 2005; 6: 345-52.
- 204- Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Müllbacher A, Naval J et al. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. J Cell Biol 2004; 167: 457-468.
- 205- Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, et al. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. J Immunol 1995; 154: 3806-13.
- 206- Hahne M, Rimoldi D, Schröter M, Romero P, Schreier M, French LE, et al. Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. Science 1996; 274: 1363-6.
- 207- Strand S, Galle PR. Immune evasion by tumours: involvement of the CD95 (APO-1/Fas) system and its clinical implications. Mol Med Today 1998; 4: 63-8.

- 208- Tojo M. Valor de la técnica FISH para la detección de translocaciones en linfomas no Hodgkin [serie en internet]. Consultado: 13-12-2013: Disponible en http://www.dspace.usc.es/bitstream/10347/2587/1/9788498872491_content.pdf
- 209- Egholm M, Buchardt O, Christensen L, Behrens C, Freier SM, Driver DA , et al. PNA Hybridizes to Complementary Oligonucleotides Obeying the Watson-Crick Hydrogen Bonding Rules. *Nature* 1993; 365: 566-8.
- 210- Lansdorp P, Verwoerd N, van de Rijke F, Dragowska V, Little MT, Dirks R, et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 685-91.
- 211- Forrest GN. PNA FISH: present and future impact on patient management. *Expert Rev Mol Diag* 2007; 7: 231-6.
- 212- Pellestor F, Paulasova P, Hamamah S. Peptide nucleic acids (PNA s) as diagnostic devices for genetic and cytogenetic analysis. *Curr Pharm Des.* 2008; 14: 2439-44.
- 213- Karkare S, Bhatnagar D. Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and applications of PNA, LNA, and morpholino. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006; 71: 575-86.
- 214- Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte populations measured by flow cytometry. *Nature Biotech* 1998; 16: 743-7
- 215- Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little M-T, Dirks RW, et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 685-91.
- 216- Rius F, Barón FJ, Sánchez E, Parras L. *Bioestadística: Métodos y aplicaciones.* España: Universidad de Málaga; 1998.
- 217- Armitage P, Berry G. *Estadística para la investigación biomédica.* Doyma, Barcelona; 1992.
- 218- Burton Al, Gilbert J, Farmer RW, et al. Regression does not predict nodal metastasis or survival in patients with cutaneous melanoma. *Am Surg* 2011; 77: 1009-13.
- 219- Nathanson L. Spontaneous regression of malignant melanoma: a review of the literature on incidence, clinical features, and possible mechanisms. *Natl Cancer Inst Monogr* 1976; 44: 67-76.

- 220- Kelly JW, Sagebiel RW, Blois MS. Regression in malignant melanoma. A histologic feature without independent prognostic significance. *Cancer* 1985; 56: 2287-91.
- 221- Cesinaro CM. Clinico-pathological impact of fibroplasia in melanocytic nevi: a critical revision of 209 cases. *APMIS* 2012; 120: 658-65.
- 222- Moretti S, Spallanzani A, Pinzi C, Prignano F, Fabbri P. Fibrosis in regressing melanoma versus nonfibrosis in halo nevus upon melanocyte disappearance: could it be related to a different cytokine microenvironment? *J Cutan Pathol* 2007; 34: 301-8.
- 223- Bayer-Garner IB, Ivan D, Schwartz MR, Tschen JA. The immunopathology of regression in benign lichenoid keratosis, keratoacanthoma and halo nevus. *Clin Med Res* 2004; 2: 89-97.
- 224- Patel A, Halliday GM, Cooke BE, Barnetson RS. Evidence that regression in keratoacanthoma is immunologically mediated: a comparison with squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol* 1994; 131: 789-98.
- 225- Tefani FL, Barnetson RS, Halliday GM, McCarthy SW, McCarthy WH. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in primary regressing and non-regressing malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 1991; 97: 197-202.
- 226- Monteagudo C, Martín JM, Jordá E, Llombart-Bosch A. CXCR3 chemokine receptor immunoreactivity in primary cutaneous malignant melanoma: correlation with clinicopathologic prognostic factors. *J Clin Pathol* 2007; 60: 596-9.
- 227- Wenzel J, Bekisch B, Uerlich M, Haller O, Bieber T, Tuting T. Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 37-48
- 228- Hodi FS, Dranoff G. The biologic importance of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Cutan Pathol* 2010; 37 (Suppl. 1): 48-53.
- 229- Elder DE, Murphy GF. *Melanocytic tumors of the skin*. Washington DC: AFIP series 4th. 2010.
- 230- Barnhill RL, Levy MA. Regressing thin cutaneous malignant melanomas (<or=1.0 mm) are associated with angiogenesis. *Am J Pathol* 1993; 143: 99-104.
- 231- Sotiriadis D, Lazaridou E, Patsatsi A, Kastanis A, Trigoni A, Devliotou-Panagiotidou D. Does halo nevus without halo exist? *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006; 20: 1394-6.

- 232- Kolm I, Di Stefani A, Hofmann-Wellernhof R, Fink-Puches R, Wolf IH, Richtig E, et al. Dermoscopy patterns of halo nevi. *Arch Dermatol* 2006; 142: 1627-32.
- 233- Busham K. *Dermatopathology*. London: Churchill Livingstone Elsevier, 2010.
- 234- Akasu R, From L, Kahn HJ. Characterization of the mononuclear infiltrate involved in regression of halo nevi. *J Cutan Pathol* 1994; 21: 302–11.
- 235- Bergman W, Willemze R, DeGraaff-Reitsma C, Ruiter DJ. Analysis of major histocompatibility antigens and the mononuclear cell infiltrate in halo nevi. *J Invest Dermatol* 1985; 85: 25–9.
- 236- Mooney A, Barr RJ, Buxto MG. Halo nevus or halo phenomenon? A study of 142 cases. *J Cutan Pathol* 1995; 22: 342–48.
- 237- Kolm I, Di Stefani A, Hofmann-Wellernhof R, Fink-Puches R, Wolf IH, Richtig E, at al. Dermoscopy patterns of halo nevi. *Arch Dermatol* 2006; 142:1627-32.
- 238- Zeff RA, Freitag A, Grin CM, Grant-Kels JM. The immune response in halo nevi. *J Am Acad Dermatol* 1997; 37: 620-4.
- 239- Blessing K, McLaren KM. Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance. *Histopathology* 1992; 20: 315-22.
- 240- Iozzo RV. Tumor stroma as a regulator of neoplastic behaviour. *Lab Invest* 1995; 73: 157-60.
- 241- Zalaudek I, Leinweber B, Hofmann-Wellenhof R, Scope A, Marghood AA, Ferrara G, et al. The epidermal and dermal origin of melanocytic tumors: theoretical considerations based on epidemiologic, clinical, and histopathologic findings. *Am J Dermatopathol* 2008; 30: 403-6.
- 242- Kalialis LV, Drzewiecki KT, Mohammadi M, Mehlsen AB, Klyver H. Spontaneous regression of metastases from malignant melanoma: a case report. *Melanoma Res* 2008; 18: 279-83.
- 243- Kalialis LV, Drzewiecki KT, Klyver H. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res* 2009; 19: 275-82.
- 244- Zoller L, Mayer E, Ben Itzhak O, Bergman R. A lack of significantly increased incidence of regression in second primary melanomas does not support an immunization effect. *J Cutan Pathol* 2010; 37: 1140-4.
- 245- Fabrizi G, Pennacchia I, Pagliarello C, Massi G. Sclerosing nevus with pseudomelanomatous features. *J Cutan Pathol* 2008; 35: 995-1002.

- 246- Ferrara G, Giorgio CM, Zalaudek I, Broganelli P, Pellacani G, Tomasini C, et al. Sclerosing nevus with pseudomelanomatous features (nevus with regression-like fibrosis): clinical and dermoscopic features of a recently characterized histopathologic entity. *Dermatology* 2009; 219: 202-208.
- 247- Ferrara G, Amantea A, Argenziano G, Broganelli P, Cesinaro AM, Donati P, et al. Sclerosing nevus with pseudomelanomatous features and regressing melanoma with nevoid features. *J Cutan Pathol* 2009; 36: 913-915.
- 248- Massi G. Sclerosing melanoma vs regressing melanoma. *J Cutan Pathol* 2009; 916.
- 249- Cesinaro AM, Foroni M, Sighinolfi P, et al. Spitz nevus is relatively frequent in adults: a clínico-pathologic study of 247 cases related to patient's age. *Am J Dermatopathol* 2005; 27: 469-475.
- 250- Requena C, Requena L, Kutzner H, Sanchez-Yus E. Spitz nevus: a clinicopathological study of 349 cases. *Am J Dermatopathol* 2009; 31: 107-16.
- 251- Giehl KA, Nägele U, Volkenandt M, Berking C. Protein expression of melanocyte growth factors (bFGF, SCF) and their receptors (FGFR-1, c-kit) in nevi and melanoma. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 7-14.
- 252- Babacan A, Lebe B. Grade of atypia in dysplastic nevi and relationship with dermal fibroplasia. *Turk Patoloji Derg* 2012; 28: 17-23.
- 253- Clark WH Jr, Tucker Ma. Problems with lesions related to the development of malignant melanoma: common nevi, dysplastic nevi, malignant melanoma insitu, and radial growth phase malignant melanoma. *Hum Pathol* 1998; 29: 8-14.
- 254- Ferrara G, Argenziano G, Soyer HP, et al. Dermoscopic and histopathologic diagnosis of equivocal melanocytic skin lesions: an interdisciplinary study on 107 cases. *Cancer* 2002; 95: 194.
- 255- Pozo L, Husein E, Blanes A, Diaz-Cano SJ. The correlation of regression with the grade of dysplasia (atypia) in melanocytic naevi. *Histopathology* 2008; 52: 387-9.
- 256- Van Dijk MC, Aben KK, Van Hees F, Klaasen A, Blokx WA, Kiemeneij LA, et al. Expert review remains important in the histopathological diagnosis of cutaneous melanocytic lesions. *Histopathology* 2008; 52: 139-46.
- 257- Busam KJ. Cutaneous desmoplastic melanoma. *Adv Anat Pathol* 2005; 12: 92.
- 258- Harris GR, Shea CR, Horenstein MG, Reed JA, Burchette JL Jr, Prieto VG. Desmoplastic (sclerotic) nevus: an underrecognized entity that resembles dermatofibroma and desmoplastic melanoma. *Am J Surg Pathol* 1999; 23: 786.

- 259- King R, Hayzen BA, Page RN, Googe PB, Zeagler B, Mihm Jr MC. Recurrent nevus phenomenon: a clinicopathologic study of 357 cases and histologic comparison with melanoma with regression. *Mod Pathol*. 2009; 22: 611-17.
- 260- Gerami P, Beilfuss B, Haghghat Z, Fang Y, Jhanwar S, Busam KJ. Fluorescence in situ hybridation as an ancillary method for the distinction of desmoplastic melanomas from sclerosing melanocytic nevi. *J Cutan Pathol* 2011; 38: 329-34.
- 261- Zalaudek I, Argenziano G, Ferrara G, Soyer HP, Corona R, Sera F, et al. Clinically equivocal melanocytic skin lesions with features of regression: a dermoscopic-pathological study. *Br J Dermatol* 2004; 150: 64-71.
- 262- King R, Hayzen BA, Page RN, Googe PB, Zeagler D, Mihm Jr MC. Recurrent nevus phenomenon: a clinicopathologic study of 357 cases and histologic comparison with melanoma regression. *Modern Pathol* 2009; 22: 611-617.
- 263- Ruiz-Maldonado R, Orozco-Covarrubias L, Ridaura-Sanz C, Duran-McKinster C, Saez de Ocariz Gutierrez MM, et al. Desmoplastic hairless hypopigmented naevus: a variant of giant congenital melanocytic naevus. *Br J Dermatol* 2003; 148:1253-7.
- 264- Martin JM, Jorda E, Monteagudo C, Alonso V, Villalon G, Ramón D. Desmoplastic giant congenital nevus with progressive depigmentation. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56: S10-S14.
- 265- Rosemberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 233-40.
- 266- Fang L, Lonsdorf AS, Hwang ST. Immunotherapy for advanced melanoma. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 2596-2605.
- 267- Hussein MR, Elasers DAH, Fadel SA, Omar A. Immunohistological characterisation of tumour infiltrating lymphocytes in melanocytic skin lesions. *J Clin Pathol* 2006; 59: 316-324.
- 268- Hussein MR: Tumour-infiltrating lymphocytes and melanoma tumorigenesis: an insight. *Br J Dermatol* 2005; 153:18-21.
- 269- Piras F, Colombari R, Minerba L, et al: The predictive value of CD8, CD4, CD68, and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer* 2005; 104:1246-1254.
- 270- Hodi FS, Dranoff G. The biologic importance of tumor-infiltrating lymphocytes. *J Cutan Pathol* 2010; 37(Suppl. 1): 48-53.

- 271- De Panfilis G, Campanini N, Santini M, et al: Phase- and stage-related proportions of T cells bearing the transcription factor FOXP3 infiltrate primary melanoma. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 676-684.
- 272- Mourmouras V, Fimiani M, Rubegni P, et al: Evaluation of tumour-infiltrating CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human cutaneous benign and atypical naevi, melanomas and melanoma metastases. *Br J Dermatol* 2007; 157: 531-539.
- 273- Busham KJ, Antonescu CR, Marghood AA, Nehal KS, Sachs DL, Shia J, et al. Histologic classification of tumor-infiltrating lymphocytes in primary cutaneous malignant melanoma. A study of interobserver agreement. *Am J Clin Pathol* 2001; 115: 856-60.
- 274- Tuthill RJ, Unger JM, Liu PY, Flaherty LE, Sondak VK. Risk assessment in localized primary cutaneous melanoma. A southwest oncology group evaluating nine factors and a test of the Clark logistic regression prediction model. *Am J Clin Pathol* 2002; 118: 504-11.
- 275- Pastorfidie GC, Kibbi A-G, de Roa AL, et al. Image analysis of stage 1 melanoma (1.00–2.50 mm): lymphocytic infiltrates related to metastasis and survival. *J Cutan Pathol* 1992; 19: 390-397.
- 276- Mihm M, Clemente C, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases- a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest* 1996; 74: 43.
- 277- Elder DE, Guerry D IV, Van Horn M, Hurwitz S, Zehngebot L, Goldman LI, et al. The role of lymph node dissection for clinical stage I malignant melanoma of intermediate thickness (1.51-3.99 mm), *Cancer* 1985; 56: 413-8.
- 278- Ng SH, Chave TA: Tumoral melanosis as a manifestation of a completely regressed primary melanoma with metastases. *Br J Dermatol* 2006; 155: 627-628.
- 279- Flax SH, Skelton HG, Smith KJ, Lupton GP: Nodular melanosis due to epithelial neoplasms. A finding not restricted to regressed melanomas. *Am J Dermatopathol* 1998; 20: 118-122.
- 280- LeBoit PE: Melanosis and its meanings. *Am J Dermatopathol* 2002; 24: 369-372.
- 281- Handerson T, Berger A, Harigopol M, et al. Melanophages reside in hypermelanotic, aberrantly glycosylated tumor areas and predict improved outcome in primary cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 679-686.

- 282- Barnhill RL, Mihm MC Jr, Ceballos PI. Angiogenesis and regressing cutaneous malignant melanoma. *Lancet* 1992; 339: 991-2.
- 283- Da Costa HO, Sotto MN, Sakai Valente NY, Ferraz da Silva LF, Sanches Jr. JA, Gonçalves da Silva AM, et al. Microvascular lymphatic density analysis in cutaneous regressive and nonregressive superficial spreading melanomas using the lymphatic marker D2-40. *Am J Dermatopathol* 2011; 33: 669-74.
- 284- Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med* 2001; 7: 186-91.
- 285- Skobe M, Hawighorst T, Jackson Dg, et al. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nat Med* 2001; 7: 192-8.
- 286- Monteagudo C, Pellín-Carcelén A, Martín JM, Ramos D. Papel de las quimiocinas en la progresión del melanoma. *Actas Dermosifiliogr* 2011; 102: 498-504.
- 287- Avram G, Sanchez-Sendra B, Martín JM, Terrádez L, Ramos D, Monteagudo C. The density and type of MECA-79-positive high endothelial venules correlate with lymphocytic infiltration and tumor regression in primary cutaneous melanoma. *Histopathology* 2013; 63: 852-61.
- 288- Kashani-Sabet M, Sagebiel RW, Ferreira CM, et al. Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1826-31.
- 289- Martín JM, Pinazo I, Mateo JF, Escandell I, Jordá E, Monteagudo C. Evaluación de la regresión en melanomas primarios sucesivos. *Actas Dermosifiliogr* 2014; May 28: Doi: 10.1016/j.ad.2014.01.006.
- 290- Zoller L, Mayer E, Ben Itzhak OB, Bergman R. A lack of significantly increased incidence of regression in second primary melanomas does not support an “immunization effect”. *J Cutan Pathol* 2010; 37: 1140-4.
- 291- Saleh FH, Crotty KA, Hersey P, Menzies SW. Primary melanoma tumor regression associated with an immune response to the tumor-associated antigen melan-A/MART-1. *Int J Cancer* 2001; 94: 551-7.
- 292- Orlow I, Tommasi Dv, Bloom B, Ostrovnya I, Cotignola J, Mujumdar U. Evaluation of the clonal origin of multiple primary melanomas using molecular profiling. *J Invest Dermatol* 2009; 129:1972-82.
- 293- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velsulescu VE, Zhou S, Diaz Jr LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339: 1546-58.

- 294- Corbalán-Vélez R, Oviedo-Ramírez I, Martínez-Barba E, Clemente-Ruiz de Almirón. Adelgazamiento epidérmico en melanomas malignos. *Actas Dermosifiliogr* 2011; 102: 634-5
- 295- Hantschke M, Bastian BC, Le Boit Ph E. Consumption of the epidermis. A diagnostic criterion for the differential diagnosis of melanoma and Spitz nevus. *Am J Surg Pathol* 2004; 28: 1621-5.
- 296- Walters RF, Groben PA, Busam K, Millikan RC, Rabinovitz H, Coggnetta A, et al. Consumption of the epidermis: A criterion in the differential diagnosis of melanoma and dysplastic envi that is associated with increasing Breslow depth and ulceration. *Am J Dermatopathol* 2007; 29: 527-33.
- 297- Braun-Falco M. Clef formation and consumption of the epidermis in cutaneous melanocytic lesions- reply. *Human Pathol* 2006; 37: 247
- 298- Dy LC, Bucket LJ, Hurwitz RM. Melanoma in situ with epidermal effacement: a compelling adjunctive finding. *J Drugs Dermatol* 2007; 6: 708-11.
- 299- Ohata C, Nakai C, Kasugai T, Katayama I. Consumption of the epidermis in acral lentiginous melanoma. *J Cutan Pathol* 2012; 39: 577-81.
- 300- Hsu MY, Meier F, Herlyn M. Melanoma development and progression. A conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 2002; 70: 522-36.
- 301- Hoffman UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruitter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 337-44.
- 302- Kaur P, Mulvaney M, Carlson JA. Basal cell carcinoma progression correlates with host immune response and stromal alterations: a histologic analysis. *Am J Dermatopathol* 2006; 28: 293-307.
- 303- Martin JM, Monteagudo C, Bella R, Reig I, Jorda E. Complete regression of a melanocytic nevus under intense pulsed light therapy for axillary hair removal in a cosmetic center. *Dermatology* 2012; 224: 193-7.
- 304- Park HK, Leonard DD, Arrington III JH, Lund HZ. Recurrent melanocytic nevi: clinical and histologic review of 175 cases. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17: 285-92.
- 305- Simonetti O, Goteri G, Lucarini G, Filosa A, Pieramici T, Rubini C, et al. Potential role of CCL27 and CCR10 expression in melanoma progression and immune scape. *Eur J Cancer* 2006; 42: 1181-7.
- 306- Bernsen MR, Diepstra JH, van Mil P, et al. Presence and localization of T-cell subsets in relation to melanocyte differentiation antigen expression and tumour

- regression as assessed by immunohistochemistry and molecular analysis of microdissected T cells. *J Pathol* 2004; 202: 70-9.
- 307- Deeths MJ, Kedl RM, Mescher MF. CD8+ T cells become nonresponsive (anergic) following activation in the presence of co stimulation. *J Immunol* 1999; 163: 102-110.
- 308- Marzo AL, Kinnear BF, Lake RA, Frelinger JJ, Collins EJ, Robinson BW, et al. Tumor-specific CD4+ T cells have a major “post-licensing” role in CTL mediated antitumor immunity. *J Immunol* 2000; 165: 6047-6055.
- 309- Mourmouras V, Fimiani M, Rubegni P, Epistolato MC, Malagnino V, Cardone C, et al. Evaluation of tumour-infiltrating CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in human cutaneous benign and atypical naevi, melanomas and melanoma metastases. *Br J Dermatol* 2007; 157: 531-9.
- 310- Mihm M, Clemente C, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases- a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest* 1996; 74: 43.
- 311- Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li XF, et al. Transforming growth factor-B-induced inhibition of T cell function susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance of immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol* 1991; 146: 1077-82.
- 312- Ohm JE, Carbone DP. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. *Immunol Res* 2001; 23: 263-72.
- 313- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo J, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorde-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313: 1960-4.
- 314- Nakagomi H, Petterson M, Magnusson I, Juhlin J, Matsuda M, Mellstedt H, et al. Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1993; 53: 5610-2.
- 315- Sheu BC, Lin RH, Ho HN, Huang SC. Down-regulation of CD25 expression on the surface of activated tumor-infiltrating lymphocytes in human cervical carcinoma. *Hum Immunol* 1997; 56: 39-48.
- 316- Serrano A. Células colaboradoras (TH1, TH2, TH17) y reguladoras (Treg, TH3, NKT) en la artritis reumatoide. *Reumatol Clin* 2009; 5:1-5.
- 317- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains

- (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-64.
- 318- Solomon GJ, Magro CM. Foxp3 expression in cutaneous T-cell lymphocytic infiltrates. *J Cutan Pathol* 2008; 35: 1032-9.
- 319- Linehan DC, Goedegebuure PS. CD25+CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Immunol Res* 2005; 32: 155-68.
- 320- Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E. FOXP3+ regulatory T-cells: current controversies and future perspectives. *Eur J Dermatol* 2006; 36: 2832-6.
- 321- Beyer M, Schultze JL. Regulatory T cells in cancer. *Blood* 2006; 108: 804-11.
- 322- Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 531-62.
- 323- Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* 2005; 6: 1142-51.
- 324- Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat Immunol* 2005; 6: 331-7.
- 325- Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 2001; 31: 1122-31
- 326- Antiga E, Quaglino P, Volpi W, Pierini I, Del Bianco E, Bianchi B, et al. Regulatory T cells in skin lesions and blood of patients with bullous pemphigoid. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2013; Jan 18. Doi: 10.1111/jdv.12091.
- 327- Walker LS. CD4+CD25+ Treg: divide and rule? *Immunology* 2004; 11. 129-37.
- 328- Nielsen J, Holm TL, Claesson HM. CD4+ CD25+ regulatory T Cells: II. Origin, disease models and clinical aspects. *APMIS* 2004; 112: 642-50.
- 329- Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naïve T cells. *J Exp Med* 2004; 199: 1401-12.
- 330- Schevach E. CD4+CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 389-400.

- 331- Ramsdell F. Foxp3 and natural regulatory T cells: key to a cell lineage? *Immunity* 2003; 19: 165.
- 332- Ahmadzadeh M, Felipe-Silva A, Heemskerk B, Powell Jr DJ, Wunderlich JR, Merino MJ, Rosenberg SA. FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions. *Blood* 2008; 112: 4953-60.
- 333- Murphy K, Travers P, Walport M. *Inmunología de Janeway*. Séptima edición. México DF: Mc Graw Hill. 2009
- 334- Viguier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, et al. Foxp3 expressing CD4+CD25 (high) regulatory T cells are overexpressed in human metastatic melanoma lymph node and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 2004; 173: 1444-53.
- 335- Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Gen* 2001; 27: 68.
- 336- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330.
- 337- Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LW, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005; 22: 329.
- 338- Ochs HD, Ziegler SF, Torgerson TR. FOXP3 acts as a rheostat of the immune response. *Immunol Rev* 2005; 203: 156.
- 339- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T-cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6: 345-52.
- 340- Javia LR, Rosenberg SA. CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother* 2003; 26: 85.
- 341- Gray CP, Arosio P, Hersey P. Association of increased levels of heavy-chain ferritin with increased CD4+CD25+ regulatory T-cell levels in patients with melanoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2551.
- 342- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 2004; 10: 942-9.

- 343- Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Adv Immunol* 2003; 81: 331.
- 344- Sato E, Olson SH, Ahn J, et al. Intraepithelial CD8+tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+ /regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18538.
- 345- Gao Q, Qiu Sj, Fan J, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* 2007; 25: 2586.
- 346- Chambers CA, Muhns MS, Egen JG, Allison JP. CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 565.
- 347- Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322: 271.
- 348- Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gasti G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Res Cancer* 2003; 9: 606-12.
- 349- Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 2002; 169: 2756-61.
- 350- Woo EY, Yeh H, Chu CS, Schlienger K, Carroll RG, Riley JL, et al. Cutting edge: regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cells proliferation. *J Immunol* 2002; 168: 4272-76.
- 351- Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4404-8.
- 352- Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatoru T cells in disease progression. *Cancer* 2003; 98: 1089-99.
- 353- Kobayashi N, Hiraoka N, Yamagami W, Ojima H, Kanai Y, Kosuge T et al. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 902-11.
- 354- Boon T, Coulie PG, Van der Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 175-208.

- 355- Harlin H, Kuna TV, Peterson AC, Meng Y, Gajewsky TF. Tumor progression despite massive influx of activated CD8+ T cells in a patient with malignant melanoma ascites. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 1185-97.
- 356- Hussein MR. Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. *J Clin Pathol* 2004; 57: 797-801
- 357- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 2004; 10: 909-15.
- 358- DePanfilis G, Camparini N, Santini M, Mori G, Tognetti E, Maestri R, et al. Phase and stage related proportions of T cells bearing the transcription factor FOXP3 infiltrate primary melanoma. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 676-84
- 359- Gajewski TF, Meng Y, Harlin H. Immune suppression in the tumor microenvironment. *J Immunother* 2006; 29: 233-40.
- 360- Bui JD, Uppaluri R, Hsieh CS, Schreiber RD. Comparative analysis of regulatory and effector T cells in progressively growing versus rejecting tumors of similar origins. *Cancer Res* 2006; 66: 7301-9.
- 361- Mapara MY, Sykes M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1136-51.
- 362- Kimpfler S, Sevko A, Ring S, Kalk C, Osen W, Frank K, et al. Skin melanoma development in ret transgenic mice despite the depletion of CD25+FoxP3+ regulatory T cells in lymphoid organs. *J Immunol* 2009; 183: 6330-7.
- 363- Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* 2006; 108: 2957-64.
- 364- Ma MW, Medicherla RC, Qian, et al. Immune response in melanoma: an in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node. *Mod Pathol* 2012; 25: 1000-10.
- 365- Whiteside TL, Letessier E, Hirabayashi H, Vitolo D, Bryant J, Barbes L, et al. Evidence for local and systemic activation of immune cells by peritumoral injections of interleukin-2 in patients with advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 1993; 53: 5654-62.
- 366- Si Z, Hersey P, Coates AS. Clinical responses and lymphoid infiltrates in metastatic melanoma following treatment with intralesional GM-CSF. *Melanoma Res* 1996; 6: 247-55

- 367- Layandi A, et al. T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 521-30.
- 368- Bozdogan N, Bozdogan O, Pak I, Atasoy P. FAS, FAS ligand, tumor infiltrating lymphocytes and macrophages in malignant melanoma: an immunohistochemical study. *Int J Dermatol* 2010; 49: 761-7.
- 369- Sprecher E, Bergmann R, Meilick A, et al. Fas and Fas ligand expression in melanocytic tumors. *J Cutan Pathol* 1999; 26: 72-7.
- 370- Maeda A, Aragane Y, Tezuka T. Expression of CD95 ligand in melanocytic lesions as a diagnostic marker. *Br J Dermatol* 1998; 139: 198-206.
- 371- Shukuwa T, Katayama I, Kojo T. Fas-mediated apoptosis of melanoma cells and infiltrating lymphocytes in malignant melanoma. *Mod Pathol* 2002; 15: 387-96.
- 372- Neuber K, Eidam B. Expression of Fas ligand (CD95L) in primary malignant melanoma metastases is associated with overall survival. *Onkologie* 2006; 29: 361-5.
- 373- Redondo P, Solano T, Vazquez B, et al. Fas and Fas ligand: expression and soluble circulating levels in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* 2002; 147: 80-6.
- 374- Soubrane C, Mouawad R, Antoine EC, et al. A comparative study of Fas and Fas-ligand expression during melanoma progression. *Br J Dermatol* 2000; 143: 307-12.
- 375- Terheyden P, Siedel C, Merkel A, et al. Predominant expression of fas ligand in metastatic melanoma revealed by longitudinal analysis. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 899-902.
- 376- Clark-Lewis I, Mattioli I, Gong JH, et al. Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem* 2003; 278: 289-95.
- 377- Monteagudo C, Pellín-Carcelén A, Martín JM, Ramos D. Papel de las quimiocinas en la progresión del melanoma. *Actas Dermosifiliogr* 2011; 102: 498-504.
- 378- Wenzel J, Bekisch B, Uerlich M, Haller O, Bieber T, Tuting T. Type I interferon-associated recruitment of cytotoxic lymphocytes. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 37-48.

- 379- Wenzel J, Uerlich M, Haller O, et al. Enhanced type I interferon signaling and recruitment of chemoquine receptor CXCR3 expressing lymphocytes into the skin following treatment with TLR-7 agonist imiquimod. *J Cutan Pathol* 2005; 32: 257-62.
- 380- Monteagudo C, Ramos D, Pellin-Carcelen A, Gil R, Callaghan RC, Martin JM, et al. CCL27-CCR10 and CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor mRNA expression ratio: new predictive factors of tumor progression in cutaneous malignant melanoma. *Clin Experimental Metast* 2012; 29: 625-37.
- 381- Bastian BC, LeBoit PE, Pinkel D. Genomic approaches to skin cancer diagnosis. *Arch Dermatol* 2001; 137: 1507-11.
- 382- Bastian BC. The longer your telomeres, the larger your nevus? *Am J Dermatopathol* 2003; 25: 83-4.
- 383- Mathon NF, Lloyd AC. Cell senescence and cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 203-13.
- 384- Nan H, Du M, De Vivo I, Manson JE, Liu S, McTierman A, et al. Shorter telomeres associate with a reduced risk of melanoma development. *Cancer Res* 2011; 71: 6758-63.
- 385- Ma H, Zhou Z, Wei S, Liu Z, Pooley KA, Dunning AM, et al. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2011; 6: e20466.
- 386- Wentzensen IM, Mirabello L, Pfeiffer RM, Savage SA. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20: 1238-50.
- 387- Han J, Qureshi AA, Prescott J, Guo Q, Ye L, Hunter DJ, et al. A prospective study of telomere length and the risk of skin cancer. *J Invest Dermatol* 2009; 129: 415-21.
- 388- Shay JW, Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 2005; 26: 867-74.
- 389- Greenberg RD, Chin L, Femino A, et al. Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a (delta 2/3) cancer-prone mouse. *Cell* 1999; 97: 515-25.
- 390- Cottliar ASH, Slavutsky IR. Telómeros y actividad de telomerasa. Su participación en el envejecimiento y el desarrollo neoplásico. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60: 335-42.

- 391- Scott RS, Mc Mahon EJ, Pop SM, et al. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 2001; 411: 207-11.
- 392- Schmid I, Jamieson BD. Assessment of telomere length, phenotype and DNA content. *Curr Protoc Cytom* 2004; 7: 26.
- 393- Baerlocher GM, Vulto I, de Jong G, Lansdorp PM. Flow cytometry and FISH to measure the average length of telomeres. *Nat Protoc* 2006; 1: 2365-76.
- 394- Raynaud CM, Jang SJ, Nuciforo P, Lantuejoul S, Brambilla E, Mounier N, et al. Telomere shortening is correlated with the DNA damage response and telomeric protein down-regulation in colorectal preneoplastic lesions. *Ann Oncol* 2008; 19: 1875-81.
- 395- Von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002; 27: 339-44.
- 396- Artandi SE, dePinho RA. A critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10: 39-46.
- 397- Van Heek NT, Meeker AK, Kem SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, et al. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 2002; 161: 1541-7.
- 398- Poopenalli A, Banerjee B, Ramnarayanan K, Palanisamy N, Putti TC, Hande MP. Telomere-mediated genomic instability and the clinico-pathological parameters in breast cancer. *Genes, chromosomes and cancer* 2008; 47: 1098-1109.
- 399- Williamson SR, Zhang S, Lopez-Beltran, Montironi R, Wang M, Cheng L. Telomere shortening distinguishes inverted urothelial neoplasms. *Histopathology* 2013; 62: 595-601.
- 400- Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. *Physiol Rev* 2008; 88: 557-79.
- 401- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 187-91.
- 402- Subhawong AP. The alternative lengthening of telomeres phenotype in breast carcinomas associated with HER-2 overexpression. *Mod Pathol* 2009; 22: 1423-31.
- 403- Toussaint, Medrano EE, Von Zglinicki T. Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 2000; 35: 927-45.

- 404- Abdel-Malek ZA, Swope VB, Nordlund JJ, et al. Proliferation and propagation of human melanocytes in vitro are affected by donor age and anatomical site. *Pigment Cell Res* 1994; 7: 116-22.
- 405- Ramirez RD, D'Atri S, Pagani E, et al. Progressive increase in telomerase activity from benign melanocytic conditions to malignant melanoma. *Neoplasia* 1999; 1: 42-9.
- 406- Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA, et al. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3317-26.
- 407- Zhou X, Meeker AK, Makambi KH, Kost O, Kallakury BVS, Sidawy MK. Et al. Telomere length variation in normal epithelial cells adjacent to tumor: potential biomarker for breast cancer local recurrence. *Carcinogenesis* 2012; 33: 113-8.
- 408- Miracco C, Margherita De Santi M, Schurfeld K, Santopietro R, Lalinga AV, Fimiani AV, et al. Quantitative in situ evaluation of telomeres in fluorescence in situ hybridization-processed sections of cutaneous melanocytic lesions and correlation with telomerase activity. *Br J Dermatol* 2002; 146: 399-408
- 409- Miracco C, Pacenti L, Santopietro R, Laurini L, Biagioli M, Luzi P. Evaluation of telomerase activity in cutaneous melanocytic proliferations. *Hum Pathol* 2000; 31: 1018-21.
- 410- Gray-Schopfer VC, Cheong SC, Chong H, Chow J, Moss T, Abdel-Malek ZA, et al. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16?. *Br J Cancer* 2006; 95: 496-505.
- 411- Goldstein AM, Tucker MA. Genetic epidemiology of cutaneous melanoma. A global perspective. *Arch Dermatol* 2001; 137: 1493-6.
- 412- Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, Perez-Gomez B, Sanchez L, Acuña MJ, et al. Progression in cutaneous melanoma is associated with distinct expression profiles. A tissue microarray-based study. *Am J Pathol* 2004; 164: 193-203.
- 413- Gajewski TF, Meng Y, Harlin H. Immune suppression in the tumor microenvironment. *J Immunother* 2006; 29: 233-40.
- 414- Bui JD, Uppaluri R, Hsieh CS, Schreiber RD. Comparative analysis of regulatory and effector T cells in progressively growing versus rejecting tumors of similar origins. *Cancer Res* 2006; 66: 7301-9.
- 415- Mapara MY, Sykes M. Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *J Clin Oncol* 2004; 22: 1136-51.

- 416- Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 787- 91.
- 417- Henson JD, Hannay JA, McCarthy SW, et al. A robust assay for alternative lengthening of telomeres in tumors shows the significance of alternative lengthening of telomeres in sarcomas and astocytomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 217-25.
- 418- Hakin-Samith V, Jellinek DA, Levy D, et al. Alternative lengthening of telomeres and survival in patients with glioblastoma multiforme. *Lancet* 2003; 361: 836-8.

VI- ANEXO

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS RELACIONADAS CON EL TEMA DEL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

AUTORES: Martín JM, Jordá E, Calduch L, Alonso V, Revert A.

TÍTULO: **Progressive depigmentation of a palmar congenital melanocytic nevus without halo phenomenon associated.**

REVISTA: Dermatology 2006; 212: 198-9. (IF 2,71)

AUTORES: Martín JM, Jorda E, Monteagudo C, Alonso V, Villalon G, Ramón D.

TÍTULO: **Desmoplastic giant congenital nevus with progressive depigmentation.**

REVISTA: J Am Acad Dermatol 2007; 56: S10-S14. (IF 4,27)

AUTORES: Monteagudo C, Martín JM, Jordá E, Llombart-Bosch A.

TÍTULO: **CXCR3 chemokine receptor immunoreactivity in primary cutaneous malignant melanoma: correlation with clinicopathologic prognostic factors.**

REVISTA: J Clin Pathol 2007; 60: 596-9. (IF 2,30)

AUTORES: Martín JM, Núñez J, López V, Rubio M, Monteagudo C, Jordá E.

TÍTULO: **Estudio descriptivo dermatoscópico de los nevos melanocíticos con despigmentación sin halo clínico.**

REVISTA: Actas Dermosifiliogr 2011; 102: 344-53.

AUTORES: Monteagudo C, Pellín-Carcelén A, Martín JM, Ramos D.

TÍTULO: **Papel de las quimiocinas en la progresión del melanoma.**

REVISTA: Actas Dermosifiliogr 2011; 102: 498-504.

AUTORES: Martín JM, Bella R, Jorda E.

TÍTULO: **Vascularización en dermatoscopia.**

REVISTA: Actas Dermosifiliogr 2012; 103: 357-75.

AUTORES: Martín JM, Rubio M, Bella R, Jorda E, Monteagudo C.

TÍTULO: **Regresión completa de nevos melanocíticos: correlación clínica, dermatoscópica e histológica de una serie de 13 casos.**

REVISTA: Actas Dermosifiliogr 2012; 103: 401-10.

AUTORES: Monteagudo C, Ramos D, Pellin-Carcelen A, Gil R, Callaghan RC, Martín JM, Alonso V, Murgui A, Navarro L, Calabuig S, Lopez-Guerrero JA, Jorda A, Pellin A.

TÍTULO: **CCL27-CCR10 and CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor mRNA expression ratio: new predictive factors of tumor progression in cutaneous malignant melanoma.**

REVISTA: Clin Experimental Metast 2012; 29: 625-37. (IF 3,52)

AUTORES: Martín JM, Monteagudo C, Bella R, Reig I, Jorda E.

TÍTULO: **Complete regression of a melanocytic nevi under intense pulsed-light treatment for axillary hair removal therapy in a cosmetic center.**

REVISTA: Dermatology 2012; 224: 193-7. (IF 2,71)

AUTORES: Martín JM, Rubio M, Monteagudo C, Jorda E.

TÍTULO: **Progressive depigmentation of a melanocytic lesion. A dermoscopic challenge for melanoma diagnosis.**

REVISTA: Int J Dermatol 2013; 52: 339-41. (IF 1,26)

AUTORES: Avram G, Sanchez-Sendra B, Martín JM, Terrádez L, Ramos D, Monteagudo C.

TÍTULO: **The density and type of MECA-79-positive high endothelial venules correlate with lymphocytic infiltration and tumor regression in primary cutaneous melanoma.**

REVISTA: Histopathology 2013; 63: 852-61. (IF 2,85)

AUTORES: Martín JM, Jorda E, Monteagudo C.

TÍTULO: **Florid fibroplasia in melanocytic lesions. A retrospective study.**

REVISTA: J Eur Acad Dermatol Venereol 2014; 28: 522-4. (IF 2,69)

AUTORES: Martín JM, Pinazo I, Monteagudo C, Markovic J, Allende A, Jorda E.

TÍTULO: **Spontaneous regression of multiple melanocytic nevi following melanoma. Report of 3 cases.**

REVISTA: Am J Dermatopathol AJD-D-13-00307R1. (IF 1,41). En prensa.

AUTORES: Martin JM, Pinazo I, Mateo JF, Escandell I, Jordá E, Monteagudo C.

TÍTULO: **Evaluación de la regresión en melanomas primarios sucesivos.**

REVISTA: Actas Dermosifiliogr 2014 May 28. Doi: 10.1016/j.ad.2014.01.006. Epub ahead of print. PMID: 24880710.

AUTORES: Saravia M, Pellicer Z, Martin JM, Monteagudo C.

TÍTULO: **Clinically atypical Spitzoid lesions: Semiquantitative histologic index correlation with dermoscopic scores (ABCD rule, 7-point checklist and pattern analysis).**

REVISTA: J Eur Acad Dermatol Venereol 2014 Aug 4. Doi: 10.1111/jdv. 12649. Epub ahead of print. PMID: 25087589. (IF 2,69)

**COMUNICACIONES PRESENTADAS EN CONGRESOS RELACIONADAS
CON EL TEMA DEL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL**

TÍTULO: CXCR3 Chemoquine Receptor Immunoreactivity in Primary Cutaneous Malignant Melanoma.

AUTORES: Monteagudo C, Martin JM, Jorda E, Llombart-Bosch A.

CONGRESO: 93rd Annual Meeting United States and Canadian Academy of Pathology.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Vancouver. Canada.

FECHA: 2004.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Póster.

TÍTULO: Despigmentación progresiva de un nevus congénito gigante desmoplásico.

AUTORES: Martín JM, Alonso D, Ramón D, Monteagudo C, Molina I, Villalón G, Calduch L, Jordá E.

CONGRESO: XVII Reunión del Grupo Español de Dermatología Pediátrica.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Tarragona.

FECHA: 27 y 28 enero 2006.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Comunicación oral.

TÍTULO: Despigmentación en lesiones melanocíticas.

AUTORES: Martín JM, López V, Alonso V, Martí N, Villalón G, Godoy R, Monteagudo C, Jordá E.

CONGRESO: XXXVI Congreso Nacional de Dermatología y Venereología.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Barcelona.

FECHA: 11-14 junio 2008.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Póster.

TÍTULO: Comparative Expression of CXCR3 Chemoquine Receptor and their Ligands (CXCL9, CXCL10 and CXCL11) in Cutaneous Melanoma progression.

AUTORES: Pellin-Carcelen A, Ramos D, Martin JM, Jorda A, Pellin A, Monteagudo C.

CONGRESO: 98th Annual Meeting United States and Canadian Academy of Pathology.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Boston. United States.

FECHA: March 7-13. 2009.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Póster.

TÍTULO: Despigmntación de nevos melanocíticos sin halo clínico.

AUTORES: Martín JM, Rubio M, López V, Martí N, Gámez L, Gutiérrez E, González A, Jordá E.

CONGRESO: XXXVIII Congreso Nacional de Dermatología y Venereología.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Málaga.

FECHA: 26-29 Mayo 2010.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Póster.

TÍTULO: Regression of melanocytic nevi without halo phenomenon.

AUTORES: Gutiérrez E, González A, Martí N, Gámez L, Reig I, López V, Martín JM, C. Monteagudo C, Jordá E.

CONGRESO: European Academy Dermatology Venereology Congress. Gothemburg.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Gothemburg. Sweeden.

FECHA: 6-10 October. 2010.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Póster.

TÍTULO: Desayunos con truco. Trucos dermatoscópicos.

AUTORES: Martín JM, Bella R.

CONGRESO: I Congreso de la Sección Territorial Valenciana de la Academia Española de Dermatología y Venereología.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Alicante.

FECHA: 1-2 Abril 2011.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Ponencia.

TÍTULO: Regresión completa de nevos melanocíticos: estudio de correlación clínica, dermatoscópica e histológica.

AUTORES: Martín JM, Rubio M, Gamez L, Reig I, González A, Jordá E, Monteagudo C.

CONGRESO: XXXIX Congreso Nacional de Dermatología y Venereología.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Santiago de Compostela.

FECHA: 8-11 Junio 2011.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Póster.

TÍTULO: Implicación de los telómeros en la regresión espontánea de nevos melanocíticos y melanomas.

AUTORES: Martín JM, San Miguel T, Ruiz A, Jordá E, Monteagudo C.

CONGRESO: XXXX Congreso Nacional de Dermatología y Venereología.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Oviedo.

FECHA: 6-9 Junio 2012.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Póster.

TÍTULO: The role of telomeres in spontaneous regression of melanoma and melanocytic nevi.

AUTORES: Martín JM, De Miguel T, Ruiz A, Martín A, Gavrilova M, Murgui A, Jordá E, Monteagudo C.

CONGRESO: 21nd European Academy Dermatology Venereology Congress.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Prague. Czech Republic.

FECHA: 27-30 September. 2012.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Póster.

TÍTULO: Regresión espontánea de múltiples nevus melanocíticos tras melanoma.

AUTORES: Martín JM, Pinazo I, Monteagudo C, Allende A, Bella R, Pellicer Z, Jordá E.

CONGRESO: XXXXI Congreso Nacional de Dermatología y Venereología.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Valencia.

FECHA: 5-8 Junio. 2013.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Póster.

TÍTULO: La densidad y el tipo de vénulas de endotelio alto MECA-79+ se correlacionan con la expresión de quimiocinas CCL19 y CCL21, el infiltrado linfocitario y la regresión tumoral en el melanoma cutáneo.

AUTORES: Monteagudo C, Avram G, Sánchez-Sendra B, Martín JM, Terrádez L, Ramos D.

CONGRESO: XXXIX Reunión Nacional del Grupo Español de Dermatopatología.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Alicante.

FECHA: 8-9 Noviembre. 2013.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Comunicación oral.

TÍTULO: Nevus atípicos de Spitz/Reed: correlación de las escalas dermatoscópicas e histológicas.

AUTORES: Sarabia M, Pellicer Z, Martín JM, Monteagudo C.

CONGRESO: XXXIX Reunión Nacional del Grupo Español de Dermatopatología.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Alicante.

FECHA: 8-9 Noviembre. 2013.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Póster.

TÍTULO: Evaluación de parámetros clínico-patológicos diferenciales en la regresión espontánea de melanomas y nevos melanocíticos.

AUTORES: Martín JM, Escandell I, Ayala D, Allende A, Beteta G, Jordá E, Monteagudo C.

CONGRESO: XXXXII Congreso Nacional de Dermatología y Venereología.

LUGAR DE CELEBRACIÓN: Maspalomas. Gran Canaria

FECHA: 4-7 Junio. 2014.

TIPO DE PRESENTACIÓN: Póster.

**PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN RELACIONADOS
CON EL TRABAJO DE TESIS DOCTORAL.**

- Investigador colaborador en el proyecto **“Estudio de la expresión de receptores de quimiocinas CXC (CXCR 1-4) en melanoma cutáneo: valor predictivo de diseminación metastásica”**.

Becas para proyectos de investigación en biomedicina. Conselleria de Sanitat-EVESP. BM-019/2002.

Investigador principal: Carlos Monteagudo.

- Investigador colaborador en el proyecto **“Influencia del perfil de expresión de receptores de quimiocinas CXC y CC, y la posible producción autocrina de sus ligandos, por células de melanoma humano, sobre la migración celular y diseminación metastásica del melanoma in vivo”**.

Beca FIS. Investigación básica en mecanismos de enfermedad y nuevas estrategias y modelos terapéuticos. Expediente PI071203. 2007

Investigador principal: Carlos Monteagudo

- Investigador colaborador en el proyecto **“Determinación de parámetros clínico-patológicos y moleculares implicados en la regresión espontánea de las neoplasias melanocíticas cutáneas”**.

Becas para proyectos de investigación en biomedicina. Conselleria de Sanitat-EVESP. BM-. AP-032/10. 2010.

Investigador principal: Carlos Monteagudo.

- Investigador colaborador en el proyecto **“Estudio de la implicación de determinados miRNAs en la progresión tumoral del melanoma cutáneo y su utilidad como biomarcadores pronósticos y terapéuticos”**.

Beca FIS. Investigación básica en mecanismos de enfermedad y nuevas estrategias y modelos terapéuticos. Expediente PI13/02786. 2013

Investigador principal: Carlos Monteagudo

PREMIOS RECIBIDOS RELACIONADOS CON ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

- **Premio “August C. Stiefel”** al mejor tema libre sobre Dermatología Médico Quirúrgica y Venereología, convocado por la Academia Española de Dermatología y Venereología, por el trabajo **“Despigmentación de nevos melanocíticos sin halo clínico”**. Año 2010.

Autores: José M^a Martín, Julio Núñez, Verónica López, Miguel Rubio, Carlos Monteagudo, Esperanza Jordá.

- **Premio “Juan de Azúa”** al mejor tema libre sobre Dermatología Médico Quirúrgica y Venereología, convocado por la Academia Española de Dermatología y Venereología, por el trabajo **“Regresión completa de nevos melanocíticos: correlación clínica, dermatoscópica e histológica”**. Año 2011.

Autores: José M^a Martín, Miguel Rubio, Rebeca Bella, Esperanza Jordá, Carlos Monteagudo.

- **Premio a los mejores artículos publicados en 2011**, concedido por la Sección Territorial Valenciana de la Academia Española de Dermatología y Venereología. Año 2012. **“Estudio descriptivo dermatoscópico de los nevos melanocíticos con despigmentación sin halo clínico”**. Actas Dermosifiliogr 2011; 102: 344-53.

Autores: José M^a Martín, Julio Núñez, Verónica López, Miguel Rubio, Carlos Monteagudo, Esperanza Jordá.

BECAS RECIBIDAS RELACIONADAS CON EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO DE TESIS DOCTORAL

- Beca concedida por la **European Academy of Dermatology and Venereology** para asistir al 21th Congress of The European Academy of Dermatology and Venereology en Praga, en septiembre de 2012, para exponer un trabajo relacionado con el tema de la Tesis Doctoral.

