

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Determinación del papel oncogénico de la expresión de
proteínas de fusión de la vía tirosinquinasa en las neoplasias
Spitzoides**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Greissy Tibisay Vázquez Benítez

Directores

María Concepción Garrido Ruiz

José Luis Rodríguez Peralto

Madrid

© Greissy Tibisay Vázquez Benítez, 2019

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de medicina
Departamento de Anatomía Patológica

Tesis Doctoral

**Determinación del papel oncogénico de la
expresión de proteínas de fusión de la vía tirosin-
quinasa en las neoplasias Spitzoides**



Autor: Greissy Tibisay Vázquez Benítez

Directores: María Concepción Garrido Ruiz y José Luis
Rodríguez Peralto

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

D./Dña. Greissy Tibisay Vázquez Benítez,
estudiante en el Programa de Doctorado Investigación en Ciencias Médico-Quirúrgicas,
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Determinación del papel oncogénico de la expresión de proteínas de fusión de la vía tirosin-quinasa
en las neoplasias Spitzoides

y dirigida por: María Concepción Garrido Ruiz y José Luis Rodríguez Peralto

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 27 de mayo de 2019

**Greissy
Tibisay
Vázquez
Benítez**
Fdo.: _____

Firmado digitalmente por Greissy Tibisay Vázquez Benítez
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=Greissy Tibisay Vázquez Benítez, o=Hospital Universitario Puerta de Hierro, ou=Hospital, email=greissytibisay.vazquez@salud.madrid.org, c=ES
Fecha: 2019.05.15 15:53:42 +02'00'

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

A Dios por ser la fuerza que me mueve cada día.

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo a través del tiempo.

A mi esposo por ser luz, mi aliento y fortaleza.

A los pacientes, sin ellos, nada sería posible.

A mi amada patria, Venezuela, a la que llevo siempre en el corazón.

Para aquellos que anhelan la sabiduría,
Ella misma se anticipa a darse a conocer.
No se fatigará quien la busque de madrugada,
Pues la encontrará sentada ante su puerta.
Meditar sobre ella es prudencia consumada,
Quien por ella no ahorra desvelos,
Se verá pronto libre de inquietudes.
Porque ella misma busca con afán
A quienes considera dignos de su favor;
Se les manifiesta benévola en todos los caminos
Y les sale al encuentro en todos sus proyectos.
Su comienzo es el sincero deseo de instrucción;
El deseo de instrucción significa amarla.
Sabiduría 6,13-17

"Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo"

Marie Curie (1867-1934)

Agradecimientos

A mis directores de tesis, quienes desde el primer día confiaron en mí, en que podía asumir la responsabilidad de realizar este proyecto. A José Luis quien sabe transmitir conocimientos con un balance entre lo estricto y el sentido del humor, y de quien nunca obtuve un “no” por respuesta al querer desarrollar cada parte de este trabajo y a María por haber sido cercana, que a pesar de las dificultades con su paciencia y motivación todo salió adelante.

A todos los miembros del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital 12 de Octubre quiero agradecerles su contribución en la elaboración de este trabajo. En especial agradecer a Rosa y a Yolanda Ruano gracias por su tiempo, dedicación y paciencia. A la unidad de soporte estadístico, David Lora y Carmen Romero, quienes me ayudaron con mucha paciencia en el análisis estadístico de los datos.

A mis padres y toda mi familia quienes son mi pilar. Especialmente agradezco a mi madre, cuyo amor infinito me impulsa a dar siempre lo mejor de mí, quien se trasnochó tanto como yo cada día durante los años de la facultad de medicina, quien fue mi primera paciente mientras practicaba semiología, la que siempre se preocupó para que yo tuviera comida recién hecha cada día, quien vivió tanto como yo el estrés de cada examen, cada proyecto, cada meta, sin ti nada hubiera sido posible.

A mi esposo, quien intenta que no pierda el norte y me hace ver siempre con más claridad el camino, gracias por tu sensatez, por tu paciencia, por emprender conmigo cada aventura y por darme la fuerza más grande que se pueda pedir, tu amor.

Y finalmente a mi hermoso país, Venezuela, que en medio del caos me quitó el miedo y me hizo más fuerte.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	11
Índice de figuras	17
Índice de tablas	19
ABREVIATURAS	21
Abreviaturas	23
RESUMEN.....	25
Resumen.....	27
Abstract.....	31
INTRODUCCIÓN.....	35
I.INTRODUCCIÓN.....	37
Características de la piel.....	37
1.1 Epidermis	37
1.2. Dermis y tejido celular subcutáneo	38
Tumores melanocíticos benignos: nevus	38
2.1. Nevus melanocíticos adquiridos.....	39
2.1.1 Epidemiología.....	39
2.1.2 Características clínicas.....	39
2.1.3 Características histológicas	39
2.2 Nevus de Spitz.....	40
2.2.1 Epidemiología.....	40
2.2.2 Características clínicas.....	40
2.2.3 Características histológicas	40
3. Tumores melanocíticos atípicos.....	42
3.1 Tumor de Spitz atípico.....	42
3.1.1 Epidemiología.....	42
3.1.2 Características Clínicas	43
3.1.3 Características histológicas.....	43
4. Lesiones melanocíticas malignas.....	44
4.1 Melanoma.....	44
4.1.1 Epidemiología.....	44
4.1.2. Características clínicas.....	45
4.1.3 Características histológicas	45
4.2. Melanoma de Spitz.....	46
4.2.1 Epidemiología.....	46
4.2.2 Características clínicas.....	46
4.2.3 Características microscópicas	47
Vías moleculares involucradas en la patogénesis y en el diagnóstico de los tumores melanocíticos	48

Vía de MAPK	48
Clasificación de los tumores de Spitz en base a sus alteraciones genéticas	50
HRAS	51
BAP1	52
Fusiones en la vía de la tirosin quinasa	55
ROS1	55
NTRK.....	56
ALK.....	57
BRAF	59
RET	59
MET	60
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	65
II. Justificación, Hipótesis y objetivos.....	67
1. Justificación	67
Vías de activación en los tumores de Spitz.....	67
Técnicas actualmente utilizadas para la detección de alteraciones genéticas en los tumores melanocíticos.....	68
Comportamiento biológico de los tumores de Spitz.....	71
Identificación de biomarcadores como posibles dianas terapéuticas.....	72
2. Hipótesis.....	73
3. Objetivos	74
Principal:	74
Secundarios	74
MATERIAL Y MÉTODOS.....	75
III. Material y métodos.....	77
1. Muestras tisulares: selección de casos.....	77
2. Variables clínicas, histológicas y moleculares.....	78
2.1 Variables clínicas	78
2.2 Variables histológicas	78
2.3 Variables moleculares.....	83
Técnica de inmunohistoquímica.....	83
Técnica de FISH	83
Técnica de PCR.....	84
3. Procesamiento de muestras	84
3.1 Tinciones de inmunohistoquímica.....	84
3.2 FISH	85
3.3 PCR	86
4. Valoración de las muestras.....	88
5. Almacenamiento de datos.....	89
6. Estudio estadístico	89

Análisis descriptivo	89
Análisis de la expresión molecular.....	89
7. Aspectos éticos y legales	90
RESULTADOS.....	91
IV. RESULTADOS	93
Características clínicas de las lesiones melanocíticas	93
Edad.....	94
Sexo	95
Localización de las lesiones melanocíticas.....	96
Características histológicas de los tumores melanocíticos	96
2.1. Nevus de Spitz	98
2.2 Tumor de Spitz atípico.....	100
2.3. Melanomas de Spitz	101
2.4. Nevus melanocítico	103
2.5. Melanomas.....	104
Resultados con técnica de inmunohistoquímica en los tumores melanocíticos. ..	105
ALK	105
NTRK	109
BRAF.....	113
BAP1	117
MET, RET, ROS1	120
Asociación del estado mutacional de los tumores melanocíticos con las características clínicas y fenotípicas histológicas	121
Resultados con técnicas de FISH y PCR	127
HRAS	127
ALK.....	128
NTRK	128
BRAF.....	129
MET, RET y ROS1	130
Comparación de resultados con técnicas de inmunohistoquímica con las técnicas de FISH y PCR.	131
ALK	132
NTRK	134
BRAF.....	136
Algoritmo predictor de alteraciones genéticas	138
DISCUSIÓN	141
V. Discusión	143
Análisis de las características clínicas de las lesiones melanocíticas.....	143
Edad.....	143
Sexo	145

Localización.....	146
Análisis de las características histológicas de las lesiones melanocíticas	147
Morfología celular	148
Morfología polipoide	148
Pigmentación.....	149
Extensión pagetoide	150
Componente epidérmico.....	151
Ulceración	152
Infiltrado inflamatorio	152
Análisis de los hallazgos inmunohistoquímicos	153
Inmunohistoquímica ALK.....	154
Inmunohistoquímica NTRK.....	158
Inmunohistoquímica BRAF	160
Inmunohistoquímica BAP1	163
Inmunohistoquímica RET Y MET.....	164
Inmunohistoquímica ROS1	165
Análisis de los hallazgos obtenidos con los FISH y PCR.	166
FISH de HRAS	166
FISH de ALK	168
FISH de NTRK	169
PCR BRAF	171
FISH de MET, RET y ROS-1	173
Comparación de las técnicas de inmunohistoquímica con FISH y PCR	175
ALK	175
NTRK	177
BRAF.....	178
Análisis del algoritmo predictor	181
Fortalezas y debilidades del estudio	183
Fortalezas	183
Debilidades.....	184
Preguntas sin respuesta y planteamientos futuros	185
CONCLUSIONES	187
BIBLIOGRAFÍA.....	191
Bibliografía	193

Índice de figuras

FIGURA 1: NEVUS DE SPITZ, HALLAZGOS HISTOLÓGICOS.....	41
FIGURA 2 ESQUEMA DE LA VÍA MAPK.....	48
FIGURA 3 NEVUS DE SPITZ CON MUTACIÓN DE HRAS.....	52
FIGURA 4 TUMOR MELANOCÍTICO CON MUTACIÓN DE BAP-1.....	53
FIGURA 5 TUMOR DE SPITZ ALK POSITIVO CON INMUNOHISTOQUÍMICA.....	58
FIGURA 6 RESUMEN DE LAS ALTERACIONES MOLECULARES MÁS FRECUENTES EN LAS LESIONES MELANOCÍTICAS.....	62
FIGURA 7 CÉLULAS DE MORFOLOGÍA EPITELIOIDE.....	79
FIGURA 8 CÉLULAS DE MORFOLOGÍA FUSIFORME.....	79
FIGURA 9 CÉLULAS DE MORFOLOGÍA REDONDEADA.....	80
FIGURA 10 TUMOR CON MORFOLOGÍA POLIPOIDE.....	80
FIGURA 11 TUMOR MELANOCÍTICO PIGMENTADO.....	81
FIGURA 12 TUMOR MELANOCÍTICO CON EXTENSIÓN PAGETOIDE.....	81
FIGURA 13 TUMOR MELANOCÍTICO CON COMPONENTE EPIDÉRMICO.....	82
FIGURA 14 TUMOR MELANOCÍTICO CON LINFOCITOS INTRATUMORALES.....	82
FIGURA 15 TUMOR MELANOCÍTICO CON ULCERACIÓN SUPERFICIAL.....	82
FIGURA 16 DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE LOS TIPOS DE LESIONES MELANOCÍTICAS INCLUIDAS EN EL ESTUDIO.....	93
FIGURA 17 DISTRIBUCIÓN SEGÚN EL SEXO EN LOS TUMORES DE SPITZ Y EN LOS NEVUS Y MELANOMAS CONVENCIONALES.....	95
FIGURA 18 DISTRIBUCIÓN DE LA LOCALIZACIÓN EN GRUPOS DE LESIONES MELANOCÍTICAS DE SPITZ VS DE TIPO NO SPITZ.....	96
FIGURA 19 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE NEVUS DE SPITZ INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.....	99
FIGURA 20 NEVUS DE SPITZ INCLUIDOS EN EL ESTUDIO.....	99
FIGURA 21 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE TUMORES DE SPITZ ATÍPICOS....	100
FIGURA 22 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE MELANOMAS DE SPITZ.....	102
FIGURA 23 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS NEVUS MELANOCÍTICO.....	103
FIGURA 24 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DE MELANOMAS.....	104
FIGURA 25 NEVUS DE SPITZ ALK POSITIVO CON INMUNOHISTOQUÍMICA.....	107
FIGURA 26 TUMOR DE SPITZ ATÍPICO ALK POSITIVO CON INMUNOHISTOQUÍMICA....	108
FIGURA 27 NEVUS DE SPITZ NTRK POSITIVOS CON INMUNOHISTOQUÍMICA.....	112
FIGURA 28 MELANOMA BRAF POSITIVO CON TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	116
FIGURA 29 RESULTADOS CON EL ANTICUERPO BAP-1.....	117
FIGURA 30 NEVUS DE SPITZ CON POSITIVIDAD PARA BAP-1.....	118
FIGURA 31 IMAGEN HISTOLÓGICA DE UN TUMOR MELANOCÍTICO CON PÉRDIDA DE EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE BAP1 Y MUTACIÓN DE BRAF.....	119
FIGURA 32 RELACIÓN DE RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES REALIZADAS CON TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	120
FIGURA 33 TUMORES DE SPITZ CON AMPLIFICACIÓN DE HRAS.....	127
FIGURA 34 TUMORES DE SPITZ CON TRANSLOCACIÓN DE ALK.....	128
FIGURA 35 TUMORES DE SPITZ CON TRANSLOCACIÓN DE NTRK.....	129
FIGURA 36 MELANOMA CON MUTACIÓN V600E DE BRAF, MEDIANTE TÉCNICA DE PCR.....	130
FIGURA 37 RESULTADOS DE TÉCNICAS MOLECULARES Y FISH EN LA TOTALIDAD DE LA MUESTRA.....	131
FIGURA 38 ALGORITMO PREDICTOR DE ALTERACIONES MOLECULARES EN TUMORES MELANOCÍTICOS.....	140

Índice de tablas

TABLA 1 CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y GENOTÍPICAS DE TUMORES DE SPITZ ..	50
TABLA 2 CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTICUERPOS DE INMUNOHISTOQUÍMICA	85
TABLA 3 CARACTERÍSTICAS DE LAS SONDAS DE FISH.....	86
TABLA 4 CARACTERÍSTICAS TÉCNICA DE PCR.....	88
TABLA 5 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA MUESTRA	94
TABLA 6 MEDIA Y RANGO DE EDAD EN CADA GRUPO DIAGNÓSTICO	94
TABLA 7 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS VALORADAS EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS.....	97
TABLA 8 CASOS POSITIVOS CON INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTICUERPO ALK.....	105
TABLA 9 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS CASOS ALK POSITIVOS.....	106
TABLA 10 CASOS POSITIVOS CON INMUNOHISTOQUÍMICA CON EL ANTICUERPO NTRK	109
TABLA 11 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS CASOS NTRK POSITIVOS CON INMUNOHISTOQUÍMICA.	110
TABLA 12 CASOS POSITIVOS CON INMUNOHISTOQUÍMICA CON ANTICUERPO BRAF	113
TABLA 13 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS CASOS BRAF POSITIVOS.	114
TABLA 14 RESUMEN DE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS EN RELACIÓN A LAS MUTACIONES DE LOS TUMORES MELANOCÍTICOS	123
TABLA 15 TABLA RESUMEN DE CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS ASOCIADAS A LA TRANSLOCACIÓN DE ALK CON MODELO MULTIVARIADO.....	124
TABLA 16 TABLA RESUMEN DE CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS ASOCIADAS A LA TRANSLOCACIÓN DE NTRK CON MODELO MULTIVARIADO.....	125
TABLA 17 TABLA RESUMEN DE CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS ASOCIADAS A LA MUTACIÓN DE BRAF CON MODELO MULTIVARIADO.	126
TABLA 18 ASOCIACIÓN DE PROBABILIDADES PRONOSTICADAS Y RESPUESTAS OBSERVADAS EN EL MODELO DE REGRESIÓN LOGÍSTICA.	126
TABLA 19 COMPARACIÓN DE ALK CON INMUNOHISTOQUÍMICA Y FISH EN LOS NEVUS DE SPITZ.	132
TABLA 20 COMPARACIÓN DE ALK CON INMUNOHISTOQUÍMICA Y FISH EN LOS TUMORES DE SPITZ ATÍPICOS.	133
TABLA 21 TOTALIDAD DE RESULTADOS DE TUMORES DE SPITZ PARA DETERMINACIÓN DE ALK	133
TABLA 22 COEFICIENTE KAPPA DE COHEN PARA PRUEBAS PARA DETERMINACIÓN DE ALK.....	134
TABLA 23 COMPARACIÓN DE NTRK CON INMUNOHISTOQUÍMICA Y FISH EN LOS NEVUS DE SPITZ.	134
TABLA 24 COMPARACIÓN DE NTRK CON INMUNOHISTOQUÍMICA Y FISH EN LOS TUMORES DE SPITZ ATÍPICOS.	135
TABLA 25 TOTALIDAD DE RESULTADOS DE TUMORES DE SPITZ PARA DETERMINACIÓN DE NTRK	135
TABLA 26 COEFICIENTE KAPPA DE COHEN PARA PRUEBAS PARA DETERMINACIÓN DE NTRK.....	135
TABLA 27 COMPARACIÓN DE BRAF CON INMUNOHISTOQUÍMICA Y PCR EN LOS NEVUS DE SPITZ.	136
TABLA 28 COMPARACIÓN DE BRAF CON INMUNOHISTOQUÍMICA Y PCR EN LOS TUMORES DE SPITZ ATÍPICOS.	136
TABLA 29 TOTALIDAD DE RESULTADOS DE TUMORES DE SPITZ PARA DETERMINACIÓN DE BRAF.....	137
TABLA 30 COEFICIENTE KAPPA DE COHEN PARA PRUEBAS PARA DETERMINACIÓN DE BRAF.....	137

ABREVIATURAS

AJCC: American Joint Committee on Cancer

ALK: Anaplastic Lymphoma Kinase (kinasa del linfoma anaplásico)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

BAP1: BRCA1-Associated Protein-1 (proteína asociada a BRCA)

CGH: Comparative Genomic Hybridization (hibridación genómica comparada)

ES: Error estándar

EORTC: Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer

FDA: Food and Drug Administration (Administración de alimentos y drogas)

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization (hibridación fluorescente in situ)

HE: Hematoxilina-Eosina

IHQ: Inmunohistoquímica

M: Melanoma

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases (proteínas quinasas activadas por mitógenos)

MELAN-A/MART-1: Antígenos de Melanoma Reconocidos por células T1

MS: Melanoma de Spitz

N: Nevus

NGS: Next-Generation Sequencing (secuenciación de siguiente generación)

NS: Nevus de Spitz

NTRK: Neurotrophic Tyrosine Receptor Kinase (receptor tirosin quinasa neurotrófico)

OR: Odds Ratio

PCR: Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de polimerasa)

REF: Referencia

RET: REarranged during Transfection (reorganizado durante la transfección)

ROS-1: C-ROS oncogene 1 (oncogen c-ros1)

RT-PCR: Real-Time Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de polimerasa en tiempo real)

RR: Riesgo Relativo.

TILs: Tumoral inflammatory infiltrate (infiltrado inflamatorio intratumoral)

TSA: Tumor de Spitz Atípico

UV: Ultravioleta

RESUMEN

Los tumores de Spitz son neoplasias melanocíticas frecuentes en personas jóvenes. Dada la gran diversidad genética de dichos tumores se han descrito subgrupos en base a sus alteraciones genéticas únicas, que en algunos casos pueden constituir dianas terapéuticas.

Objetivos

Determinar la prevalencia y validar la expresión de alteraciones genéticas en las neoplasias melanocíticas de Spitz, usando técnicas de inmunohistoquímica, FISH y PCR; así como identificar las características histológicas de dichas alteraciones moleculares y comparar los resultados con nevus y melanomas convencionales. Por último proponer un algoritmo que permita predecir alteraciones moleculares en base a las características clínicas e histológicas.

Material y métodos

Se reúnen 160 casos, de los cuales 115 provienen de pacientes con tumores de Spitz, correspondientes a 71 casos de nevus de Spitz, 26 tumores de Spitz atípicos y 18 melanomas de Spitz. Además se reúnen 45 muestras de tumores de tipo no Spitz, correspondientes a 21 nevus y 24 melanomas convencionales.

Se revisan los datos clínicos y se realizan técnicas para detectar alteraciones moleculares de los tumores de Spitz (HRAS, BAP1, ROS1, ALK, NTRK, BRAF, MET y RET) para compararlos con nevus y melanomas convencionales. Se realiza inmunohistoquímica y se compara con técnica de FISH y PCR. Luego se identifican los hallazgos histológicos en cada caso.

Para el análisis se realiza test exacto de Fisher, luego regresión logística univariado y posteriormente se realiza un modelo ajustado multivariado. Se considera estadísticamente significativos cuando la $p < 0,05$.

Resultados

Los tumores de Spitz son frecuentes en pacientes de sexo femenino, jóvenes y están localizadas predominantemente en miembros superiores e inferiores.

La alteración de la vía tirosin-quinasa más frecuente detectada es la mutación de BRAF (25%), seguida del reordenamiento de ALK (8%), NTRK (7%), mutación de BAP-1/BRAF (4%) y por último HRAS (1,8%). No se identifican casos con fusiones de ROS1, MET y RET.

La mutación de BRAF se asocia en primer lugar con el diagnóstico de nevus convencional ($p < 0,0001$), seguido de melanoma de Spitz ($p = 0,0004$), melanoma convencional ($p = 0,0336$) y tumor de Spitz atípico ($p = 0,0985$); así como la morfología citológica de tipo epitelioide ($p = 0,0177$).

El reordenamiento de ALK se asocia con el diagnóstico de tumor de Spitz atípico ($p = 0,0313$) y la ausencia de componente epidérmico ($p = 0,0031$).

La fusión de NTRK se asocia con el diagnóstico de tumor de Spitz atípico ($p = 0,0072$), citología de tipo mixto ($p = 0,0073$), o fusiforme ($p = 0,8831$) y la presencia de inflamación ($p = 0,0307$).

Los resultados obtenidos en las determinaciones de los reordenamientos de ALK y NTRK, se observan de forma exclusiva en los nevus de Spitz y tumores de Spitz atípicos.

Los resultados con las técnicas de inmunohistoquímica tienen una buena concordancia con los resultados con FISH y PCR (ALK: Kappa 0,8654; NTRK: Kappa: 0,8995 y BRAF: Kappa: 0,8471)

El algoritmo propuesto es una herramienta útil en la práctica diaria, para predecir alteraciones moleculares usando características clínico-histológicas.

Conclusiones

Los tumores de Spitz son lesiones melanocíticas que deben diagnosticarse y clasificarse correctamente ya que son frecuentes en personas jóvenes. Albergan diversas alteraciones moleculares, diferentes a las que se identifican de forma frecuente en los nevus y melanomas convencionales.

La alteración de la vía tirosin-quinasa más frecuente detectada es la mutación de BRAF, seguida del reordenamiento de ALK y NTRK. Algunas determinaciones se asociaron con características histológicas específicas que han permitido realizar un algoritmo que intenta reunir los hallazgos clínicos y microscópicos más determinantes para poder clasificar mejor a las lesiones melanocíticas de acuerdo a sus alteraciones moleculares.

Las determinaciones de alteraciones de la vía tirosin quinasa con las técnicas de inmunohistoquímica tienen una buena concordancia con los resultados con FISH y PCR, por tanto podría ser considerada una técnica válida para ser usada en práctica diaria.

La importancia de nuestro estudio es validar la existencia de reordenamientos, mutaciones y amplificaciones de oncogenes implicados en la vía tirosin quinasa que son potenciales dianas terapéuticas, especialmente en melanomas de Spitz y en tumores de Spitz atípicos.

Spitz tumors are melanocytic neoplasms frequently observed in young people. Studies indicate Spitz tumors are genetically diverse. Different subgroups of Spitz tumors have been described based on their different genetic alterations, considered therapeutic targets.

Objectives

Determine the prevalence and expression of genetic alterations in Spitz melanocytic neoplasms, using immunohistochemical technique, FISH and PCR; as well as identifying the histological characteristics in each molecular alteration to compare the results with nevi and melanomas and finally create an algorithm that predict molecular alterations based on histological characteristics.

Material and methods

A total of 160 cases were collected, selecting 115 samples from patients with Spitz tumors, corresponding to 71 cases of Spitz nevus, 26 cases of atypical Spitz tumors and 18 Spitz melanomas. In addition, 45 samples of non-Spitz type tumors were collected, corresponding to 21 cases of nevus and 24 cases of melanomas.

Clinical data and techniques were performed to detect molecular alterations of Spitz tumors (HRAS, BAP1, ROS1, ALK, NTRK, BRAF, MET and RET) and compared them with nevi and melanomas. Immunohistochemistry was compared with FISH and PCR technique. The histological findings were identified in each case.

Differences in the expression of molecular markers between two groups were performed with Fisher's test, logistic regression with univariate analysis and subsequently a multivariate adjusted model is performed and was considered statistically significant when $p < 0.05$. The data and graphics analyzes were performed using the STATA software.

Results

Spitz tumors are frequent in female patients, young and predominantly located in upper and lower limbs.

The most frequent tyrosine kinase pathway detected is the BRAF mutation (25%), followed by ALK rearrangement (8%), NTRK (7%), BAP-1 / BRAF mutation (4%) and by last HRAS (1.8%). No cases were identified with fusions of ROS1, MET and RET.

The BRAF mutation is first associated with the diagnosis of conventional nevus ($p < 0.0001$), followed by Spitz melanoma ($p = 0.0004$), conventional melanoma ($p = 0.0336$) and atypical Spitz tumor ($p = 0.0985$); as well as cytological morphology of epithelioid type ($p = 0.0177$).

ALK rearrangement is associated with the diagnosis of atypical Spitz tumor ($p = 0.0313$) and the absence of an epidermal component ($p = 0.0031$).

NTRK fusion is associated with the diagnosis of atypical Spitz tumor ($p = 0.0072$), mixed type cytology ($p = 0.0073$), or fusiform ($p = 0.8831$) and the presence of inflammation ($p = 0.0307$).

The results obtained in the determinations of the rearrangements of ALK and NTRK, were observed exclusively in Spitz nevus and atypical Spitz tumors.

The results with immunohistochemical techniques are in good agreement with the results with FISH and PCR (ALK: Kappa 0.8654; NTRK: Kappa: 0.8995 and BRAF: Kappa: 0.8471)

The proposed algorithm is a useful tool in daily practice, to predict molecular alterations using clinical-histological features.

Conclusions

Spitz tumors are melanocytic lesions that must be correctly diagnosed and classified as they are frequent in young people. They house various molecular alterations, different from those that are frequently identified in conventional nevus and melanoma.

The most frequent tyrosine kinase pathway detected is the BRAF mutation, followed by the rearrangement of ALK and NTRK. Some determinations were associated with specific histological characteristics that have allowed us to perform an algorithm that attempts to gather the most determining clinical and microscopic findings in order to better classify melanocytic lesions according to their molecular alterations.

The determinations of alterations of the tyrosine kinase pathway with immunohistochemical techniques have a good agreement with the results with FISH and PCR, therefore it could be considered a valid technique to be used in daily practice.

The importance of our study is to validate the existence of rearrangements, mutations and amplifications of oncogenes involved in the tyrosine kinase pathway that are potential therapeutic targets, especially in Spitz melanomas and in atypical Spitz tumors.

INTRODUCCIÓN

Características de la piel

La piel representa aproximadamente el 15% del peso total del cuerpo, y es el órgano más extenso. Está constituido por tres capas: epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo, que poseen estructuras y funciones específicas, que varían según la localización anatómica (1).

1.1 Epidermis

Se origina del ectodermo y está constituida por un epitelio escamoso estratificado queratinizado. La mayoría de las células epidérmicas son queratinocitos (90-95%), el resto, melanocitos, células de Langerhans y de Merkel (2).

Los queratinocitos son responsables del proceso de queratinización, que junto a los desmosomas, hemidesmosomas y la membrana basal proporcionan la integridad estructural de la epidermis (3); las células de Langerhans son células presentadoras de antígenos y los melanocitos son células que derivan de la cresta neural; se localizan fundamentalmente en la capa basal de la epidermis y folículos pilosos (4). Los melanocitos producen y secretan melanina, cuya función más importante servir de protección contra los efectos perjudiciales de la radiación ultravioleta no ionizante. El número de melanocitos en la piel normal es constante en todas las razas, con una relación de un melanocito por cada 4 a 10 queratinocitos basales (5).

El número de melanocitos disminuye con la edad, y como consecuencia, la transferencia de melanina a los queratinocitos también disminuye, por lo que la piel se vuelve de color más claro y la incidencia de cáncer de piel aumenta.

La diferenciación celular melanocítica puede identificarse mediante la expresión de ciertos antígenos que pueden detectarse mediante técnicas de inmunohistoquímica, dichos marcadores son:

- S-100: es un marcador muy sensible pero no específico de células melanocíticas.
- MELAN-A/MART-1: es un marcador de diferenciación melanocítica, que se expresa en melanocitos normales, en nevus, nevus de Spitz, y en melanomas.
- HMB-45: no se expresa en los melanocitos adultos, sino en melanocitos embrionarios, melanocitos del bulbo piloso y melanocitos activados (4). Por lo general lo expresan la mayoría de las células del melanoma, nevus de Spitz, en el componente de la unión de los nevus y nevus displásicos.

1.2. Dermis y tejido celular subcutáneo

Se originan del mesodermo, proporciona soporte mecánico, rigidez y grosor a la piel. La dermis está compuesta por fibras colágenas y elásticas; consta de dos zonas, la dermis papilar y la dermis reticular. La dermis adventicial combina la dermis papilar y la dermis perianexial. Está involucrada en la regulación térmica, posee nervios autonómicos y sensitivos que son responsables del tacto, presión, vibración y dolor, así como de la secreción de sudor y piloerección (1)

Cada uno de los elementos que conforman la piel puede dar origen a una proliferación neoplásica. En este estudio se incluyen tumores de origen melanocítico que son nevus y melanomas convencionales, así como nevus de Spitz, tumores de Spitz atípicos y melanomas de Spitz. Se realizará una breve revisión de las características clínicas e histológicas.

Tumores melanocíticos benignos: nevus

Los nevus melanocíticos son proliferaciones benignas de los melanocitos. Se pueden clasificar de múltiples formas. Según su aparición (nevus congénitos y nevus adquiridos), de acuerdo a su distribución histológica (nevus melanocíticos de la unión, intradérmicos o compuestos) y según características especiales (nevus de Spitz, nevus de Reed, nevus azul, entre otros)

2.1. Nevus melanocíticos adquiridos

Los nevos melanocíticos adquiridos son lesiones muy frecuentes, simétricas, de bordes definidos, de pequeño tamaño, planas o elevadas, de color marrón o incluso similar a la piel circundante (6).

2.1.1 Epidemiología

Los nevos melanocíticos, suelen aparecer a partir de los 6-12 meses y van aumentando en número y tamaño hasta alrededor de los 25 años, posteriormente su incidencia va disminuyendo. Suelen presentarse en mayor número en pacientes de raza blanca (7).

2.1.2 Características clínicas

Los nevos suelen ser pequeños (de 1 mm a 1 cm), redondos y planos. Su color varía desde marrón claro a negro. Al dermatoscopio muestran un patrón reticular predominante (8).

La probabilidad de transformación maligna de los nevos melanocíticos adquiridos es muy baja, varía desde 0,0005% para los hombres y las mujeres menores de 40 años a 0,003%. Este riesgo estimado no justifica la extirpación sistemática de los nevos adquiridos (9).

2.1.3 Características histológicas

Los nevos melanocíticos pueden ser de la unión, intradérmicos y compuestos. Están constituidos por una proliferación de melanocitos que forman nidos (tecas), con una distribución simétrica. Si las tecas solo se encuentran en la interfase dermo-epidérmica, sobre todo en las crestas epidérmicas se denominan nevos de la unión, si además están presentes en la dermis, se llaman nevos compuestos y si solo están presentes en la dermis, se conocen como nevos intradérmicos. Los nevos compuestos e intradérmicos muestran maduración de los melanocitos en profundidad (10).

2.2 Nevus de Spitz

En 1948, Sophie Spitz (10) describió las características histológicas de un grupo de nevus en la infancia, que denominó “melanoma juvenil”. En 1953 Allen y Spitz (11) describieron los criterios patológicos microscópicos distintivos de estas lesiones y sus diferencias con el melanoma. Sin embargo hoy se sabe que el nevus de Spitz no es un precursor de melanoma sino la entidad clínica e histológica que más simula un melanoma.

2.2.1 Epidemiología

La incidencia de nevus de Spitz es de 1,4 a 1,66 por cada 100.000 personas. Aunque es más frecuente en niños y adultos jóvenes, pueden afectar a cualquier grupo de edad (10). Se han utilizado diferentes nombres para denominar al nevus de Spitz: melanoma juvenil, nevus de células fusiformes y epitelioides, lesión Spitzoide, tumor Spitzoide, melanocitoma Spitzoide y neoplasia Spitzoide. El término definitivo de “nevus” connota un comportamiento benigno (12).

2.2.2 Características clínicas

Clínicamente, suelen ser lesiones bien delimitadas, de color rojizo-marrón, de pequeño tamaño y consistencia blanda, suelen encontrarse con mayor frecuencia en cara y extremidades (13). Clínicamente, se pueden confundir con lesiones no melanocíticas como angiomas, granulomas piogénicos, fibromas o tumores anexiales. En la dermatoscopia presentan patrones bien definidos como el “globular”, constituido por pequeños glóbulos de color marrón a negro regularmente distribuidos en la periferia, que cuando se fusionan con el cuerpo central de la lesión pueden formar proyecciones radiales conocidas como patrón “estelar”.

2.2.3 Características histológicas

En los nevus de Spitz se identifican frecuentemente las siguientes características histológicas (figura 1):

- Simetría
- Células de morfología fusiforme o epitelioides (citoplasma amplio, núcleos monomorfos con cromatina abierta y nucléolos uniformes).

- Hendiduras que separan a las células melanocíticas.
- Cuerpos de Kamino: estructuras acelulares globulares, eosinófilas, formadas a partir de la membrana basal y que se encuentran a menudo dentro de la epidermis o sobre las papilas dérmicas.
- Maduración de melanocitos en profundidad: los melanocitos se vuelven más pequeños conforme están más profundos en la dermis.
- No suelen tener mitosis.
- Puede haber extensión pagetoide pero siempre suprabasal y limitado al centro de la lesión.
- Puede acompañarse de hiperplasia epidérmica, hipergranulosis, e hiperqueratosis.

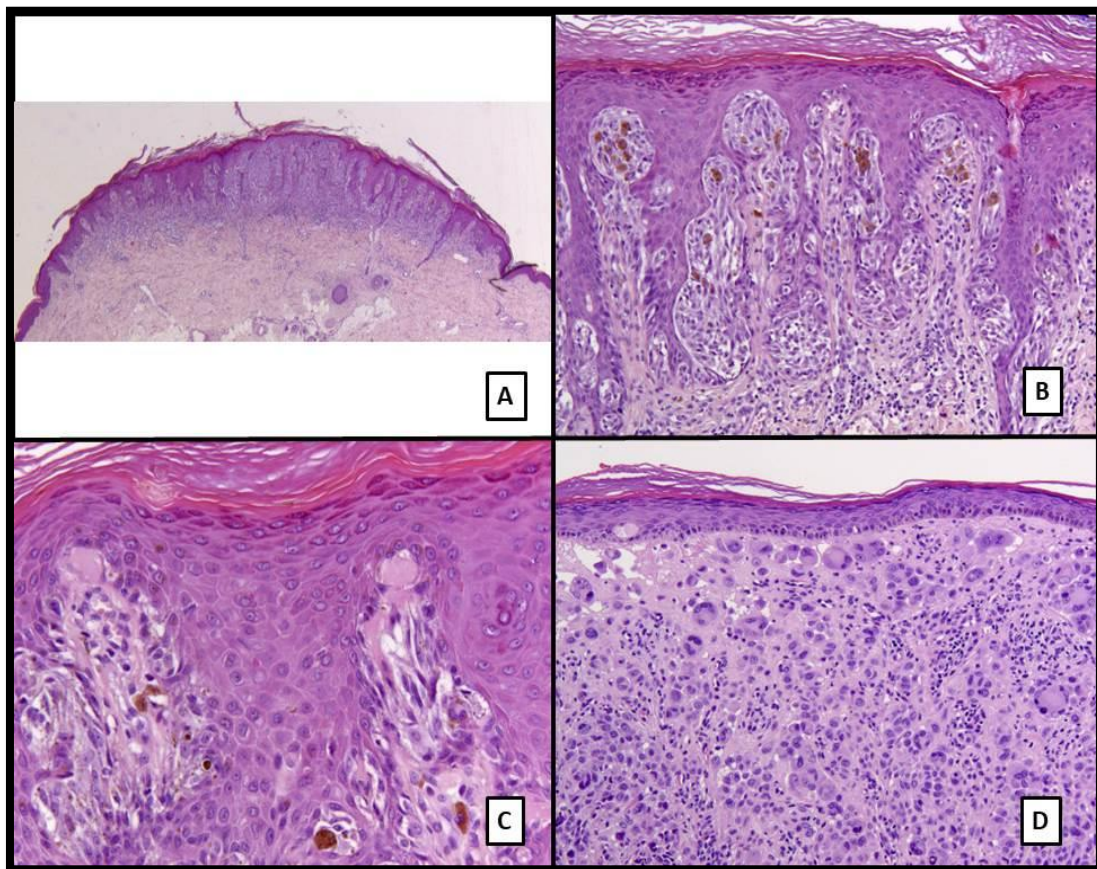


Figura 1: Nevus de Spitz, hallazgos histológicos

A: Imagen histológica panorámica de un nevus de Spitz, en el que se observa que la distribución es simétrica (HE, X50). B: A mayor aumento se identifican células de morfología fusiforme, que se agrupan en nidos y muestran cierta contracción del citoplasma, lo que resulta en la formación de pequeños espacios

como hendiduras (HE, X50). C: En las puntas de 2 papilas, se ven pequeños cuerpos eosinófilos de Kamino. Estos agregados de matriz de membrana basal son comunes en los nevus de Spitz y mucho más raros en los melanomas (HE, X100). D: Nevus de Spitz con células de morfología epitelioides (HE, X100) (16).

Una variante del nevus de Spitz es el nevus de células fusiformes pigmentadas, descrito por Reed, con prominente pigmentación citoplasmática, compuesto por células delgadas y una disposición fascicular a lo largo de la zona de la unión o en la dermis papilar.

3. Tumores melanocíticos atípicos

3.1 Tumor de Spitz atípico

En 1989, Smith y colaboradores describen un nevus de Spitz con rasgos atípicos con posible capacidad metastásica, es decir, un tipo de nevus con características Spitzoides pero sin datos histológicos de malignidad suficientes para clasificarlo como melanoma aunque con capacidad de metastatizar a ganglios linfáticos (17). Este diagnóstico aparentemente contradictorio fue designado por Barnhill como tumor de Spitz metastatizante o nevus/tumor de Spitz atípico (18).

Ackerman y colaboradores mantienen que hay sólo dos categorías diagnósticas (nevus y melanoma), otros sugieren que las lesiones de Spitz son de hecho un espectro morfológico que va desde la benignidad hasta la malignidad (19), y que por tanto se deberían considerar como lesiones intermedias cuando no es posible definir con precisión si cumple criterios de melanoma o de nevus de Spitz (18).

3.1.1 Epidemiología

La incidencia global de los nevus Spitz se estima que representa menos del 1% de todos los nevus melanocíticos, con un riesgo de aparición de tumor de Spitz a lo largo de la vida de 7 en 100.000 (20). Debido a que los criterios para la designación de tumor de Spitz atípico varían, la incidencia de tumores de Spitz atípicos no está formalmente descrita.

3.1.2 Características Clínicas

Los tumores de Spitz atípicos se presentan clínicamente como lesiones sobre elevadas, nodulares, de color rojizo, que pueden medir más de 1 cm de diámetro (21). Ludgate y colaboradores han descrito las características de los tumores de Spitz atípicos en 67 pacientes en la Universidad de Michigan. Ellos observaron que eran más frecuentemente no pigmentados (51%), con una edad media al diagnóstico de 24 años, el 61% eran mujeres, el 30% de los tumores estaban localizados en extremidades inferiores, y el 28% se localizaban en la cabeza y cuello (22).

La relación entre los hallazgos dermatoscópicos e histopatológicos no es absoluto, ya que las lesiones que al dermatoscopio se ven atípicas no necesariamente lo son al microscopio, situación que ocurre en un 27% de los casos (23). Sin embargo, cuando una lesión de Spitz es histopatológicamente atípica pero de clasificación incierta, la presencia de características dermatoscópicas y clínicas de atipia significativa permiten clasificarla como un tumor de Spitz atípico. Así, la clave de la clasificación exacta de nevus de Spitz, tumor de Spitz atípico, y melanoma de Spitz sigue siendo una evaluación microscópica cuidadosa junto con una correlación clínico-patológica.

3.1.3 Características histológicas.

El diagnóstico histopatológico de los tumores de Spitz no es fácil, un tumor de Spitz atípico puede no demostrar todas las características histológicas atípicas, sin embargo, debe demostrar suficientes alteraciones para que la lesión no sea considerada un nevus de Spitz ni un melanoma.

En la práctica, los tumores de Spitz atípicos muestran algunas características de nevus de Spitz pero con características histológicas como (21):

- Tamaño: a menudo son lesiones de más de 10 mm de diámetro
- Asimetría
- Ulceración
- Atipia citológica
- Maduración incompleta o ausente de los melanocitos

- Aumento de mitosis dérmicas profundas o marginales

Las características histológicas atípicas clasifican a los tumores de Spitz atípicos como tumores melanocíticos con potencial biológico incierto.

Las diferencias entre los distintos tipos de neoplasias Spitzoides se basa en las características histológicas comentadas anteriormente, ya que las técnicas inmunohistoquímicas no han demostrado diferencias significativas salvo el índice de proliferación (ki67), que aumenta en las zonas profundas de los melanomas de Spitz (24), así como la pérdida completa de expresión de p16 que también puede ocurrir en melanomas de Spitz (25).

4. Lesiones melanocíticas malignas

4.1 Melanoma

El melanoma es un tumor maligno derivado de melanocitos que afecta predominantemente a la piel, pero también puede desarrollarse en mucosas, ojos, leptomeninges y el tracto gastrointestinal.

4.1.1 Epidemiología

Aproximadamente 200.000 pacientes son diagnosticados de melanoma cutáneo al año en todo el mundo, y 46.000 mueren por la enfermedad (26). La incidencia de melanoma ha aumentado constantemente durante los últimos 50 años en la mayoría de las poblaciones de piel clara (27).

Existen diversos factores de riesgo para el desarrollo de melanoma, algunos de ellos son (28):

- Piel clara, pelo rojo o rubio, ojos claros.
- Quemaduras solares en la infancia.
- Exposición intensa e intermitente a la luz UV.
- Gran número de nevus melanocíticos.
- Nevus melanocíticos congénitos o de gran tamaño.
- Antecedentes familiares de melanoma.
- Alteración en la reparación del ADN como sucede en enfermedades como xeroderma pigmentoso

4.1.2. Características clínicas

Al examen físico se sospecha que una lesión pigmentada puede corresponder a un melanoma, cuando aumenta de tamaño, es asimétrica, tiene bordes irregulares, adopta diferentes tonalidades de coloración, o superficie irregular, sin embargo siempre debe ser confirmado mediante estudio histopatológico.

4.1.3 Características histológicas

Los melanomas presentan las siguientes características histológicas:

- Proliferación de melanocitos de forma asimétrica
- Extensión pagetoide de los melanocitos.
- Extensión lateral de melanocitos individuales
- Atipia citológica
- Ulceración
- Ausencia de maduración en profundidad.
- Mitosis profundas
- Consumición de la epidermis
- Se puede asociar a infiltrado inflamatorio crónico en banda en la dermis.

Los melanomas se han clasificado tradicionalmente en: melanoma de extensión superficial, melanoma nodular, lentigo maligno melanoma y melanoma acral (29).

Los factores pronósticos más importantes del melanoma son:

- Espesor Breslow: se define como el espesor del tumor en milímetros, medido perpendicularmente a la epidermis desde la parte superior de la capa granulosa hasta la última célula tumoral invasiva (30). Se considera el factor pronóstico histológico más importante.
- Nivel de Clark: es un sistema que permite describir el nivel de profundidad al que se encuentran las células neoplásicas. El nivel I corresponde cuando las células neoplásicas alcanzan solamente la epidermis, el nivel II cuando infiltran la dermis papilar, el nivel III cuando llegan a la unión de la dermis

papilar y reticular, el nivel IV cuando infiltran la dermis reticular y por último el nivel V cuando infiltran el tejido celular subcutáneo.

- Ulceración
- Índice mitótico
- Satelitosis: se definen como depósitos de tumor separados del melanoma principal por tejido dérmico normal, no cicatricial (31).
- Metástasis ganglionar
- Invasión vascular

4.2. Melanoma de Spitz

Los melanomas de Spitz son lesiones melanocíticas malignas que comparten características morfológicas con los nevus de Spitz. Los melanomas de Spitz aparecen en la edad adulta aunque hay casos reportados en la infancia y la adolescencia (32).

4.2.1 Epidemiología

Los melanomas de Spitz son más comunes en adultos que en niños, pero debido a la baja incidencia de otros subtipos de melanoma cutáneo en niños, la incidencia de melanomas de Spitz es relativamente alta en niños (33).

Los melanomas de Spitz pueden ocurrir en cualquier grupo étnico y en cualquier ubicación del cuerpo, especialmente en la cara o miembros inferiores. En personas menores de 17 años ha habido 1,3% de casos en Estados Unidos en las últimas dos décadas (34). Solo el 0,4% de los melanomas son diagnosticados en la primera década de la vida (35).

4.2.2 Características clínicas

No hay características clínicas distintivas que sugieran que se pueda tratar de un melanoma de Spitz. Las lesiones se caracterizan por ser nodulares y usualmente amelanóticas. Suelen llegar hasta tamaños mayores de 1 cm y pueden estar ulcerados. Son más frecuentes en cabeza y extremidades (33).

La experiencia clínico-patológica basada en un número limitado de casos, refleja que el melanoma de Spitz suele ser clínicamente indistinguible al dermoscopio del melanoma convencional. El patrón dermatoscópico constituye

una distribución asimétrica de rayas, pseudópodos y glóbulos (36). Un melanoma de Spitz puede surgir sobre un nevus de Spitz (37). En un 13,3% de las lesiones que al dermatoscopio sugieren un nevus de Spitz, en pacientes mayores de 12 años, son melanomas (38).

4.2.3 Características microscópicas

Los melanomas de Spitz se caracterizan por:

- Tamaño variable, pueden ser grandes.
- Morfología celular fusiforme o epiteliode.
- Pleomorfismo nuclear y alteración de la relación núcleo-citoplasma.
- Asimetría y presencia de "hombro" (extensión epidérmica).
- Falta de maduración de melanocitos (melanocitos de gran tamaño en dermis profunda).
- Extensión pagetoide.
- Mitosis en la dermis profunda y mitosis atípicas.
- Presencia de cuerpos de Kamino.
- Pueden tener infiltrado inflamatorio en banda intratumoral.
- Se pueden asociar a hiperplasia epidérmica.

Una vez descritas las características clínico-patológicas de las lesiones melanocíticas a estudiar, se describirán brevemente las vías moleculares implicadas en la patogénesis de los tumores melanocíticos, destacando las alteraciones encontradas en los tumores de Spitz.

Vía de MAPK

La vía molecular más importante en la patogénesis del melanoma es la vía de las MAP-quinasas (“Mitogen-Activated Protein Kinases”- proteínas quinasas activadas por mitógenos). Existen una gran variedad de señales extracelulares, como las citosinas y factores de crecimiento, que pueden activar una serie de MAP-quinasas que, en último término, regulan la expresión génica y diversos procesos celulares como la supervivencia, proliferación y la diferenciación celular en condiciones fisiológicas y patológicas. La señalización de la vía MAPK, de forma simplificada, se propaga de la siguiente forma: Ras → Raf → MEK → ERK (39) (Figura 2).

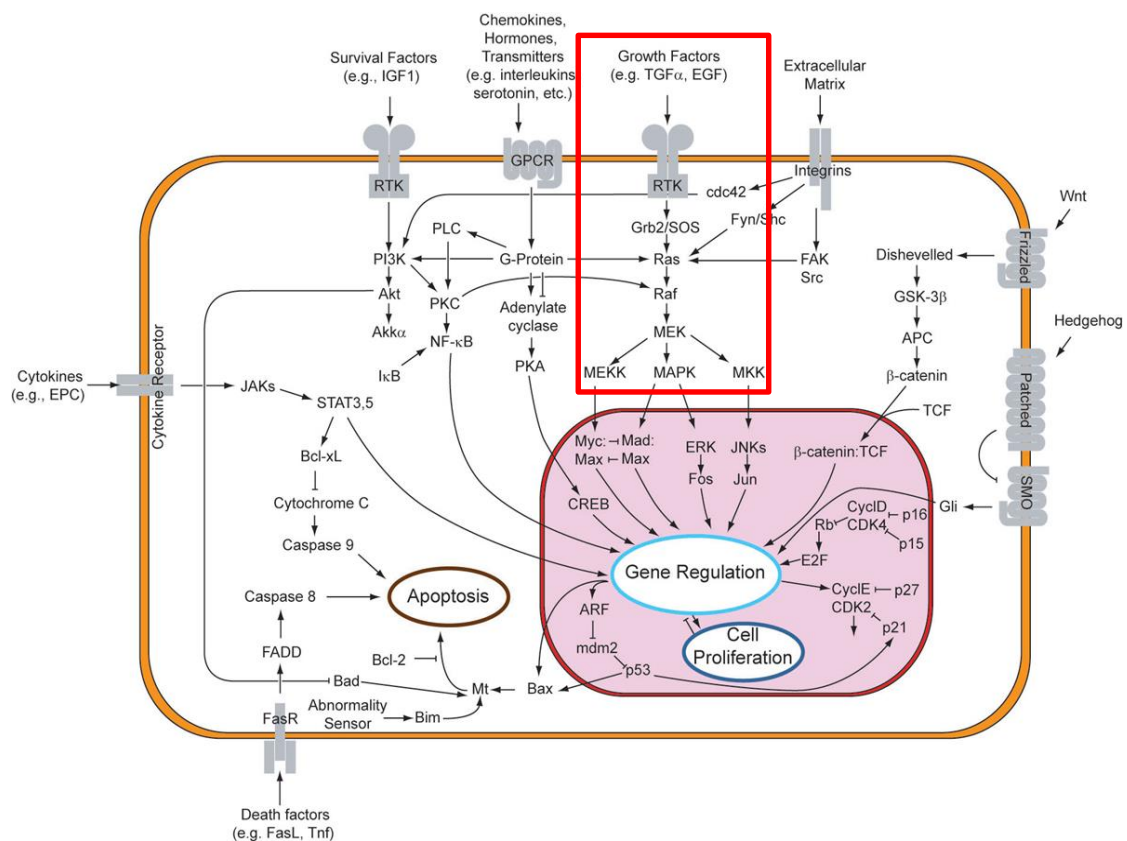


Figura 2 Esquema de la vía MAPK.

La activación de la vía MAPK constituye una vía importante en el desarrollo de lesiones melanocíticas ya que por medio de la estimulación de un receptor

tirosin quinasa, se activa RAS y posteriormente se activa una cascada de señalización intracelular que genera la activación de la MAP quinasa: ERK, que es una quinasa serin-treonina que es capaz de traslocarse en el núcleo para regular la transcripción modificando la actividad de proteínas, como algunos factores de transcripción, modulando así la expresión de distintos genes (40).

Los diferentes subtipos de tumores melanocíticos benignos y malignos muestran a menudo mutaciones en ciertos genes implicados en la vía MAPK usualmente asociados a otros eventos genéticos y epigenéticos. En el melanoma se encuentran mutaciones de BRAF (50-70%) y NRAS (15-30%) que son las más frecuentes en piel intermitentemente expuesta al sol, pero sin daño solar crónico, seguidas de KRAS en un 2% y HRAS en un 1%, (41,42). GNAQ(9p21) y GNA11 (19p13) que son mutaciones frecuentes en el melanoma uveal y KIT (4q12) que es la mutación más frecuente en el melanoma acral y de mucosas (43,44). La activación constitutiva de la vía MAPK regula procesos claves como la proliferación celular, invasión vascular, angiogénesis y la supervivencia celular (45).

Los nevos melanocíticos adquiridos también albergan mutación de BRAF en el 60- 88% (46,47) y NRAS en el 20% de los casos. En los nevos congénitos hasta un 80% tienen mutación de NRAS (47) y en los nevos de Spitz, se identifica mutación y amplificación de HRAS en el 11,8-16% de los casos (47,48).

Especialmente, en los tumores de Spitz, varios estudios indican que estos tumores son genéticamente más diversos de lo que se pensaba anteriormente, es por ello que centraremos nuestro estudio en este tipo de tumores.

Clasificación de los tumores de Spitz en base a sus alteraciones genéticas

Actualmente se han agrupado a los tumores melanocíticos de Spitz en tres grandes grupos de acuerdo a sus alteraciones genéticas distintas, aunque cada día se suman nuevos hallazgos moleculares que podrían añadir tumores de Spitz en otras categorías, por tanto los grupos a considerar constituyen los más frecuentes.

El primero de ellos es el grupo de los tumores de Spitz con mutación/amplificación de HRAS (13). El segundo grupo es el de lesiones de Spitz con mutación de BAP1 (14, 15), y el tercer grupo consiste en tumores de Spitz con fusión de genes de la vía tirosin quinasa (16). Los dos primeros grupos tienen un fenotipo típico que puede ser reconocido en la evaluación histológica, ver tabla 1. También se han descrito recientemente mutaciones en el promotor de TERT (49), delección homocigota de 9p21 (25,50) y pérdidas aisladas de 6q23 (51,52).

Tabla 1 Características fenotípicas y genotípicas de tumores de Spitz

Características fenotípicas y genotípicas de tumores Spitz (40)

	HRAS	BAP-1	Fusión de kinasas
Fenotipo	Lesión centrada en la dermis, con desmoplasia y células fusiformes.	Lesión centrada en dermis, polipoide, células epitelioides con componente de nevus convencional en la periferia y con linfocitos intratumorales	Hay tumores de Spitz con translocación de ALK que son polipoides con células fusiformes. En el resto de fusiones no hay fenotipos característicos identificados.

Genotipo	Mutación o amplificación HRAS	Mutación de BAP-1 frecuentemente asociado a mutación de BRAFV600E.	Fusión de ROS-1 (17%), NTRK (16%), ALK (10%), BRAF (5%), RET (3%) MET (<1%)
Importancia en el diagnóstico	Buen pronóstico.	Puede corresponder a una mutación germinal. El comportamiento biológico no está claro.	En caso de tumores malignos pueden ser dianas terapéuticas (ALK, ROS, RET), con inhibidores de kinasa como crizotinib, carbozantinib y vandetanib.

HRAS

La alteración genética más frecuente encontrada en los nevus de Spitz involucra el gen HRAS, en un 16% de los casos, siendo la primera alteración que se describió. El gen HRAS pertenece a la familia de los genes RAS (53). Se ha identificado mutación y ganancia en el número de copias del gen presente en el cromosoma 11p15.5. Las mutaciones oncogénicas de HRAS involucran los codones 12 o 13 (exón 1) y el codón 61 (exón 2). Bastian y colaboradores en 1999 observaron que un 67% de los nevus de Spitz tenían ganancias en 11p asociadas a mutaciones activadoras en HRAS, comparado con el 5% de las lesiones que tenían mutación de HRAS sin ganancias en 11p (54).

A nivel histológico, la mayoría de los tumores de Spitz con amplificación de HRAS están constituidos por una proliferación de células neoplásicas que en su mayoría están centradas en la dermis, las células suelen tener una morfología fusiforme, asociadas a una marcada desmoplasia del estroma y pueden observarse asiladas mitosis (Figura 3) (13, 17). Es importante diferenciar este grupo de lesiones ya que tienen un comportamiento benigno (10, 17, 18).

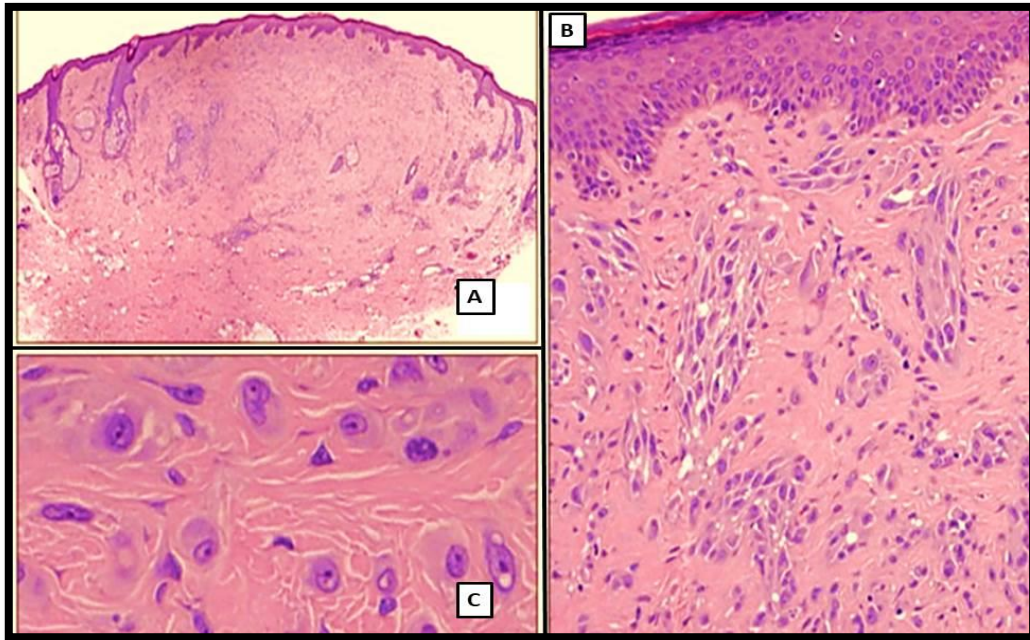


Figura 3 Nevus de Spitz con mutación de HRAS

A: Nevus de Spitz intradérmico con escasa celularidad, B células individuales y en conglomerados de morfología epitelioides y fusiforme, entremezcladas con haces de colágeno C: células neoplásicas epitelioides con cromatina vesicular y nucléolos prominentes (55)

Clínicamente la presencia de mutación/amplificación de HRAS en tumores de Spitz está asociada a un buen pronóstico. A nivel histológico los tumores de Spitz con alteraciones en HRAS pueden tener rasgos que se confundan con un melanoma. Debido a la baja prevalencia de alteraciones de HRAS en melanomas se piensa que un nevus de Spitz con mutaciones de HRAS tiene poca probabilidad de progresar a melanoma (56).

BAP1

El segundo grupo lo constituyen los tumores de Spitz que presentan mutaciones en BAP-1, también conocidos como BAPomas. La “BRCA1-Associated Protein-1 (BAP1) es una enzima nuclear desubiquitinizante, que desempeña un papel importante en el genoma humano, ya que es una proteasa que tiene como función la regulación del ciclo celular, la diferenciación celular,

muerte celular y la respuesta al daño del ADN, por tanto tiene un efecto en la supresión del crecimiento celular tumoral (57)(58).

El efecto principal de la progresión tumoral por la presencia de BAP1 mutado, se debe a la función supresora de tumores cuando BAP1 está intacto. BAP1 recluta los sitios de daño en el ADN y promueve la reparación de estas lesiones para que queden libres de errores. La alteración de BAP1 puede, por lo tanto, conducir a la inestabilidad genómica, aumentando el riesgo de tumorigénesis (59,60).

Los tumores melanocíticos con mutaciones de BAP-1 fueron descritos por primera vez por Wiesner y colaboradores, al estudiar 2 familias, una presente en Australia y otra en Alemania conformando un total de 16 personas con presencia de tumores melanocíticos atípicos y melanoma uveal (14). A los miembros de la familia afectados se les encontró que tenían una mutación en la línea germinal de BAP-1, así como también mutación de BRAF (15, 20). Este tipo de tumores, a nivel histológico, tienen forma polipoide, las células neoplásicas están centradas en la dermis; están constituidos por células grandes epitelioides, que pueden tener un componente de nevus convencional en el margen de la lesión y se ha descrito que hasta un tercio de los casos tiene abundante infiltración linfocitaria intratumoral (figura 4) (61).

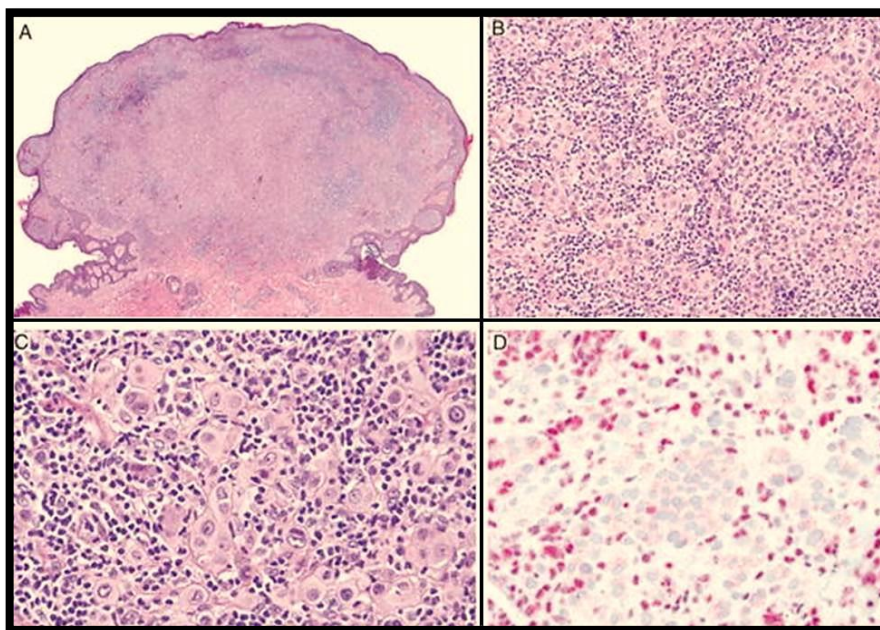


Figura 4 Tumor melanocítico con mutación de BAP-1

A: Tumor melanocítico polipoide, con células neoplásicas en la dermis B: A mayor aumento se identifican que las células tumorales son epitelioides con numerosos linfocitos intratumorales C: Las células tumorales contienen abundante citoplasma anfófilico con bordes citoplasmáticos bien definidos y núcleos vesiculares pleomorfos, redondos-ovalados con nucléolo prominente D: Con técnicas de inmunohistoquímica las células epitelioides neoplásicas no expresan BAP1, mientras que los linfocitos son positivos (61)

La mutación de BAP1 asociada al desarrollo de tumores de Spitz esporádicos (no asociados a mutaciones en la línea germinal), se ha descrito en el 11-28% de los tumores de Spitz atípicos, estos tumores también se asocian a la mutación de BRAFV600E. Las mutaciones esporádicas de BAP1 muestran características histológicas idénticas a las observadas en los casos familiares (61,62).

Yeh y colaboradores en una serie de 29 casos de tumores de Spitz atípicos, identificaron que 10 de ellos tenían pérdida de BAP-1. Realizaron seguimiento y ningún paciente mostró recurrencia ni ganglios linfáticos positivos. La morfología de las lesiones estudiadas era de tipo Spitzoide con infiltrado linfocitario intratumoral en la mitad de los casos y en el 31% se identificó nevus convencional en la periferia de las neoplasias (21).

La razón más importante para reconocer a los BAPomas es que pueden estar asociados a mutaciones en la línea germinal y por tanto existe un riesgo incrementado a desarrollar melanoma tanto cutáneo como uveal, múltiples BAPomas y posibilidad de afectación familiar (63).

El análisis de BAP-1 muchas veces no resulta algo sencillo, debido a que la mutación puede estar presente en cualquiera de los 17 exones del gen, además si el tumor es pequeño o si tiene abundante infiltrado inflamatorio dificulta su detección.

Un tercer grupo de tumores de Spitz muestran fusiones de genes implicados en la vía de la tirosin quinasa. Wiesner y colaboradores han descrito alteraciones en ROS1, NTRK1, ALK, BRAF, RET y MET en un 17%, 16%, 10%, 5%, 3% y menos del 1% respectivamente. Estas alteraciones se encontraron en el 55% de los nevus de Spitz, en el 56% de los tumores de Spitz atípicos y en el 39% de los melanomas de Spitz. Actualmente estas alteraciones no se emplean para diferenciar las lesiones benignas de las malignas (64).

ROS1

El gen ROS1 fue inicialmente descubierto como un proto-oncogen (65). ROS1 es un receptor tirosin-quinasa, cuya función se desconoce pero se cree que puede tener un papel importante en la diferenciación de células epiteliales (66). La caracterización de ROS1 ha sido difícil debido a que aún se desconoce el ligando necesario para su activación (67).

Cuando ROS1 se activa de manera constitutiva genera la activación de una cascada de vías celulares que están implicadas en el crecimiento y proliferación celular, pudiendo estar implicadas varias vías de señalización como PLCγ, PI3K/AKT, STAT3, VAV3 y MAPK/ERK (68,69). Algunas de las fusiones encontradas son FIG-ROS1, SLC34A2, CD74, TPM3, SDC4, EZR, LRIG3, KDELR2, YWHAE, TFG, CEP85L y CCDC6-ROS1, sin embargo la lista cada día crece (70).

Las fusiones de ROS1 son encontradas en más de un 17% de tumores de Spitz. Generalmente ocurren en pacientes menores de 60 años, con tumores localizados en las extremidades. Son lesiones en forma de “domo”, constituidas por una proliferación de células neoplásicas de morfología fusiforme o epitelioides, con núcleo vesicular y atipia variable, que puede estar asociado a hiperplasia epidérmica irregular con ocasionales cuerpos de Kamino (71), sin embargo estas características histológicas no son específicas.

Los pacientes con un tumor maligno con fusión de ROS1 pueden ser candidatos a tratamiento con Crizotinib que es una pequeña molécula inhibidora “multi-quinasa” desarrollada inicialmente como un inhibidor de MET y actualmente está aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) en los pacientes con carcinoma de pulmón con fusión de ALK, pero que también podría usarse en el caso de alteraciones de ROS1 (72).

NTRK

La familia de receptores conocidas como TRK son codificados por los genes NTRK (Neurotrophic Tropomyosin Receptor Kinase). Los receptores TRK, son 3 y pertenecen a los de tipo tirosin-quinasa, los cuales participan en la proliferación de células melanocíticas a través de la activación mediante neurotrofinas (73). La unión de TRK a su ligando, causa la activación de la vía Ras/MAPK, el cual aumenta el crecimiento y proliferación celular, sin embargo puede activarse la vía de PLC γ y PI3K (73).

El gen NTRKA está localizado en el cromosoma 1 (74), el gen NTRKB está en el cromosoma 9 (75) y el gen NTRKC está localizado en el cromosoma 15 (76). La fusión del gen NTRK representa la primera alteración molecular conocida con potencial oncogénico, en todos los casos ocurre la fusión de la región 3' del gen NTRK con una secuencia 5' de una pareja de fusión ya sea por reordenamientos intracromosómicos o intercromosómicos que genera una activación constitutiva de TRK (77).

Los reordenamientos de NTRK en los tumores de Spitz ocurre alrededor del 16% de los casos, siendo más frecuente en los NS y TSA; y son vistos en pacientes cuya edad es muy variable entre los 2 y 73 años, es decir que no solo se observa en la población joven (71). Están descritas las parejas de fusión LMNA-NTRK1 y TP53-NTRK1 (71)

Los tumores de Spitz que muestran fusión de NTRK, además de los hallazgos típicos Spitzoides, no tienen datos histológicos distintivos. Las características morfológicas más frecuentemente encontradas son de tipo exofítico-verucoso (41%), en placa (35%) y asociado a hiperplasia epidérmica (88%). La mitad de los casos tienen una distribución en forma de cuña con células neoplásicas de morfología epitelioides (78).

La identificación de genes de fusión que involucran NTRK en las neoplasias malignas, tiene mucho interés en el desarrollo de fármacos que puedan bloquear el dominio tirosin-quinasa de TRK y de esta forma inhibir la actividad tumoral. Entrectinib es un inhibidor de TRK disponible actualmente vía oral, mientras que existen otros inhibidores como LOXO-101 es un inhibidor "pan-TRK", así como Altiratinib (DCC-2701) y Sitravatinib (MGCD516) que se encuentran en fase I de ensayos clínicos (79,80).

ALK

En 1994 fue descubierto el gen Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) como parte de la translocación t(2,5) encontrada en los pacientes con linfoma de células grandes anaplásico que resultaba de una fusión entre NPM (nucleophosmin) y ALK (81).

El gen ALK está localizado en el cromosoma 2p23, es una proteína del receptor tirosin quinasa que es capaz de causar diversos tipos de tumores mediante diferentes mecanismos moleculares. El mecanismo más frecuente para la activación de ALK es el reordenamiento genómico que involucra el locus del gen ALK con varios genes que conforman oncogenes que codifican a una oncoproteína de fusión. Otra vía en la activación del ALK es por mutaciones puntuales (57).

En los tumores de Spitz solo se ha descrito la vía de reordenamiento de ALK, que se ha encontrado alrededor del 10% de los casos, siendo usualmente las parejas de fusión los genes TPM-3 y DCTN-1 (82).

Las neoplasias que tienen fusión de ALK, a nivel histológico, suelen ser polipoides con la lesión centrada en la dermis, con un patrón de crecimiento plexiforme y células fusiformes, generalmente con escaso pigmento (figura 5).

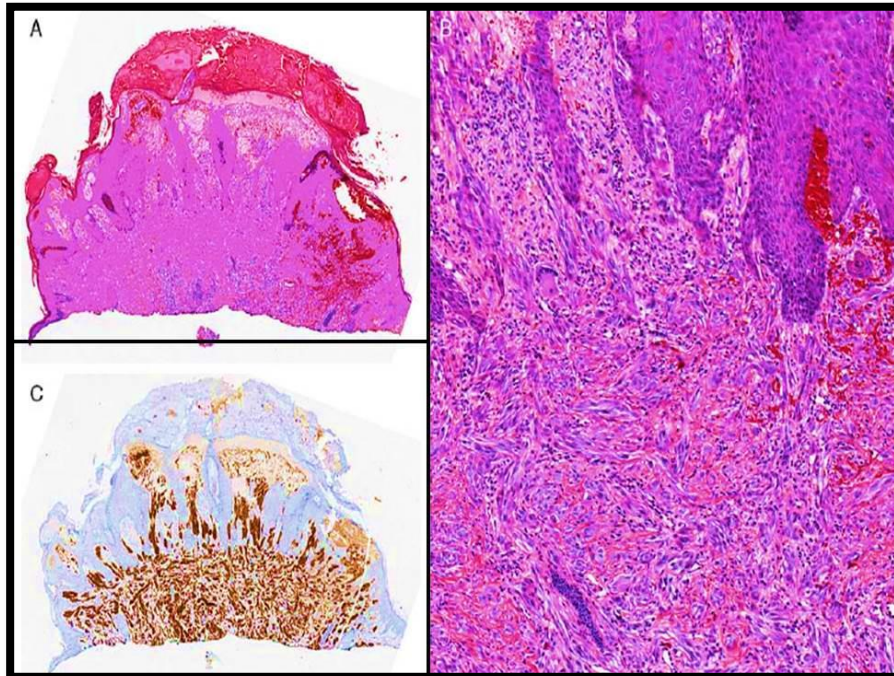


Figura 5 Tumor de Spitz ALK positivo con inmunohistoquímica

A: Piel con tumor de Spitz asociado a hiperplasia epidérmica y ulceración focal. B: NS constituido por células fusiformes C: Las células son positivas con técnica de inmunohistoquímica para ALK (83).

Busam y colaboradores estudiaron la expresión de ALK en 17 tumores de Spitz de los cuales 5 correspondían a nevus de Spitz y 12 a tumores de Spitz atípicos. Todos los casos mostraron expresión de ALK con inmunohistoquímica así como con FISH. Actualmente no hay conclusiones definitivas sobre el pronóstico de lesiones ALK positivas (83).

BRAF

Las mutaciones de BRAF en los tumores de Spitz es un hecho muy poco frecuente, excepto en los tumores con pérdida de BAP1, sin embargo se han descrito recientemente translocaciones de BRAF (71,78,84).

En algunos estudios se han identificado translocaciones de BRAF en tumores de Spitz incluidos los NS, TSA y MS (71,78,84). La mayoría de estos tumores se identificaron en extremidades, cabeza, cuello y tronco. En el estudio histológico mostraron una distribución en placa, nodular o verrucosa, asociada a hiperplasia epidérmica y escasos cuerpos de Kamino. Se han identificado dos patrones morfológicos predominantes:

- a) Patrón de crecimiento en forma “difusa o esclerosante”, con células de mediano tamaño de morfología epitelioides, con atipia citológica intensa y sin depósito de melanina.
- b) Patrón de crecimiento en “placa”, con displasia arquitectural y atipia celular moderada (78).

Se ha identificado reordenamiento de BRAF en un 17% de tumores de Spitz (78). El uso de inmunohistoquímica para detectar reordenamientos de BRAF, no es del todo adecuado, ya que la proteína de BRAF se expresa endógenamente en los melanocitos y puede interpretarse como un falso positivo.

RET

La identificación del oncogen RET (REarranged during Transfection) fue realizada por Masahide Takahashi y Geoffrey Cooper en 1985 (85). RET tiene una estructura similar a otros receptores de tipo tirosin-quinasa compartiendo algunas funciones. La activación de RET se produce por estimulación ya sea por una proteína quinasa activada o por una señal extracelular que promueven el crecimiento, proliferación, supervivencia y diferenciación celular (86).

Los reordenamientos de RET en las neoplasias de Spitz se observa en menos del 5% de los casos y generalmente involucran las parejas de fusión KIF5B y GOLGA5 (71). Existen pocos datos que puedan correlacionar hallazgos clínicos e histopatológicos en los tumores de Spitz con fusiones de RET ya que son poco frecuentes. En trabajos realizados con ratones, los tumores melanocíticos que mostraban sobreexpresión de RET podían ser nevus o melanomas (87). Algunos melanocitos que expresan fusión de RET muestran activación de la vía MAPK-ERK, así como PI3K/AKT/mTOR (71).

Inhibidores de RET como Vandetanib y Cabozantinib ambos usados en otras neoplasias con fusiones de RET, pueden suprimir la actividad oncogénica de ésta vía (71).

MET

El receptor de tirosin kinasa MET se expresa usualmente en células de origen epitelial (88). Fue identificado en 1984 como un proto-oncogen (89). El gen que codifica a MET está localizado en el cromosoma 7 (90). La regulación de MET puede alterarse mediante activación constitutiva del dominio tirosin quinasa, amplificación del gen, activación paracrina o autocrina, mutación o mecanismos epigenéticos (factores de crecimiento secretados por un tumor, hipoxia, o acción de otros oncogenes) (91).

En algunas neoplasias la alteración de MET se considera como un factor de mal pronóstico ya que los pacientes suelen ser más propensos a desarrollar metástasis y tener una menor supervivencia (92).

Yeh y colaboradores identificaron la presencia de alteración de MET en el 0.5% de 1202 tumores melanocíticos. Detectaron alteración del número de copias en MET o en la porción distal del brazo largo del cromosoma 7, empleando CGH. Todos los casos con alteración de la vía tirosin quinasa de

MET mostraron características histopatológicas de tumores de Spitz. Se detectó que este hallazgo ocurría precozmente durante la progresión de las lesiones melanocíticas (140).

Actualmente se están desarrollando fármacos que tienen como diana MET que actúan a diversos niveles de ésta vía como en la expresión de RNA o de proteínas, así como en la interacción ligando-receptor (93,94).

A continuación se resume las alteraciones moleculares en las lesiones melanocíticas (95):

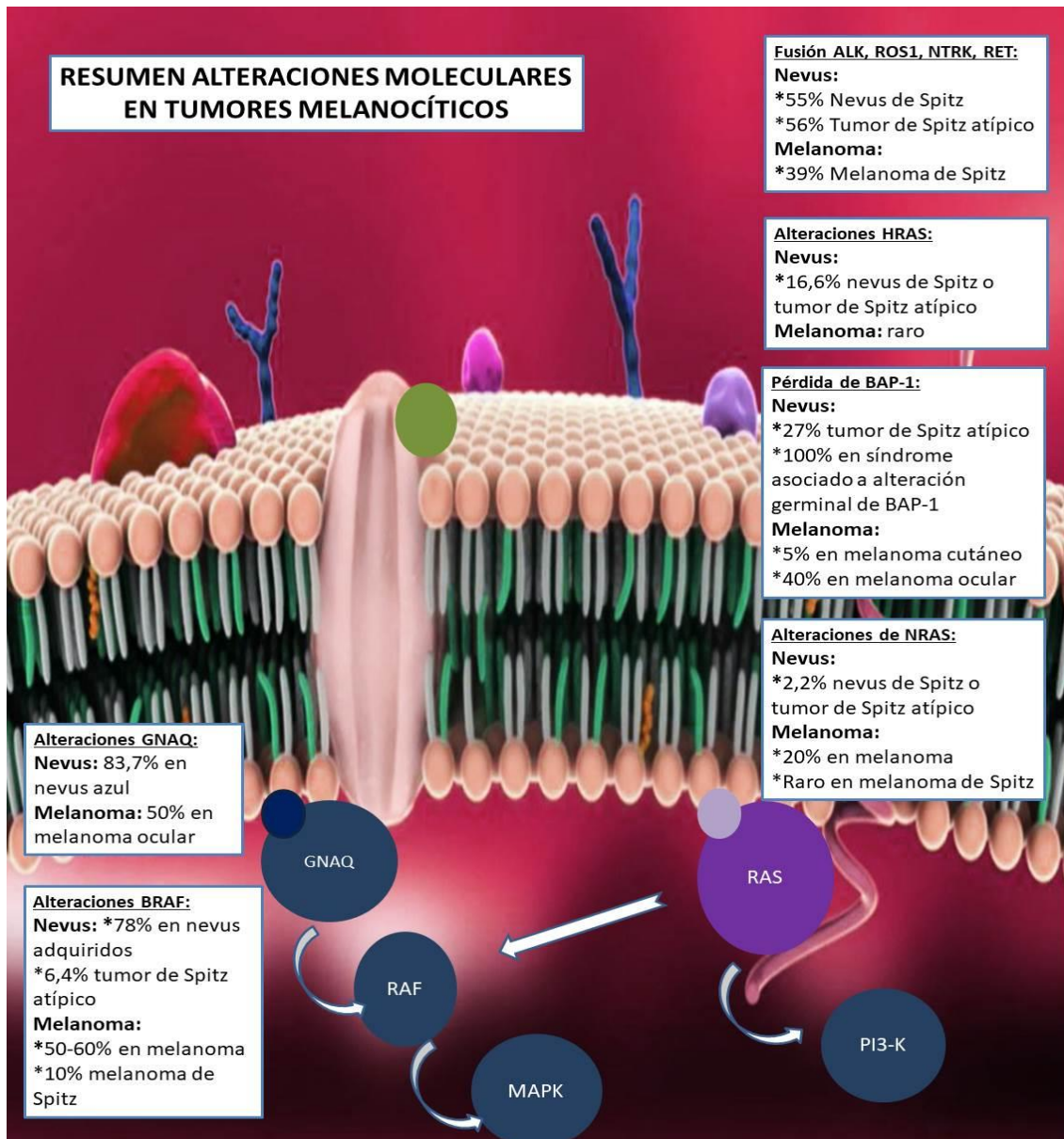


Figura 6 Resumen de las alteraciones moleculares más frecuentes en las lesiones melanocíticas

En definitiva, los tumores de Spitz constituyen un grupo de tumores melanocíticos heterogéneo, que muestran características clínicas y moleculares distintas a los nevos y melanomas convencionales. La caracterización molecular del melanoma es la que mejor se ha estudiado identificándose algunas vías comunes con los nevos. Los tumores de Spitz se han vinculado con alteraciones oncogénicas que incluyen HRAS, BAP1 y las fusiones de quinasas. Sin contar HRAS, el resto de las alteraciones moleculares en los nevos se han descrito en el desarrollo y progresión a melanoma. La pérdida del equilibrio entre neoplasia benigna y maligna se cree que se debe a que los melanomas escapan de los mecanismos de senescencia, pero aún es un área en investigación.

Los estudios moleculares de lesiones melanocíticas de Spitz aún están en desarrollo, ya que no hay una determinación única que nos permita predecir con total certeza si se trata de una lesión benigna o maligna, ya que dada su baja frecuencia han sido difíciles de tipificar.

Destacamos la importancia en determinar el papel oncogénico de las vías moleculares en los tumores de Spitz ya que son neoplasias frecuentes en pacientes jóvenes cuya contraparte maligna puede tener muy mal pronóstico.

Las vías moleculares en los tumores de Spitz malignos pueden ser candidatos a tratamiento con dianas terapéuticas para mejorar la supervivencia libre de progresión de enfermedad.

Es necesario además, identificar las alteraciones moleculares en los tumores de Spitz de una manera práctica, que pueda ser reproducible en los laboratorios y que pueda estar al alcance de todos en la práctica clínica diaria.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. Justificación, Hipótesis y objetivos

1. Justificación

La valoración microscópica de los tumores melanocíticos generalmente permite el diagnóstico diferencial entre nevus y melanomas convencionales, sin embargo existe un amplio grupo de tumores melanocíticos que resultan ambiguos histológicamente y de potencial maligno incierto. Los tumores de Spitz son el prototipo de este grupo de neoplasias ambiguas y representan un grupo heterogéneo de tumores que están constituidas por células de gran tamaño de morfología epitelioides o fusiformes.

Los tumores de Spitz suponen un espectro donde se incluyen los nevus de Spitz, los tumores de Spitz atípicos, que tienen un comportamiento maligno incierto, y los melanomas de Spitz. Las bases genéticas de estas lesiones son poco conocidas y las alteraciones genéticas del melanoma convencional están ausentes en estas neoplasias.

Vías de activación en los tumores de Spitz.

Del 1% al 2% de las lesiones melanocíticas extirpadas en pacientes jóvenes, corresponden a tumores de Spitz (19). El tumor de Spitz más frecuente es el nevus de Spitz, que es una neoplasia benigna que puede tener un crecimiento rápido. Los nevus de Spitz no son lesiones precursoras de melanoma, pero clínicamente y muchas veces histológicamente constituyen grandes simuladores, incluso anteriormente eran considerados como “melanomas juveniles” (15).

Los nevus de Spitz además de tener un aspecto clínico característico, tienen alteraciones moleculares también distintivas. Los nevus y melanomas adquiridos convencionales generalmente tienen mutaciones de BRAF o NRAS, mientras que los tumores de Spitz muestran mutaciones y/o amplificaciones de HRAS, inactivación de BAP-1 (a menudo combinado con mutaciones de BRAF)

o reordenamientos que implican la vía tirosin-quinasa como ALK, ROS-1, NTRK, BRAF, MET y RET.

El aumento en el número de copias del cromosoma 11p, el cual contiene el locus HRAS, ha sido descrito en un grupo considerable de nevus de Spitz, estimándose por varios autores entre el 11% y 20% de los casos. Las mutaciones de HRAS ocurren casi exclusivamente en tumores de Spitz ya que se han encontrado en menos del 1% de los melanomas convencionales (133).

Recientemente varios estudios han identificado que en los tumores de Spitz ocurren mutaciones de BAP-1 (62,96). Weisner describió esta alteración de la línea germinal de BAP-1 en varias familias, pero posteriormente se demostró su presencia en tumores de Spitz atípicos sin alteración de la vía germinal (97,98).

Más recientemente se han identificado (2014) otro subgrupo de tumores de Spitz que muestran activación de la vía de la tirosin-quinasa por medio de proteínas de fusión que generan proteínas quiméricas que se activan de manera constitutiva dando lugar a la estimulación de señales oncogénicas. Dichas quinasas de fusión identificadas son: ROS1 (17%), NTRK1 (16%), ALK (10%), BRAF (5%), MET (3%), RET (<1%) (97,98). Estando presentes según los primeros estudios alrededor del 40% de los melanomas de Spitz, 56% en los tumores de Spitz atípicos y 55% en los nevus de Spitz, por lo que están en una alta proporción de casos (64,98). Sin embargo, la determinación de estas alteraciones no es útil para la diferenciación entre tumores de Spitz malignos y benignos.

[Técnicas actualmente utilizadas para la detección de alteraciones genéticas en los tumores melanocíticos.](#)

El método diagnóstico considerado el “Gold Standard” en las neoplasias melanocíticas sigue siendo la valoración microscópica con técnica de hematoxilina y eosina. El examen histológico puede determinar la presencia de

atipia citológica, número de mitosis, presencia de extensión pagetoide, ulceración, necrosis y asimetría. Sin embargo, en múltiples ocasiones dicha evaluación microscópica es insuficiente, cuando el tumor no cumple criterios claros de benignidad o malignidad, es allí donde se requiere el uso de técnicas complementarias.

Las técnicas actualmente utilizadas para la detección de alteraciones moleculares son PCR, hibridación genómica comparada, FISH y NGS (99).

La técnica de PCR permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN en específico, partiendo de un fragmento original para detectar alteraciones en la región estudiada. En esta técnica se debe evitar contaminaciones con ADN de otras muestras o reactivos y se debe conocer con seguridad la región exacta del ADN a estudiar, por lo que requiere de personal adecuado para su realización.

La técnica de hibridación genómica comparada identifica alteraciones en el número de copias del ADN, comparando el ADN tumoral con un ADN de referencia. En las lesiones melanocíticas malignas se identifican múltiples aberraciones genómicas con presencia de ganancias y pérdidas de fragmentos aleatorios de cromosomas. Es una técnica de la cual se obtienen buenos resultados del material fijado en parafina pero que puede mostrar falsos negativos si la muestra del tumor a estudiar posee un bajo porcentaje de células tumorales, que conlleva a una extracción de ADN insuficiente, por abundante infiltrado inflamatorio intratumoral o porque las células tumorales se encuentran entremezcladas con abundantes células del estroma (100).

La técnica de FISH utiliza sondas marcadas con fluorescencia que hibridan con un locus específico del ADN de la muestra a estudiar. Esta técnica tiene como inconveniente que solo detecta alteraciones específicas dentro de un cromosoma, no detecta mutaciones, reordenamientos o alteraciones en regiones muy pequeñas del cromosoma y se han descrito falsos negativos en melanomas estimándose en un 15% de los casos (96). La exactitud de los resultados del

FISH depende en gran medida del observador que valore la muestra debido a su experiencia y a la interpretación adecuada de las áreas tumorales (101,102).

La técnica de secuenciación masiva como Next Generation Sequencing (NGS) permite valorar el genoma completo, exomas o una secuencia de genes determinada, pudiendo detectar mutaciones puntuales, deleciones, inserciones y reordenamientos (103), siendo una técnica que supera las limitaciones de la CGH y el FISH. Sin embargo para realizar NGS se requiere de una infraestructura adecuada, personal cualificado, así como un sistema de bioinformática pertinente para el análisis de datos.

Todas las técnicas anteriormente descritas son pruebas de alto coste, que requieren tiempo y personal adecuado para su realización e interpretación. Existen técnicas de más fácil acceso y manejo como lo son las técnicas de inmunohistoquímica. Actualmente existen anticuerpos que nos permiten corroborar la naturaleza melanocítica de un tumor (S100, HMB-45, Melan-A) y anticuerpos como el Ki67 que se usan para valorar el índice proliferativo de las células neoplásicas.

Se han desarrollado anticuerpos como el VE1, que detecta la proteína BRAF mutada en células neoplásicas donde el ácido glutámico está presente en el codón 600 en lugar de la valina (V600E). Es un anticuerpo muy sensible pero que solo reconoce la mutación más prevalente (104).

También está disponible el anticuerpo BAP-1. Cuando hay una pérdida homocigota en BAP-1, el anticuerpo se interpreta como la pérdida de tinción nuclear de dicha proteína (105).

Los anticuerpos desarrollados para la detección de alteraciones de las proteínas de fusión de la vía MAPK, están disponibles: el anticuerpo monoclonal ALK, el cual tiene una alta sensibilidad y especificidad (83), así como el anticuerpo NTRK pero en algunas ocasiones las células pueden expresar una tinción débil debido a la expresión de NTRK endógeno (71). En cuanto a HRAS,

ROS-1, MET y RET la sensibilidad es baja y la expresión inmunohistoquímica es difícil de detectar (106).

Comportamiento biológico de los tumores de Spitz.

Los nevos de Spitz son lesiones melanocíticas benignas que no tienen potencial metastásico y que usualmente no recidivan una vez que se ha realizado la extirpación quirúrgica (107).

El pronóstico de los melanomas de Spitz es difícil de determinar, debido a que en los trabajos actuales se incluyen grupos de pacientes muy heterogéneos siendo difícil para comparar parámetros. Algunos autores piensan que en pacientes mayores de 60 años, el pronóstico es similar al melanoma convencional. Cuando se diagnostica un melanoma de Spitz en pacientes jóvenes, éstos tienen un potencial maligno bajo y por tanto poca capacidad metastásica, ya que es un hallazgo muy poco frecuente el encontrar metástasis cuando se realiza un ganglio centinela (108).

Los tumores de Spitz atípicos tienen un comportamiento biológico incierto, sin embargo pueden en algunas ocasiones comportarse como una neoplasia maligna. Varios estudios han demostrado que dichos tumores pueden metastatizar en ganglios linfáticos centinela, pero en el seguimiento los pacientes en su mayoría no muestran recidiva (109,110). Lallas y cols hicieron una revisión de 541 pacientes con tumores de Spitz atípicos, y observaron que menos del 1% de los casos presentaba recurrencia local y sólo el 1% de los pacientes desarrolló metástasis a ganglios linfáticos regionales y posteriormente fallecieron (111).

En muchas ocasiones es difícil realizar el seguimiento de los tumores de Spitz para determinar el comportamiento de este tipo de lesiones ya que al tener criterios diagnósticos poco claros, en ocasiones se interpretan como melanomas de Spitz y a veces como tumores de Spitz atípicos, debido a esto, se recomienda la extirpación completa del tumor y de esta manera se evitan la recidiva y la

posibilidad de metástasis. Todos los pacientes deben valorarse de manera individual para ajustar el tratamiento más adecuado.

Existen dos largas series que realizan el seguimiento de una cohorte de pacientes con tumores de Spitz con alteración de BAP-1 y ninguno mostró recurrencia ni ganglios linfáticos centinela afectados. Las lesiones que muestran alteración de BAP-1 parecen tener bajo riesgo de desarrollar melanoma, aunque inicialmente se pensó lo contrario (59).

Algunas series de pacientes con tumores de Spitz con fusión de ALK, incluso con metástasis a ganglios linfáticos, demuestran que los pacientes tienen buen pronóstico y siguen vivos durante el tiempo de seguimiento. Sin embargo la experiencia en este grupo de pacientes es limitada, así como la de pacientes con otras alteraciones de la vía tirosin-quinasa (112).

Identificación de biomarcadores como posibles dianas terapéuticas.

La relevancia en el diagnóstico de los tumores de Spitz con diferentes alteraciones moleculares se debe a que actualmente están desarrollándose fármacos específicos que permiten inhibir diversos puntos de la vía de la tirosin quinasa, como crizotinib, cabozantinib, ceritinib, alectinib y vandetanib (113,114), que tienen como función bloquear la señalización oncogénica de las proteínas de fusión, que son vías que promueven el desarrollo y proliferación de las células neoplásicas. Algunos de estos fármacos han sido probados en otros tipos de tumores que tienen alteración de la misma vía MAPK como los glioblastomas, carcinoma de pulmón y carcinoma colorectal, observándose buenos resultados.

El patólogo tiene un papel muy importante en la identificación correcta de los tumores de Spitz, sobre todo en los de comportamiento maligno y en las lesiones metastásicas, ya que se podría identificar biomarcadores (ALK, ROS1, NTRK, MET, RET) que constituyan dianas terapéuticas que permitan mejorar la supervivencia a largo plazo, ya que aún es poco conocido.

2. Hipótesis

Las alteraciones moleculares de los tumores de Spitz son poco conocidas y su identificación podría servir como posibles dianas terapéuticas. Hasta el momento para su detección se han utilizado diversas técnicas complejas como CGH, NGS y PCR. La sospecha de dichas alteraciones moleculares mediante el estudio morfológico de la neoplasia y su confirmación con inmunohistoquímica sería muy útil en la práctica clínica. Partiendo de éstas premisas planteamos la siguiente hipótesis:

H1: Las alteraciones moleculares de HRAS, BAP1 y proteínas de fusión de la vía de tirosin-quinasa (ALK, NTRK, ROS, MET, RET, BRAF) están presentes principalmente en los tumores de Spitz. Dichas alteraciones pueden predecirse mediante el estudio histológico y detectarse con técnicas de laboratorio habituales.

H0: Las alteraciones moleculares de HRAS, BAP1 y proteínas de fusión de la vía de tirosin-quinasa están igualmente presentes en los tumores de Spitz, así como nevus y melanomas convencionales. Las alteraciones no pueden predecirse mediante el estudio histológico ni detectarse con técnicas de laboratorio habituales.

3. Objetivos

Principal:

Determinar la prevalencia y validar la expresión de alteraciones moleculares (HRAS, BAP-1 y proteínas de fusión de la vía de la tirosin-quinasa) en tumores de Spitz.

Secundarios

- 1) Establecer el porcentaje de tumores de Spitz que presentan alteraciones genéticas (HRAS, BAP-1 y proteínas de fusión de la vía de la tirosin-quinasa).
- 2) Identificar las características histológicas en cada alteración molecular.
- 3) Validar el papel de la inmunohistoquímica en la detección de dichas alteraciones.
- 4) Comparar la expresión del perfil inmunohistoquímico con los hallazgos expresados por FISH o PCR en los tumores de Spitz.
- 5) Identificar las diferencias en las alteraciones moleculares en las neoplasias de Spitz benignas y malignas.
- 6) Determinar diferencias en las alteraciones moleculares de tumores de Spitz con los nevus y melanomas convencionales.
- 7) Proponer un algoritmo que permita predecir alteraciones moleculares en base a las características clínicas e histológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Muestras tisulares: selección de casos.

Se reúnen 160 casos en total, de los cuales 115 muestras provienen de pacientes con tumores de Spitz, correspondientes a 71 casos de nevus de Spitz, 26 casos de tumores de Spitz atípicos y 18 melanomas de Spitz. Además se reúnen 45 muestras de tumores de tipo no Spitz, correspondientes a 21 casos de nevus y 24 casos de melanomas convencionales.

Los casos proceden del Servicio de Anatomía Patológica desde el año 1995 hasta 2017, del Hospital Universitario 12 de Octubre, Hospital Universitario de Salamanca y del Hospital Universitario Ramón y Cajal.

Los pacientes se seleccionaron de forma aleatoria, consultando los archivos del servicio de anatomía patológica y posteriormente se revisaron las historias clínicas de todos los casos para obtener los datos clínicos de interés.

Las muestras proceden de biopsias realizadas a pacientes de los servicios de dermatología, posteriormente fueron fijadas en formol e incluidas en parafina.

La selección de tumores de tipo no Spitz tiene como propósito comparar los resultados obtenidos con los tumores de Spitz.

Todos los casos fueron evaluados por tres patólogos experimentados para confirmar el diagnóstico y los resultados obtenidos.

2. Variables clínicas, histológicas y moleculares

2.1 Variables clínicas

De todos los pacientes se revisan las historias clínicas con el fin de obtener los datos relevantes, se consideraron los siguientes:

- Sexo.
- Edad al momento del diagnóstico.
- Localización de la lesión melanocítica: Extremidades superiores, extremidades inferiores, cabeza y cuello, tórax y abdomen.

2.2 Variables histológicas

Para el estudio histológico de todas las muestras seleccionadas, que previamente se incluyeron en parafina, se tiñeron con hematoxilina y eosina. Posteriormente se evalúan los siguientes datos histológicos:

- Diagnóstico: nevus de Spitz, tumor de Spitz atípico, melanoma de Spitz, nevus convencional y melanoma convencional.
- Morfología citológica: Se valora en primer lugar la morfología celular, tomando en cuenta el tamaño y forma del citoplasma, por lo que se dividieron en grupos, siendo:
 - a) Epitelioide: se consideran en el estudio histológico a las células que muestran un citoplasma amplio y eosinófilo, que a simple vista recuerdan a una célula epitelial y no a una célula de tipo melanocítica. Figura 7.

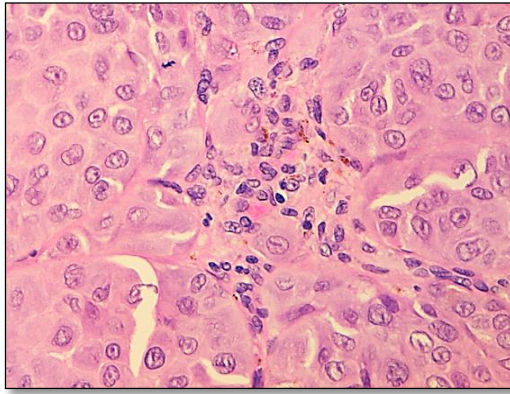


Figura 7 Células de morfología epitelioides

- b) Fusiforme: se considera fusiforme, cuando el citoplasma de las células es amplio pero su morfología es alargado, recordando en este caso a las células mesenquimales. Figura 8.

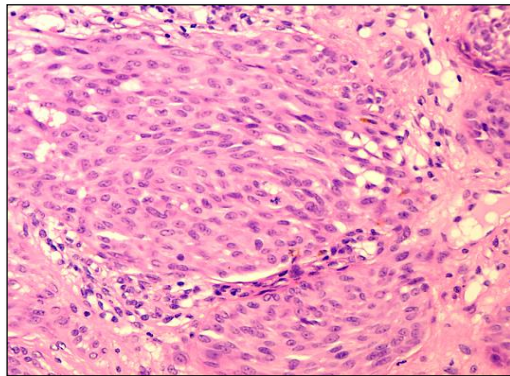


Figura 8 Células de morfología fusiforme

- c) Mixto: se considera un patrón morfológico mixto cuando se observan células neoplásicas que muestran grupos de morfología fusiforme y otros grupos epitelioides, sin ser prominente uno de los dos grupos.

- d) Redondeada: se clasifica en este grupo a las células neoplásicas cuyo citoplasma es escaso o moderado, de una morfología redonda, que histológicamente recuerdan a los melanocíticos. Figura 9.

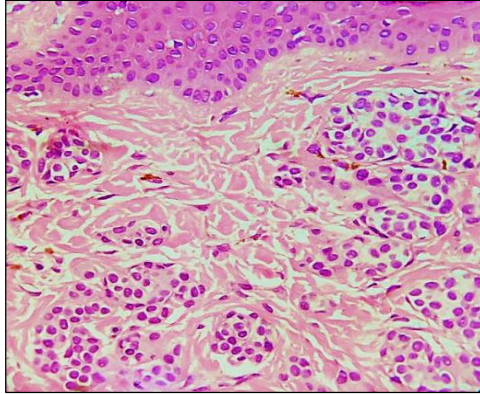


Figura 9 Células de morfología redondeada.

- Morfología polipoide: se considera de morfología polipoide cuando la lesión neoplásica al ser valorada a nivel histológico con poco aumento, muestra un aspecto protuberante-nodular. Figura 10.

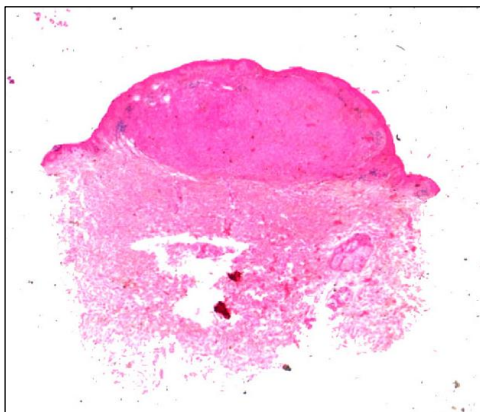


Figura 10 Tumor con morfología polipoide.

- Pigmentación: presencia de pigmento melánico en las células neoplásicas. Figura 11.

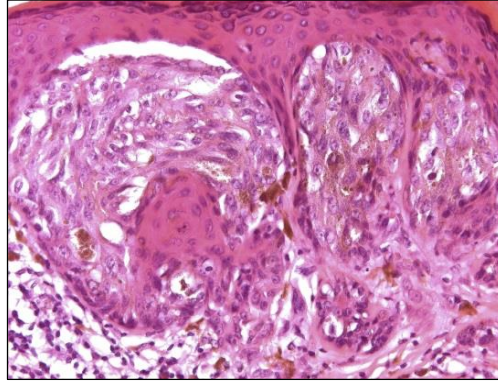


Figura 11 Tumor melanocítico pigmentado.

- Extensión pagetoide: se considera cuando las células neoplásicas imitan la propagación de la enfermedad de Paget, cuando se disponen individualmente o en pequeños grupos dentro de la epidermis hacia la superficie córnea. Figura 12.

-

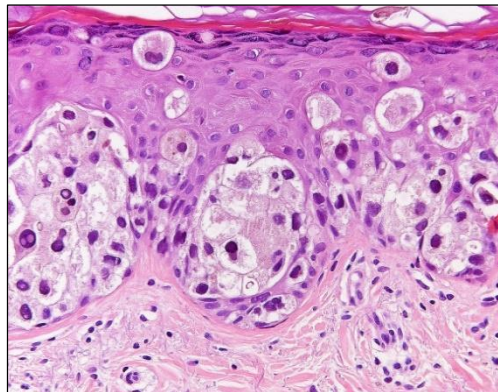


Figura 12 Tumor melanocítico con extensión pagetoide.

- Componente epidérmico: se considera cuando las células melanocíticas neoplásicas están en relación a la epidermis. Figura 13.

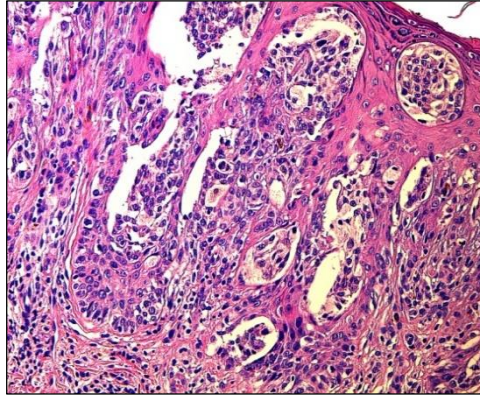


Figura 13 Tumor melanocítico con componente epidérmico.

- Inflamación asociada: se considera cuando se observa infiltrado linfocitario intratumoral. Figura 14.

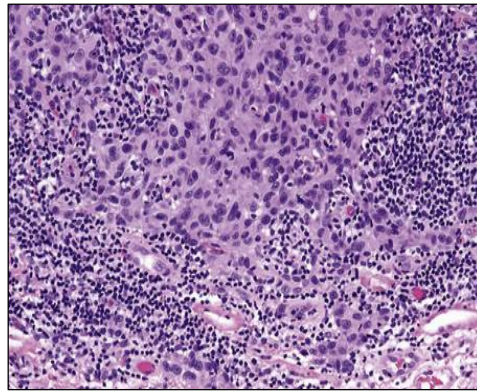


Figura 14 Tumor melanocítico con linfocitos intratumorales.

- Ulceración: cuando se identifica erosión de la superficie neoplásica. Figura 15.

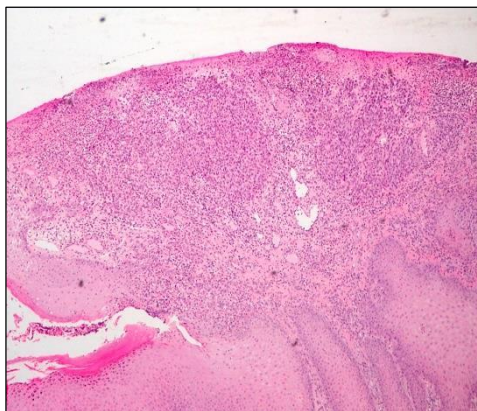


Figura 15 Tumor melanocítico con ulceración superficial.

2.3 Variables moleculares

Técnica de inmunohistoquímica

La selección de anticuerpos que se incluyen en el estudio inmunohistoquímico, se realiza basándose en una revisión exhaustiva de la literatura en relación a las alteraciones moleculares que se pueden expresar en todo el espectro de los tumores de Spitz. Las técnicas de inmunohistoquímica de todas las muestras fueron realizadas en el Hospital Universitario 12 de octubre.

Los marcadores de inmunohistoquímica que se incluyeron fueron:

- ALK
- NTRK
- BRAF
- BAP-1
- MET
- RET
- ROS-1

Técnica de FISH

Se emplea FISH para comparar los resultados obtenidos con inmunohistoquímica, a excepción de la determinación de HRAS que sólo se determinó con FISH, debido a que no se disponía del anticuerpo. La técnica de FISH de todas las muestras fue realizada en el Hospital 12 de octubre. Se emplearon sondas para la detección de alteraciones en:

- HRAS
- ALK
- NTRK

- MET
- RET
- ROS-1

Técnica de PCR

Se realiza PCR, por métodos de Sanger y Cobas®, como técnicas de comparación con la inmunohistoquímica para la determinación de mutación de BRAF. Todas las determinaciones de PCR se realizaron en el Hospital Universitario 12 de Octubre.

3. Procesamiento de muestras

3.1 Tinciones de inmunohistoquímica

Las técnicas de inmunohistoquímica se realizan sobre secciones de material previamente fijado en formol e incluido en parafina, que fue cortado a 3 micras de espesor y colocado en láminas portaobjetos para inmunohistoquímica. Una vez desparafinadas las preparaciones, se rehidrataron con una serie de alcoholes y se lavaron con un buffer salino. Todos los anticuerpos empleados junto con las muestras a estudio fueron procesadas por el sistema automatizado BOND-III (Leica microsystems), que consiste en la detección de polímeros refinados a partir de un bloque de peróxido, polímero reactivo, cromógeno y hematoxilina de contraste.

Las tinciones de inmunohistoquímica utilizadas se detallan a continuación:

Tabla 2 Características de los anticuerpos de inmunohistoquímica

	Clon	Origen	Dilución	Desenmascaramient o
ROS-1	D4D6	Cellsignaling	1:200	pH 8 a los 30 min
BRAF	V600E (VE1)	Spring Bioscience	1:100	pH 8 a los 30 min
ALK	D5F3	Roche	Prediluid o	Prediluido
BAP-1	C4	Santa Cruz	1:1000	pH 8 a los 20 min
MET	D1C2	Cell Signaling	1:200	pH 8 a los 20 min
RET	EPR2871	Abcam	1:200	pH 8 a los 20 min
NTRK	EP1058Y	Abcam	1:150	pH 8 a los 30 min

3.2 FISH

La Hibridación Fluorescente In Situ (FISH) es una técnica citogenética que permite localizar un determinado fragmento de la secuencia de los ácidos nucleicos y pone de manifiesto la presencia de secuencias génicas específicas. Se puede aplicar sobre núcleos celulares, en cortes de tejido o directamente en cromosomas. La posibilidad de poder utilizar las técnicas de FISH sobre células que no están dividiéndose es importante en aquellas neoplasias con bajo índice proliferativo. Para ello se utiliza sondas marcadas con fluorocromos (usualmente el verde corresponde a la sonda centromérica y el flurocromo rojo a la sonda en región cromosómica a estudio). Dependiendo del tipo de sonda utilizada es posible evaluar la presencia de reordenamientos en los núcleos (115).

Para localizar las secuencias de interés, la sonda se debe hibridar con la secuencia de ADN de la muestra. El primer paso consiste en desnaturalizar las moléculas de ADN tanto la de la sonda como la de la muestra de estudio. Para ello se eleva la temperatura hasta 70-80° C. Después se hibrida la sonda con su

región complementaria del ADN de la muestra, se incuban a 37° C la sonda de interés con la muestra, y por complementariedad de las bases se une a la sonda de interés con la región complementaria del ADN de la muestra. Con un microscopio de fluorescencia se observan las señales de la sonda (115)

El FISH se realiza en los tumores que muestran inmunotinción positiva con las técnicas inmunohistoquímica. Los tipos de sondas de FISH usadas en nuestro estudio fueron las que se describen a continuación:

Tabla 3 Características de las sondas de FISH

	Tipo de Sonda	Origen
ALK	Translocación Locus 2p23	Vysis
ROS-1	Translocación Locus 6q22	Vysis
MET	Amplificación Locus 7q31.2	Kreatech
RET	Translocación Locus 10q11.21	Kreatech
NTRK	Translocación Locus 1q23	Zytovision
HRAS	Amplificación locus 11p15.5	Empire genomics

3.3 PCR

En los tumores que muestran expresión de BRAF con la técnica de inmunohistoquímica, se realiza PCR por método COBAS® y otras que por razones técnicas fueron procesadas por método Sanger; ambas técnicas

detectan la mutación de BRAF. La técnica de PCR es realizada en muestras en parafina previamente fijadas en formol.

La reacción en cadena de la polimerasa se basa en la replicación del ADN en la que actúan varias proteínas para sintetizar dos nuevas hebras de ADN a partir de otra que funciona como molde. En la técnica de PCR, se simula en un tubo lo que ocurre durante la replicación celular. La síntesis de nuevas cadenas de ADN se lleva a cabo mezclando: el ADN que contiene el o los fragmentos que se van a amplificar; la polimerasa; los iniciadores (fragmento de ADN de 15-30 nucleótidos en la región a amplificar y que aportan el extremo 3' libre para que inicie la transcripción); desoxinucleótidos; cloruro de magnesio u otro co-factor necesario para que trabaje la polimerasa (116).

La PCR se inicia con la desnaturalización o separación de la doble hélice de ADN mediante el calentamiento de la muestra a una temperatura entre 94-96° C para romper los puentes de hidrógeno que las unían, de esta manera cada cadena queda como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria de ADN. Una vez separadas las cadenas del ADN, se alinean los iniciadores a sitios específicos complementarios de la región que se va a amplificar, para que esto suceda se baja la temperatura entre 40-60°C lo que permite la unión (alineamiento) de los iniciadores (116,117).

Finalmente, se sintetiza una nueva cadena en sentido 5' a 3' para lo cual se incrementa la temperatura, por lo general a 72° C, porque es la temperatura óptima a la cual la ADN-polimerasa se une a los iniciadores y comienza la replicación. Estas tres etapas: 1) desnaturalización, 2) alineamiento y 3) extensión del ADN, se repiten sucesivamente, en cada nuevo ciclo se amplifica simultáneamente la región de interés de las dos cadenas complementarias. Los productos generados aumentan su concentración de manera exponencial porque cada nueva copia sirve de molde en los ciclos subsecuentes dando origen a millones de copias del fragmento seleccionado.

El KIT de PCR empleado en este estudio fue:

Tabla 4 Características técnica de PCR

	Mutación	Origen
BRAF	V600	Roche (Cobas ®) Sanger

4. Valoración de las muestras

Con las técnicas de inmunohistoquímica, cada muestra se evalúa de forma semi-cuantitativa por tres patólogos expertos en dermatopatología. Se valora la expresión inmunohistoquímica de los marcadores valorándose como negativo cuando no hay inmunoeexpresión del anticuerpo y como positivo cuando si hay tinción independientemente de la intensidad y del porcentaje de células teñidas, a excepción de BAP-1 que se considera como presencia de la mutación cuando se pierde la inmunotinción.

La técnica de FISH, es valorada por un biólogo experimentado en la interpretación de ésta técnica. Se usa un microscopio de fluorescencia con filtros apropiados para valorar en la zona tumoral entre 100 y 200 núcleos teniendo cuidado de no valorar los núcleos solapados, observando si hay presencia de delección, translocación o amplificación del gen estudiado.

Con la técnica de PCR se valoran los resultados obtenidos mediante la técnica Cobas y Sanger realizadas y valoradas por un biólogo experto.

Una vez obtenido los resultados de inmunohistoquímica, FISH y PCR se identificaron las características histológicas en cada caso.

Se propone en último término un algoritmo diagnóstico que en base a los hallazgos histológicos y clínicos pretende intentar predecir las alteraciones moleculares de los tumores de Spitz.

5. Almacenamiento de datos

Los datos recolectados de todas las variables clínicas, anatomopatológicas y moleculares fueron almacenados en una base de datos de Microsoft Excel.

6. Estudio estadístico

Este trabajo es un estudio observacional transversal en el que se analiza la expresión de diferentes mutaciones en las vías moleculares de tumores de Spitz considerándose los nevos de Spitz, los tumores de Spitz atípicos y los melanomas de Spitz comparándolos con nevos y melanomas convencionales. De todas las muestras inicialmente seleccionadas, se descartan aquellas que no contenían material representativo ni valorable para el estudio.

Análisis descriptivo

Se realiza un análisis descriptivo de la población de estudio tomando en cuenta:

- Variables clínicas: edad, sexo, tipo de lesión y localización.
- Variables histológicas: Características citológicas, forma, afectación epidérmica, extensión pagetoide, ulceración, inflamación asociada y pigmentación.
- Variables moleculares:
 - o Inmunohistoquímica: ROS-1, ALK, BRAF, BAP-1, MET, RET y NTRK.
 - o FISH: ALK, ROS-1, MET, RET, NTRK y HRAS
 - o PCR: BRAF

Análisis de la expresión molecular

Se realiza un análisis comparativo clínico-morfológico, donde se describen las características histológicas y clínicas de acuerdo a cada alteración molecular. Posteriormente se hace un análisis comparativo entre los resultados de la

inmunohistoquímica y FISH (ALK, NTRK, BAP-1, MET, RET, ROS) y entre la inmunohistoquímica y los resultados de PCR (BRAF).

Para establecer las diferencias significativas entre cada grupo se ha utilizado el test exacto de Fisher. En la estadística descriptiva para cada variable se emplea un análisis univariado y posteriormente se realiza un modelo ajustado con una regresión logística multivariado. Se calcula el índice Kappa para valorar la concordancia entre la inmunohistoquímica con el FISH y PCR. Las diferencias entre grupos se consideran estadísticamente significativas cuando la pValor es $<0,05$, con intervalo de confianza de 95%. El análisis de los datos se realiza empleando el Software STATA.

Posteriormente con los hallazgos analizados más significativos con el modelo ajustado multivariado, se realiza un algoritmo predictor de alteraciones moleculares en tumores de Spitz basándose en características clínico-histológicas.

7. Aspectos éticos y legales

Todas las muestras empleadas en este estudio fueron utilizadas previo consentimiento y aprobación por el comité ético del Hospital 12 de octubre para la correcta utilización de muestras y datos del archivo de anatomía patológica.

RESULTADOS

IV. RESULTADOS

Características clínicas de las lesiones melanocíticas

Se incluyen en este estudio 160 casos en total, de los cuales 115 muestras provienen de pacientes con tumores de Spitz, correspondientes a 71 casos de nevus de Spitz (45%), 26 casos de tumores de Spitz atípicos (16%) y 18 melanomas de Spitz (11%). Además se reúnen 45 muestras de tumores de tipo no Spitz, correspondientes a 21 casos de nevus (13%) y 24 casos de melanomas convencionales (15%) (Figura 16).

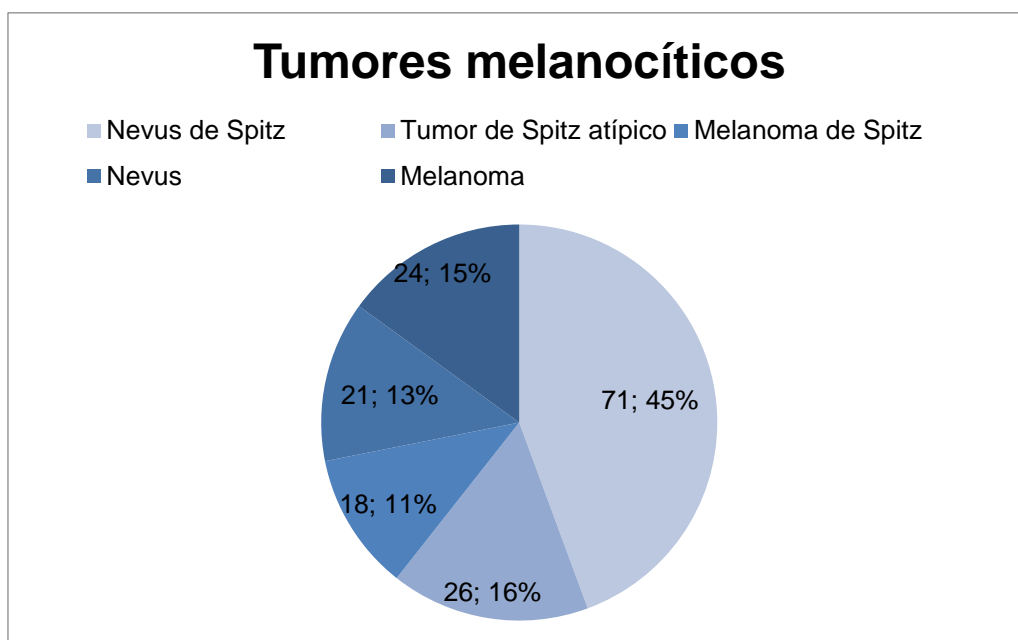


Figura 16 Distribución de las frecuencias de los tipos de lesiones melanocíticas incluidas en el estudio.

De cada caso, se valora las características clínicas que incluyen la edad, el sexo y la localización de las lesiones. La frecuencia de las características clínicas se resume en la tabla 5.

Tabla 5 Características clínicas de la muestra

	Total n (%)
Edad (años)	34* [19;46]**
Sexo	
Mujer	91 (56,8%)
Hombre	69 (43,1%)
Localización	
Miembros superiores	57 (35,6%)
Miembros inferiores	49 (30,6%)
Cabeza/Cuello	25 (15,6%)
Tórax	22 (13,7%)
Abdomen	7 (4,3%)
Total	n= 160

*Mediana **Rango intercuartílico (percentil 25 y 75)

Edad

La edad de toda la serie estudiada está comprendida entre 1 año de edad hasta los 91 años, con una media de 38 años, una mediana de 34 años y un rango intercuartílico de 19-46 años. (Tabla 6)

Tabla 6 Media y rango de edad en cada grupo diagnóstico

Lesiones melanocíticas	Media (años)	Rango (años)
Nevus de Spitz	26	[1-84]
Tumor de Spitz atípico	27	[1-74]
Melanoma de Spitz	43	[12-86]
Nevus	39	[14-79]
Melanoma	54	[6-91]

Al observar el rango y la media de edad en los grupos de lesiones melanocíticas, se puede identificar que en los nevus (tanto de Spitz como en los

de tipo convencional) y en los tumores de Spitz atípicos, la media de la edad es menor que en los melanomas. Además los pacientes con tumores de Spitz constituyen un grupo de menor edad con respecto a los pacientes con diagnóstico de nevus y melanoma convencional.

Sexo

En la distribución según el sexo, es predominante el sexo femenino en 57% de la muestra (91/160). En los nevus de Spitz el sexo femenino representa el 26% (n=42), en los tumores de Spitz atípicos el 9% (n=14), en los nevus el 8% (n=13) y en los melanomas convencionales 9% (n=14). Por último es menos frecuente en los melanomas de Spitz constituyendo un 5% (n=8) los pacientes de sexo femenino con respecto al 6% (n=10) en los de sexo masculino (Figura 17).

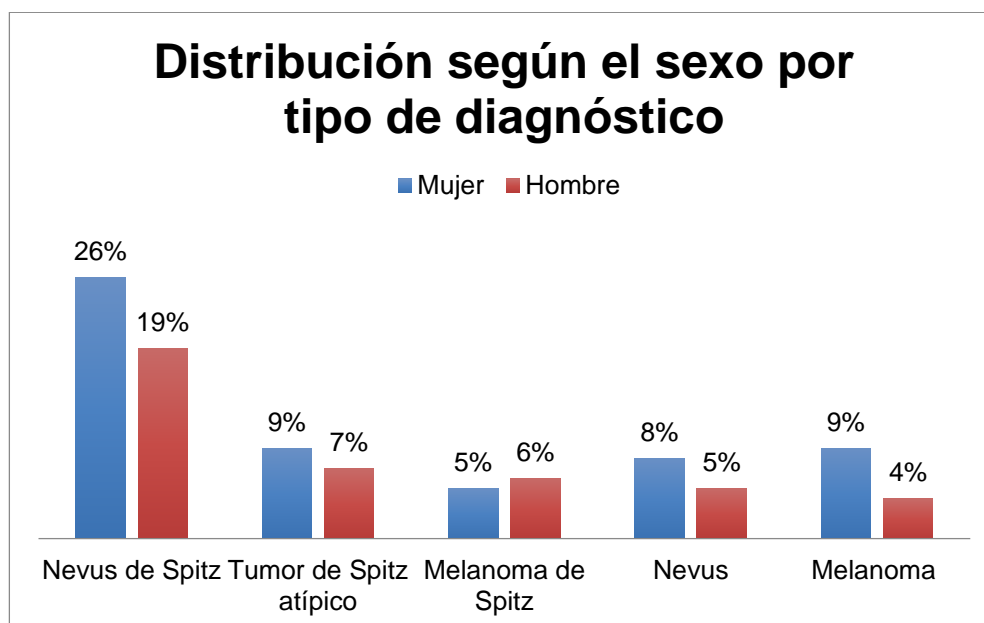


Figura 17 Distribución según el sexo en los tumores de Spitz y en los nevus y melanomas convencionales.

Localización de las lesiones melanocíticas

La localización más frecuente de los tumores de Spitz es en los miembros superiores (28%; n=45), seguido de miembros inferiores (25%; n=40), cabeza y cuello (9%; n=15), tórax (8%; n=13) y menos frecuente el abdomen (3%; n=5). En los nevus y melanomas convencionales, la localización más frecuente es en extremidades superiores (8%; n=13), luego cabeza y cuello (7%; n=11), miembros inferiores (6%; n=10)-tórax (6%; n=10) y por último en frecuencia en el abdomen (2%; n=3) (Figura 9).

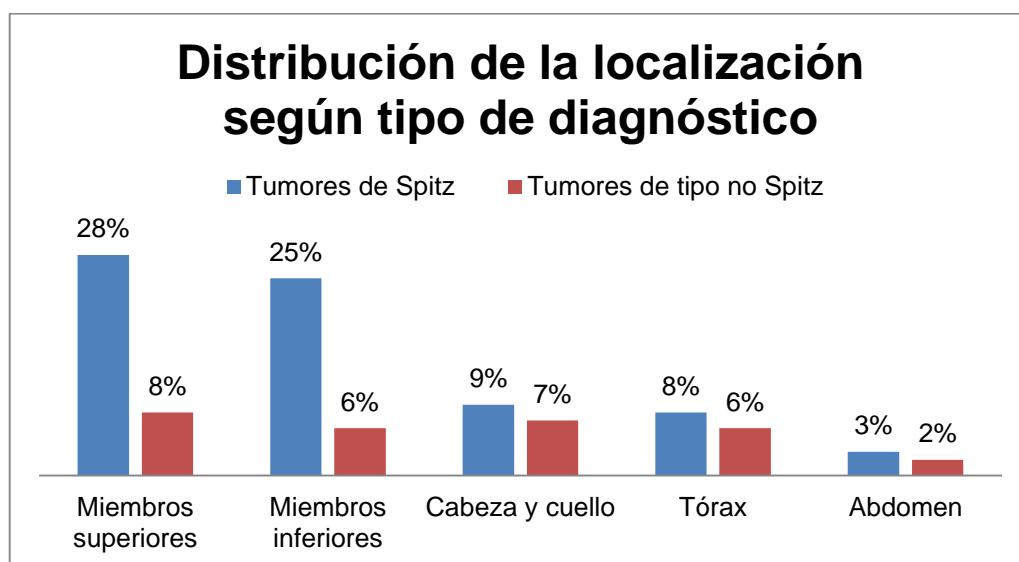


Figura 18 Distribución de la localización en grupos de lesiones melanocíticas de Spitz vs de tipo no Spitz

Características histológicas de los tumores melanocíticos

Las frecuencias de las características histológicas en los tumores melanocíticos estudiados se detalla en la siguiente tabla:

Tabla 7 Características histológicas valoradas en las muestras estudiadas

	Total n=160 (%)	Tumores de Spitz n= 115 (%)	Tumores de tipo no Spitz n= 45 (%)
Citología			
<i>Epitelioide</i>	82 (51,8%)	62 (38,1%)	20 (12,5%)
<i>Fusiforme</i>	49 (30%)	45 (28,1%)	4 (2,5%)
<i>Redondeada</i>	21 (13,1%)	0	21 (13,1%)
<i>Mixta</i>	8 (5%)	8 (5%)	0
Polipoide	37 (23,1%)	33 (20,6%)	4 (2,5%)
Pigmentado	72 (45%)	56 (35%)	16 (10%)
Extensión pagetoide	34 (21,2%)	24 (15%)	10 (6,25%)
Componente epidérmico	90 (56,2%)	83 (51,8%)	7 (4,3%)
Ulceración	8 (5%)	2 (1,2%)	6 (3,7%)
Inflamación	86 (53,7%)	68 (42,5%)	18 (11,25%)

La citología epitelioide es el tipo morfológico más frecuente en toda la muestra (51,8%; n=82). En los tumores de Spitz también es la característica citológica predominante (38,1%; n=62).

La morfología polipoide, identificada a poco aumento tras el examen microscópico, es un hallazgo encontrado en el 23% (n=37) de la muestra y en el 20,6% (n=33) de los tumores de Spitz.

La presencia de pigmento melánico en las células neoplásicas se observa en el 45% (n=72) de los tumores melanocíticos evaluados. En los tumores de Spitz está presente en el 35% (n=56) de los casos.

La extensión pagetoide se observa en el 21,2% (n=34) de los casos. La presencia de extensión pagetoide en los nevus de Spitz se identifica en 10 de 71 casos (6%), en los tumores de Spitz atípicos 5 de 26 casos (3%), en los melanomas de Spitz en 7 de 18 casos (4%) y en los melanomas de tipo convencional en 10 de 24 casos (6%). No se identifica en los nevus convencionales.

El componente epidérmico está presente en el 56,2% (n=90) de los casos. En los tumores de Spitz se observa en un 52% (n=83).

En nuestra serie sólo el 5% (n=8) de los casos muestra ulceración presente en melanomas convencionales (n=6), en un melanoma de Spitz (n=1) y en un nevus de Spitz (n=1).

La presencia de inflamación está presente en el 53,7% (n=86) de los casos correspondiendo a nevus de Spitz (n=41), tumor de Spitz atípico (n=12), melanoma de Spitz (n=13) y en los melanomas convencionales (n=17). No se observa esta característica en los nevus convencionales.

2.1. Nevus de Spitz

Los nevus de Spitz incluidos en el estudio (n=71) corresponden a lesiones melanocíticas que están constituidas por una proliferación de melanocitos de gran tamaño y de distribución predominantemente intradérmica. Las células son de morfología fusiforme, epitelioides o de un patrón mixto, sin atipia citológica y con ninguna o muy aislada mitosis. En las figuras 19 y 20, se observan ejemplos de nevus de Spitz incluidos en la muestra.

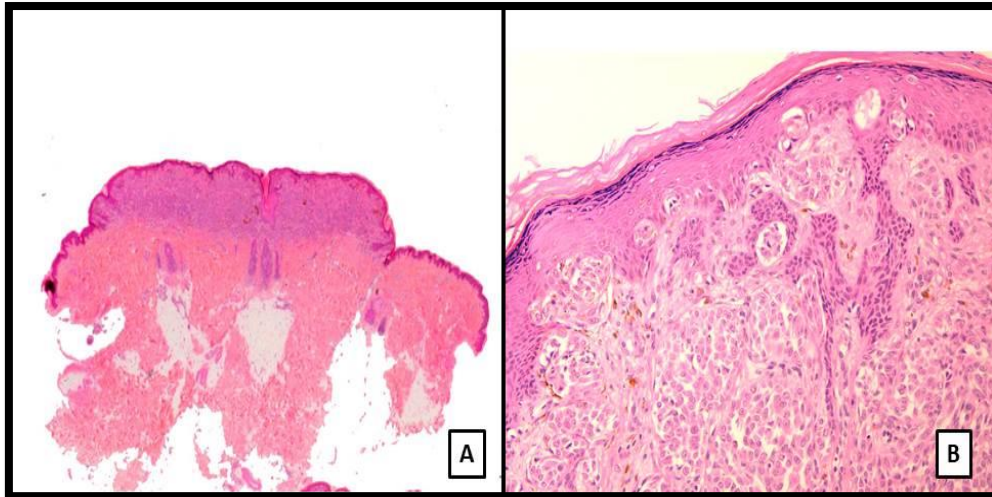


Figura 19 Características histológicas de nevus de Spitz incluidos en el estudio

A y B: Nevus de Spitz incluidos en el estudio, muestran una celularidad monomorfa, centrada en la dermis papilar y reticular superficial, constituida por células de hábito epitelioide, sin atipia evidente y sin figuras de mitosis (HE X12,5 y X100)

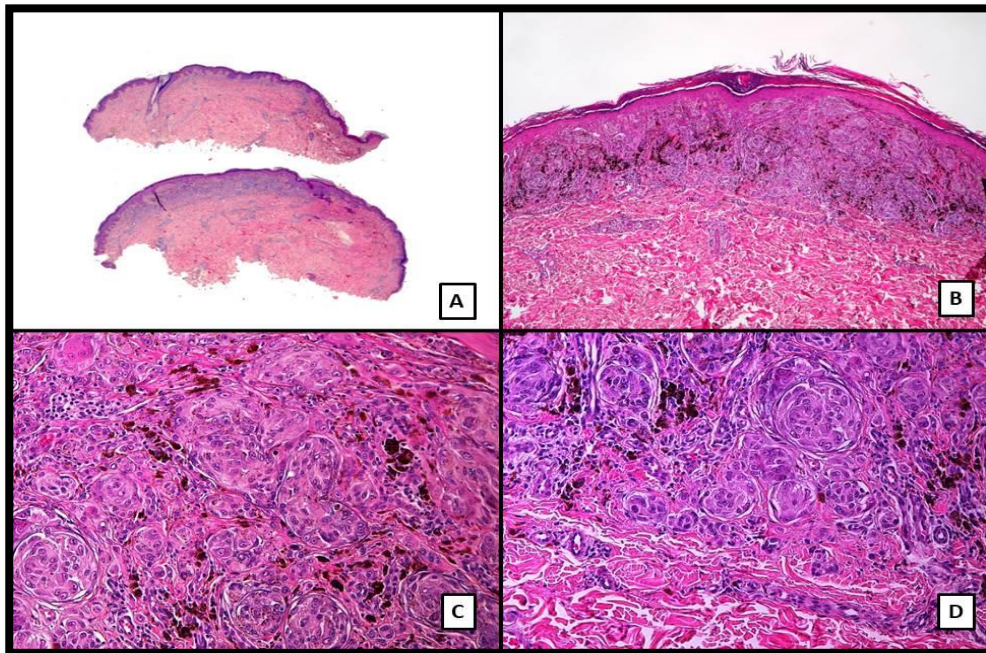


Figura 20 Nevus de Spitz incluidos en el estudio

A: Nevus de Spitz que muestran una celularidad monomorfa constituida por células predominantes de hábito epitelioide (HE X40) B. Las neoplasia no tiene extensión pagetoide (HE X100) C. No se observan figuras de mitosis (HE X200) D. La celularidad madura en profundidad (HE X200)

2.2 Tumor de Spitz atípico

Los tumores de Spitz atípicos (n=26) incluidos se caracterizan por ser proliferaciones neoplásicas de melanocitos de gran tamaño, que no maduran en profundidad, de morfología epitelioides o fusiforme y que suelen tener un tamaño mayor a los nevus de Spitz (> 10 mm.), con atipia y frecuentemente muestran mitosis. Estas lesiones suelen plantear serios problemas a la hora del diagnóstico diferencial. En nuestra serie todos los casos fueron valorados por tres dermatopatólogos. Figura 21.

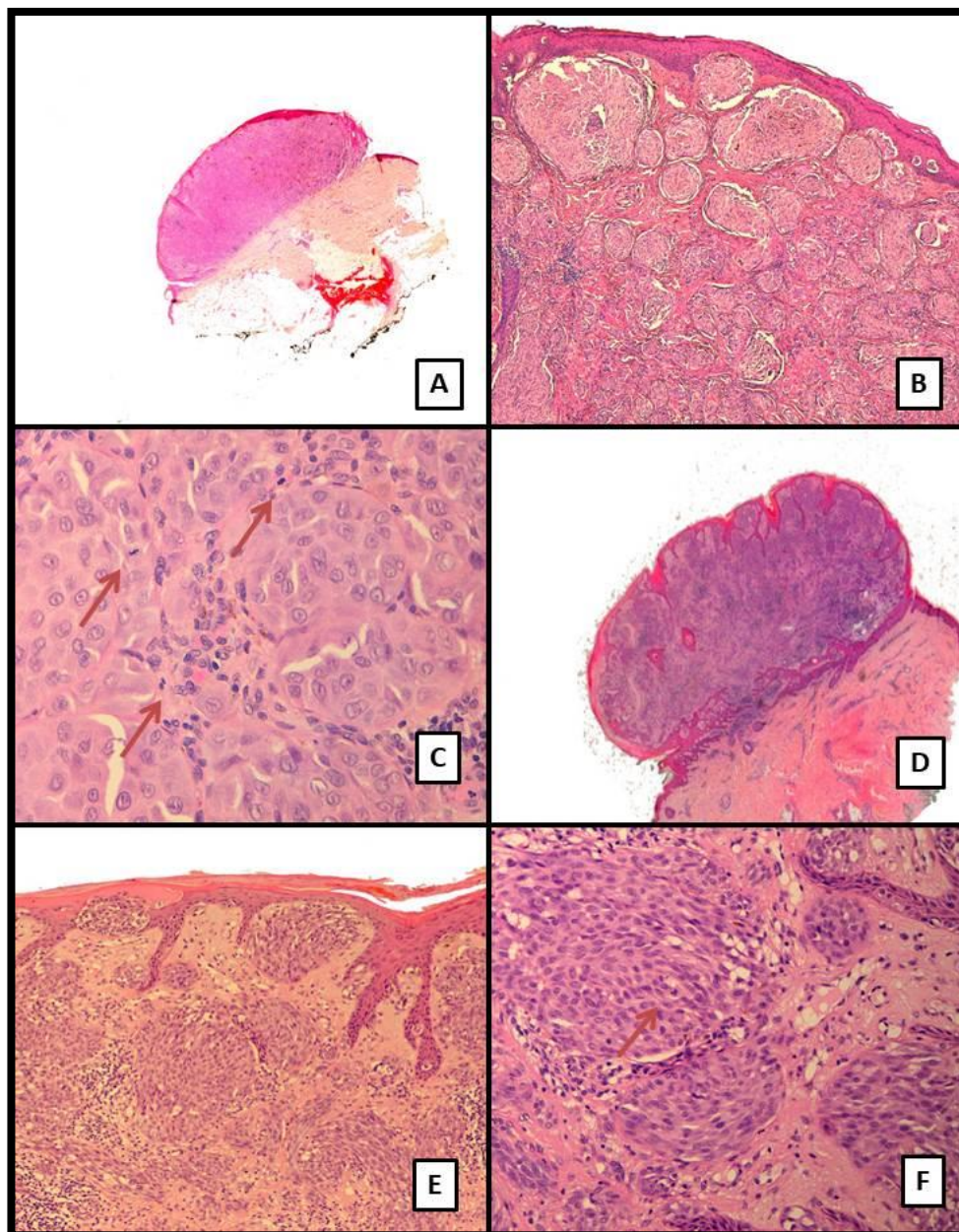


Figura 21 Características histológicas de tumores de Spitz atípicos

A. Tumor de Spitz atípico: lesión sobrelevada de gran tamaño con una celularidad densa y con extensión a dermis profunda (HE X12,5), B: La neoplasia muestra celularidad de tipo fusiforme (HE X100), C: En otras áreas las células son de aspecto epitelioides con atipia citológica leve y figuras de mitosis (HE X400). D: Piel con hiperplasia epidérmica con proliferación de células melanocíticas que “rellenan” toda la dermis papilar, reticular superficial y profunda, con abundantes melanófagos (HE X12,5). E: Proliferación de células melanocíticas fusiformes con afectación epidérmica y en dermis profunda (HE X200) F: células de aspecto fusiforme con atipia citológica que no maduran en profundidad y con mitosis profundas (HE X400).

2.3. Melanomas de Spitz

Los melanomas de Spitz (n=18) incluidos en el estudio, se caracterizan por estar constituidos una proliferación neoplásica asimétrica, con presencia de células de morfología fusiforme o epitelioides, que no maduran en profundidad, en algunos casos se asocia a hiperplasia epidérmica, con evidente pleomorfismo nuclear y mitosis sobretodo en áreas profundas. Figura 22.

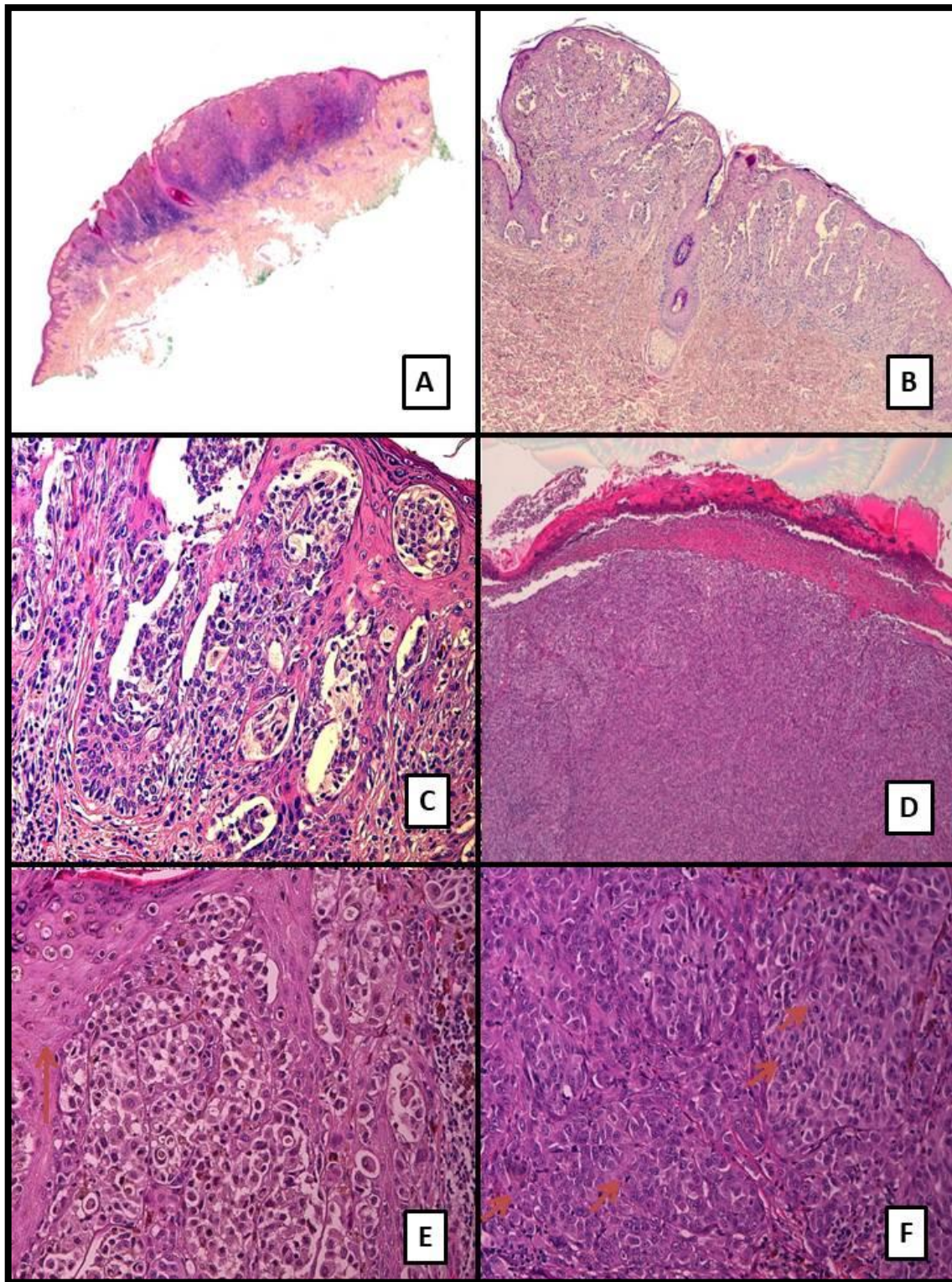


Figura 22 Características histológicas de melanomas de Spitz

A: Melanoma de Spitz con abundante celularidad asociado a infiltrado inflamatorio en banda (HE X12,5), B: Densa proliferación melanocítica asimétrica asociada a leve hiperplasia epidérmica (HE X12,5), C: Densa celularidad

epiteloide con afectación epidérmica (HE X100), D: Densa celularidad con erosión superficial (HE X100) E: Celularidad con pleomorfismo nuclear y alteración de la relación núcleo-citoplasma, con extensión pagetoide (flechas) (HE X400), F: Células epitelioides muy pleomórficas, con elevado índice mitótico (flechas) (HE X400).

2.4. Nevus melanocítico

Los nevus convencionales (n=21) que se incluyeron para comparar los hallazgos con los tumores de Spitz, fueron nevus melanocíticos de la unión, intradérmicos y compuestos, están constituidos por una proliferación de células melanocíticas, de pequeño tamaño, con citoplasma eosinófilo, que no muestran atipia citológica; la celularidad madura en profundidad y no se observan mitosis. Figura 23.

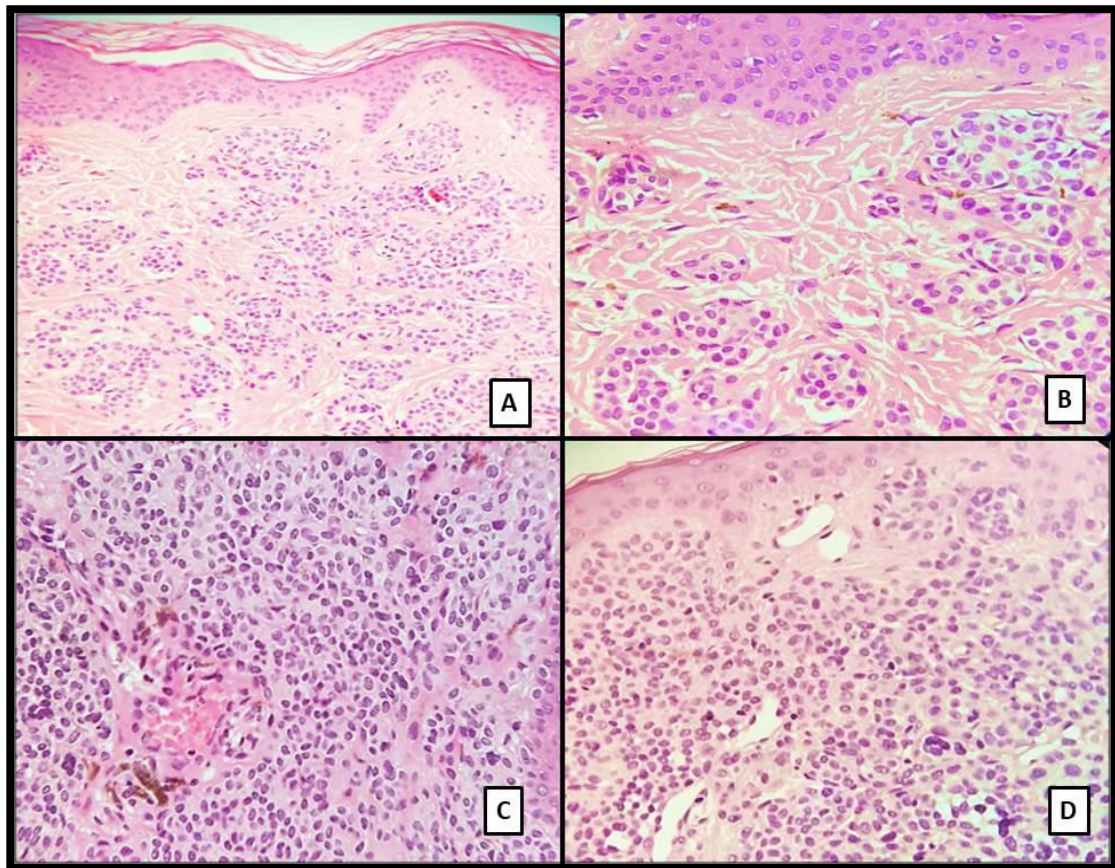


Figura 23 Características histológicas nevus melanocítico

A: Nevus melanocítico con tecas de melanocitos en la dermis (HE X40), B: proliferación melanocítica con celularidad uniforme de pequeño tamaño (HE

X100), C: los melanocitos neoplásicos maduran en profundidad (HE X200), D: las células neoplásicas no muestran atipia ni figuras de mitosis (HE X200).

2.5. Melanomas

Los melanomas convencionales (n=24) estudiados muestran una proliferación de células melanocíticas de distribución asimétrica, usualmente con afectación epidérmica asociada a extensión pagetoide, con pleomorfismo nuclear, abundantes mitosis, células neoplásicas que no maduran en profundidad y algunos casos se asocian a ulceración e infiltrado inflamatorio. Figura 24.

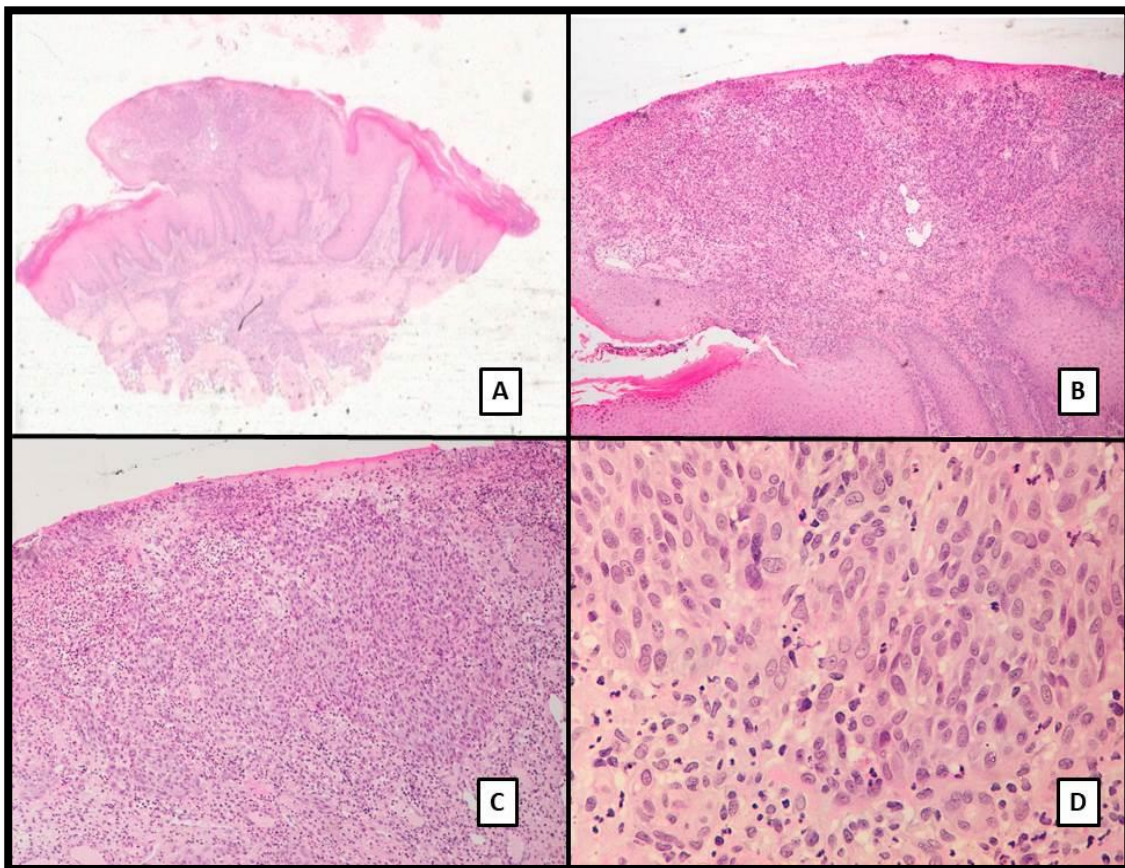


Figura 24 Características histológicas de melanomas

A: Melanoma con erosión superficial (HE X12,5), B: Melanoma con proliferación de melanocitos asimétrica (HE X12,5), C: Proliferación melanocítica densa con que no maduran en profundidad (HE X200), D: las células neoplásicas muestran evidente pleomorfismo (HE X200).

ALK

Se realiza la determinación de ALK con técnica de inmunohistoquímica. Los resultados obtenidos en cada caso con el anticuerpo se comparan con las características clínicas. Los hallazgos se resumen la tabla 8.

Tabla 8 Casos positivos con inmunohistoquímica con anticuerpo ALK

	Total n=160 (%)	ALK (+) IHQ n (%)	p Valor
<i>Edad (años)</i>	34* [19;46]**	28* [13;35]**	0,1654
<i>Diagnóstico</i>			
Nevus de Spitz	71 (44,3%)	6 (46,1%)	
Tumor de Spitz	26 (16,2%)	7 (53,8%)	
atípico	18 (11,2%)	0	0,0013
Melanoma de Spitz	21 (13,1%)	0	
Nevus	24 (15%)	0	
Melanoma			
<i>Sexo</i>			
Mujer	91 (56,8%)	8 (61,5%)	0,7232
Hombre	69 (43,1%)	5 (38,4%)	
<i>Localización</i>			
Miembros superiores	57 (35,6%)	3 (23%)	
Miembros inferiores	49 (30,6%)	4 (30,7%)	0,1748
Cabeza/Cuello	25 (15,6%)	5 (38,4%)	
Tórax	22 (13,7%)	1 (7,69%)	
Abdomen	7 (4,3%)	0	

*Mediana **Rango intercuartílico (percentil 25 y 75)

La inmunotinción para ALK es positiva en el 8% de los casos (n=13/160). Los casos ALK positivos sólo se observan en pacientes con tumores de Spitz (nevus

de Spitz y tumor de Spitz atípico), es decir, no se observa positividad en melanomas de Spitz, nevus ni en melanomas convencionales ($p=0,0013$).

Los pacientes con tumores melanocíticos que muestran positividad con inmunohistoquímica para ALK, la mediana de edad es de 28 años ($p=0,1654$). Se identifica predominio de casos positivos para ALK en pacientes de sexo femenino (61,5%; $n=8$) ($p=0,7232$) y en lesiones ubicadas en cabeza/ cuello (38,4%; $n=5$), miembros inferiores (30,7%; $n=4$) y miembros superiores (23%; $n=3$) ($p=0,1748$).

Las características histológicas de los casos positivos para ALK con inmunohistoquímica se detallan en la tabla 9.

Tabla 9 Características histológicas casos ALK positivos.

	Tumores de spitz Total $n=115$ (%)	ALK (+) IHQ n (%)	p valor
Citología			
Epitelioide	83 (51,8%)	4 (30,7%)	
Fusiforme	49 (30%)	7 (53,8%)	0,0320
Redondeada	21 (13,1%)	0	
Mixta	8 (5%)	2 (15,3%)	
Polipoide	37 (23,1%)	7 (53,8%)	0,0061
Pigmentado	72 (45%)	2 (15,3%)	0,0251
Extensión pagetoide	34 (21,2%)	1 (7,6%)	0,2125
Componente epidérmico	90 (56,2%)	4 (30,7%)	0,0533
Ulceración	8 (5%)	0	0,3882
Inflamación	86 (53,7%)	3 (23%)	0,0207

La mayoría de los tumores melanocíticos ALK positivos con inmunohistoquímica tienen una citología de tipo fusiforme en el 53,8% de los casos ($n=7$) ($p=0,032$), son polipoides en el 53,8% ($n=7$); ($p=0,0061$), tienen

pigmentación melánica en el 15,3% (n=2) ($p=0,0251$), con componente epidérmico el 30,7% (n=4) ($p=0,0533$) y asociado a componente inflamatorio en el 23% de los casos (n=3) ($p=0,027$) Los tumores de Spitz que son positivos para la inmunotinción para ALK muestran una tinción intensa y citoplasmática. A continuación se muestran algunos ejemplos.

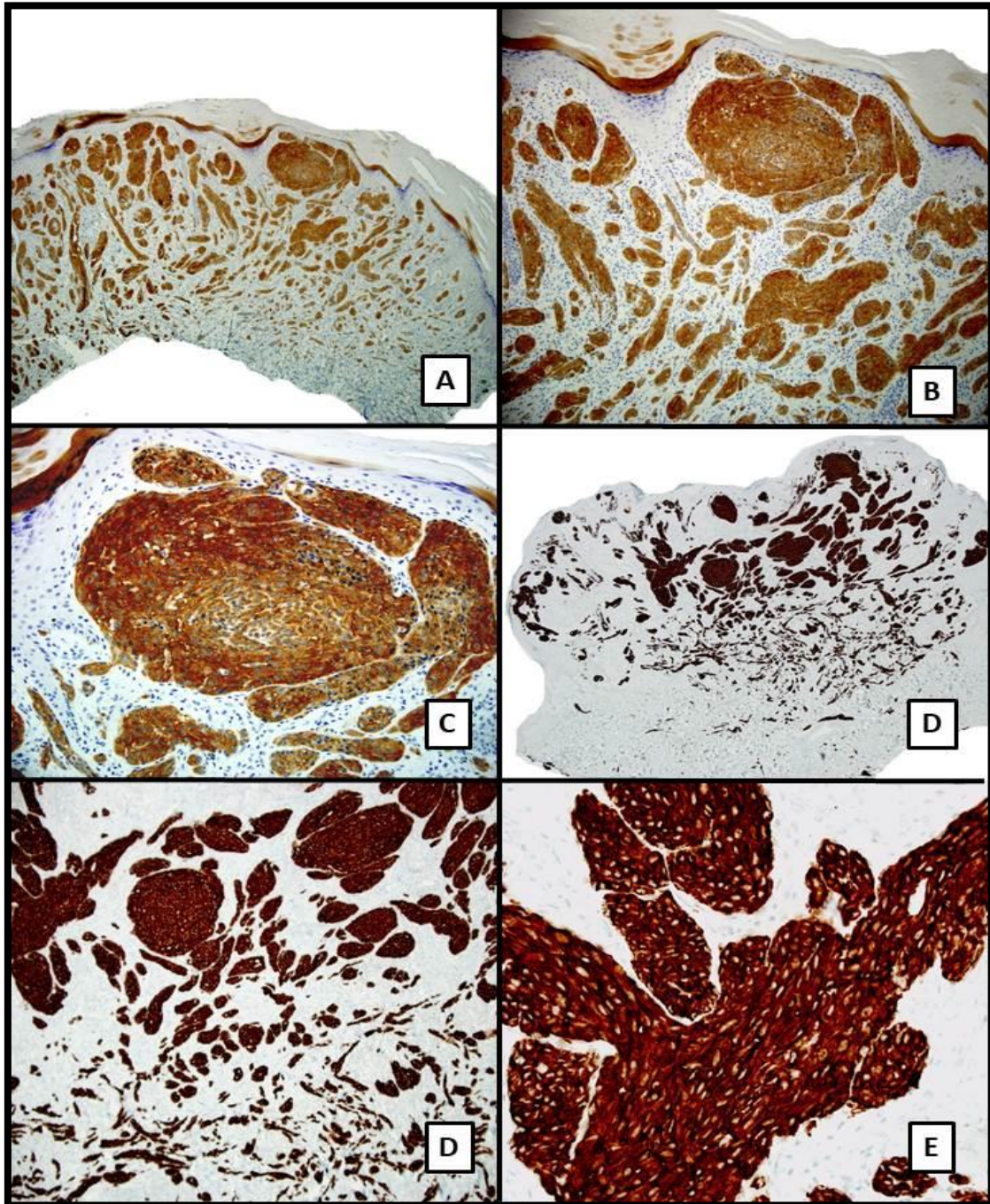


Figura 25 Nevus de Spitz ALK positivo con inmunohistoquímica

A-F: Nevus de Spitz en los que se observa positividad intensa, citoplasmática para ALK con técnica de inmunohistoquímica (X12,5; X100; X400; X12,5; X100; X400)

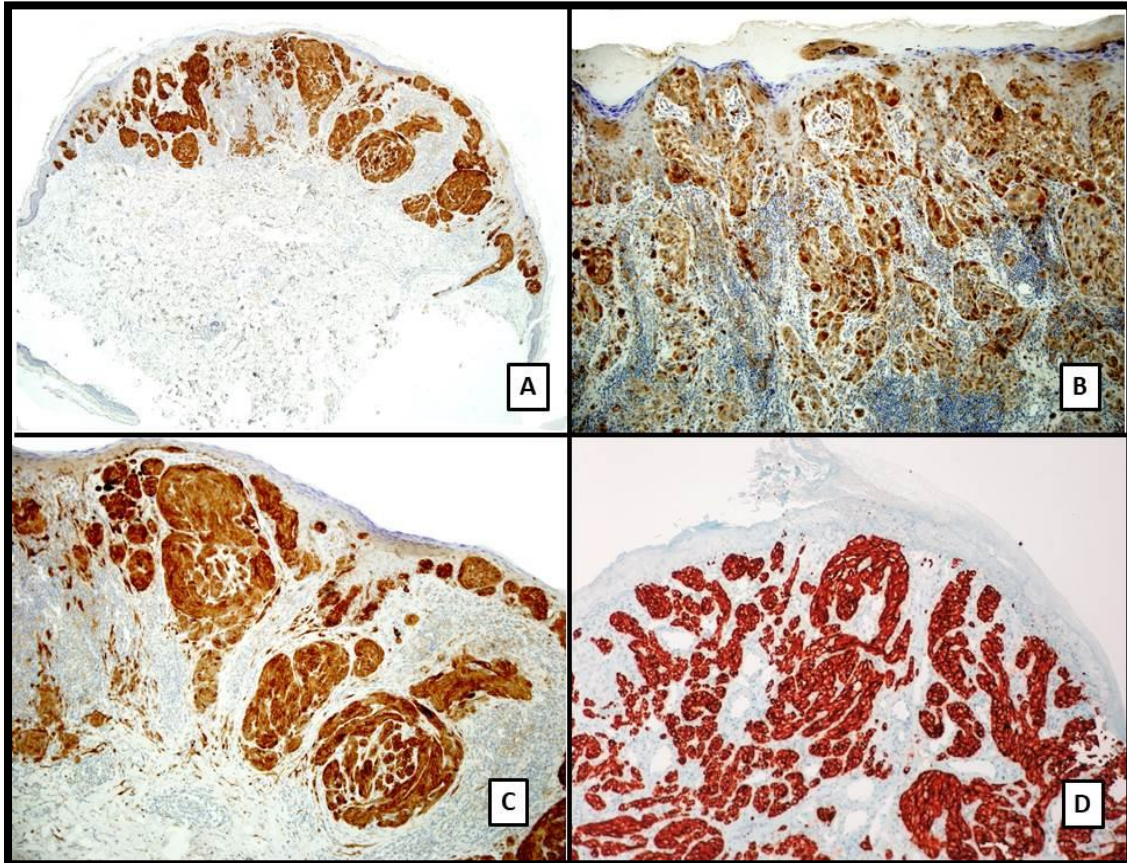


Figura 26 Tumor de Spitz atípico ALK positivo con inmunohistoquímica

A-D: Tumores de Spitz atípicos en los que se observa positividad intensa, citoplasmática para ALK con técnica de inmunohistoquímica (X12,5; X100; X400; X12,5; X100; X400)

Se utiliza el anticuerpo NTRK en todos los tumores melanocíticos estudiados. Se comparan los casos con inmunotinción positiva para el anticuerpo NTRK con los datos clínicos que corresponde a cada paciente. Los resultados obtenidos con el anticuerpo NTRK están resumidos en la tabla 10.

Tabla 10 Casos positivos con inmunohistoquímica con el anticuerpo NTRK

	Total n=160 (%)	NTRK (+) IHQ n(%)	pValor
<i>Edad (años)</i>	34* [19;46]**	22* [10;30]**	0,0359
<i>Diagnóstico</i>			
Nevus de Spitz	71 (44,3%)	4 (36,3%)	
Tumor de Spitz atípico	26 (16,2%)	7 (63,6%)	
Melanoma de Spitz	18 (11,2%)	0	0,0003
Nevus	21 (13,1%)	0	
Melanoma	24 (15%)	0	
<i>Sexo</i>			
Mujer	91 (56,8%)	6 (54,5%)	0,8716
Hombre	69 (43,1%)	5 (45,4%)	
<i>Localización</i>			
Miembros superiores	57 (35,6%)	5 (45,4%)	
Miembros inferiores	49 (30,6%)	4 (36,3%)	0,5614
Cabeza/Cuello	25 (15,6%)	0	
Tórax	22 (13,7%)	2 (18,1%)	
Abdomen	7 (4,3%)	0	

*Mediana **Rango intercuartílico (percentil 25 y 75)

La inmunotinción para NTRK es positiva en el 6,8% (n=11) del total de la muestra (n=160). Sólo los nevos de Spitz (n=4; 36,3%) y los tumores de Spitz atípicos (n=7; 63,6%) muestran positividad para NTRK con inmunohistoquímica ($p=0,0003$). No se observa positividad para NTRK en melanomas de Spitz, nevos y melanomas convencionales.

Los pacientes con tumores de Spitz que son positivos con inmunohistoquímica para NTRK, tienen una mediana de edad de 22 años ($p=0,0359$). Se observa un ligero predominio del sexo femenino (54,3%; $n=6$) en este grupo de pacientes NTRK positivos ($p=0,8716$). La localización anatómica más frecuente de este grupo de tumores de Spitz es en miembros superiores (45,4%; $n=5$) y en miembros superiores (36,3%; $n=4$) ($p=0,5614$). No se observan casos positivos para NTRK con inmunohistoquímica localizados en cabeza/cuello y abdomen.

Las características histológicas de los casos NTRK positivo con inmunohistoquímica se detallan en la tabla 11.

Tabla 11 Características histológicas casos NTRK positivos con inmunohistoquímica.

	Tumores de Spitz Total $n=115$ (%)	NTRK (+) IHQ n (%)	pValor
Citología			
Epitelioide	62 (54%)	4 (36,3%)	
Fusiforme	45 (39%)	3 (27,2%)	0,0003
Redondeada	0	0	
Mixta	8 (7%)	4 (36,3%)	
Polipoide	33 (28,7%)	5 (45,4%)	0,1963
Pigmentado	56 (48,70%)	5 (45,4%)	0,8211
Extensión			
pagetoide	24 (20,87%)	4 (36,3%)	0,1836
Componente			
epidérmico	83 (72,17%)	9 (81,8%)	0,4529
Ulceración	2 (1,74%)	0	0,6427
Inflamación	68 (59,13%)	9 (81,8%)	0,1075

La morfología citológica de los tumores melanocíticos con expresión de NTRK con inmunohistoquímica es de tipo epitelioide (36,3%; n=4), mixto (36,3%; n=4) o fusiforme (27,2%; n=3) ($p=0,0003$).

La característica histológica polipoide se observa en un 45,4% (n=5) de los tumores que expresan positividad para NTRK con inmunohistoquímica ($p=0,1963$). En este grupo de tumores de Spitz la presencia de pigmento melánico en las células neoplásicas está presente en el 45,4% (n=5) ($p=0,8211$). La presencia de extensión pagetoide es una característica del 36,3% (n=4) de tumores NTRK positivos ($p=0,1836$). La asociación de componente epidérmico en los tumores de Spitz en este grupo es del 81,8% (n=9) ($p=0,4529$), así como la presencia de infiltrado inflamatorio en el 81,8% (n=9) ($p=0,1075$). No se observan casos con inmunoexpresión de NTRK que muestren ulceración de la superficie tumoral ($p=0,6427$).

La positividad con técnica de inmunohistoquímica para NTRK es principalmente citoplasmática. La tinción es intensa en las células neoplásicas que tengan expresión positiva para el anticuerpo NTRK. A continuación se muestran algunos ejemplos de casos positivos.

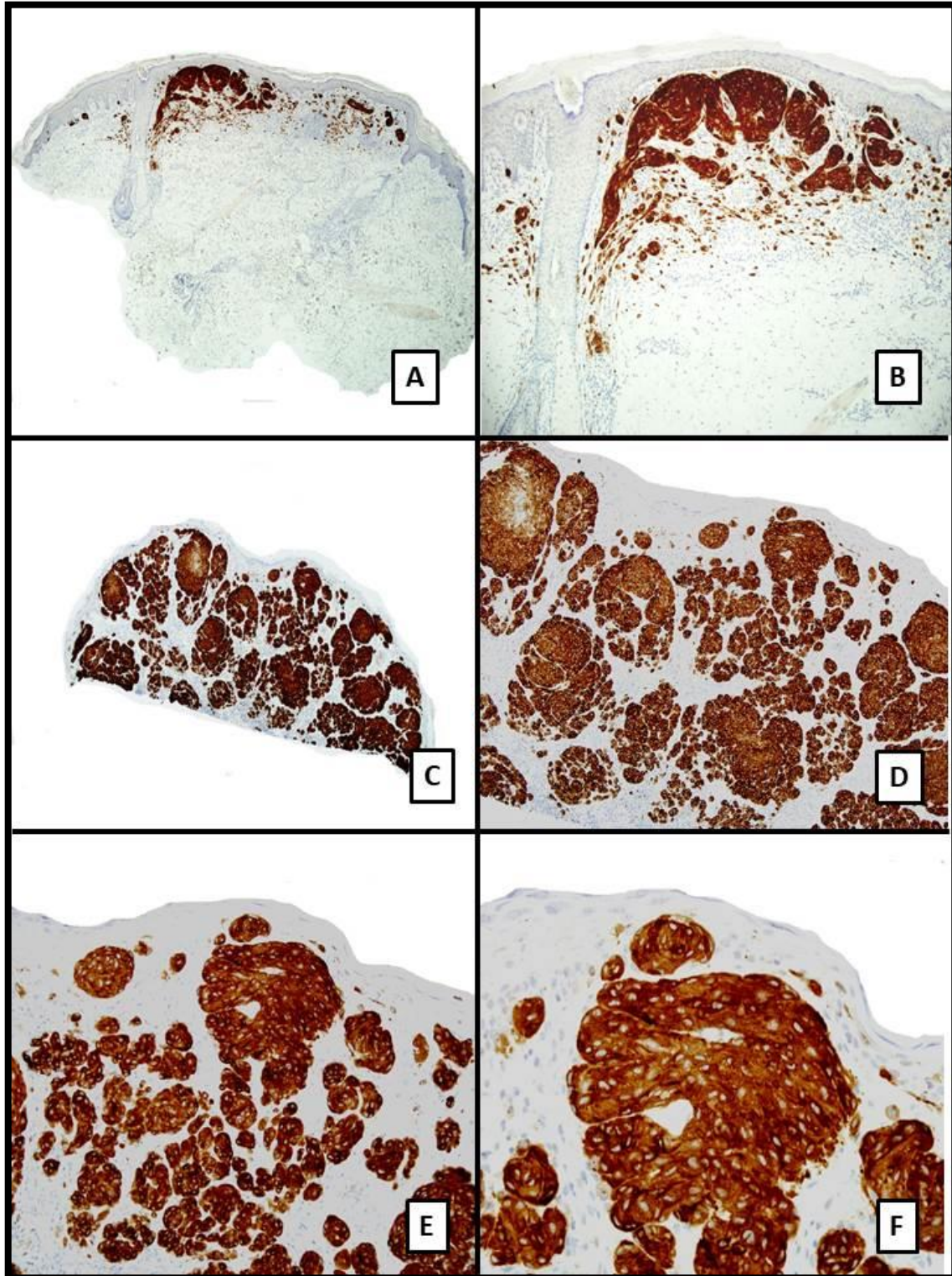


Figura 27 Nevus de Spitz NTRK positivos con inmunohistoquímica.

A-F: Nevus de Spitz en los que se observa positividad intensa, citoplasmática con el anticuerpo NTRK (X12,5; X100; X400; X12,5; X100; X400)

Se utiliza el anticuerpo para BRAF en todos los pacientes objeto de estudio. Los casos con inmunotinción positiva para BRAF se comparan con las variables clínicas consideradas. Las frecuencias de los datos clínicos en cada caso positivo con inmunohistoquímica para BRAF se resumen en la tabla 12.

Tabla 12 Casos positivos con inmunohistoquímica con anticuerpo BRAF

	Total n=160 (%)	BRAF (+) IHQ n (%)	pValor
<i>Edad (años)</i>	34* [19;46]**	42* [31;53]**	0,0027
<i>Diagnóstico</i>			
Nevus de Spitz	71 (44,3%)	4 (10%)	
Tumor de Spitz atípico	26 (16,2%)	4 (10%)	
Melanoma de Spitz	18 (11,2%)	9 (22,5%)	<0,0001
Nevus	21 (13,1%)	16 (40%)	
Melanoma	24 (15%)	7 (17,5%)	
<i>Sexo</i>			
Mujer	91 (56,8%)	24 (60%)	0,6449
Hombre	69 (43,1%)	16 (40%)	
<i>Localización</i>			
Miembros superiores	57 (35,6%)	10 (25%)	
Miembros inferiores	49 (30,6%)	7 (17,5%)	0,0058
Cabeza/Cuello	25 (15,6%)	10 (25%)	
Tórax	22 (13,7%)	9 (22,5%)	
Abdomen	7 (4,3%)	4 (10%)	

*Mediana **Rango intercuartílico (percentil 25 y 75)

Los tumores melanocíticos con expresión inmunohistoquímica positiva en las células neoplásicas con el anticuerpo de BRAF es del 25% (n=40/160) de todos los casos. Con inmunohistoquímica son positivos para BRAF el 40% de los nevos convencionales (n=16), el 22,5% de los melanomas de Spitz (n=9), el 17,5% de los melanomas convencionales (n=7), en el 10% de los nevos de Spitz (n=4) y también en el 10% de los tumores de Spitz atípicos (n=4) ($p<0,0001$).

La mediana de la edad del grupo de pacientes con positividad con la técnica de inmunohistoquímica para BRAF es de 42 años ($p=0,0027$). Los pacientes con tumores melanocíticos con inmunoexpresión de BRAF son predominantemente de sexo femenino ($n=24$; 60%), ($p=0,6449$). La localización más frecuente de los tumores melanocíticos BRAF positivos con inmunohistoquímica es en miembros superiores ($n=10$; 25%) y en cabeza/cuello ($n=10$; 25%), seguido de los tumores localizados en tórax ($n=9$; 22,5%), miembros inferiores ($n=7$; 17,5%) y por último en abdomen ($n=4$; 10%), ($p=0,0058$).

Las características histológicas observadas en los casos BRAF positivos con técnica de inmunohistoquímica se detallan en la tabla 13.

Tabla 13 Características histológicas casos BRAF positivos.

	Total n=160 (%)	BRAF (+) IHQ n(%)	pValor	Tumores de spitz Total n=115 (%)	BRAF (+) IHQ n(%)	pValor
Citología						
<i>Epitelioide</i>	83 (51,8%)	22 (55%)		62 (54%)	15 (88%)	
<i>Fusiforme</i>	49 (30%)	2 (5%)	<0,0001	45 (39%)	2 (11,7%)	0,0084
<i>Redondeada</i>	21 (13,1%)	16 (40%)		8 (7%)	0	
<i>Mixta</i>	8 (5%)	0		0	0	
Polipoide	37 (23,1%)	8 (20%)	0,5883	33 (28,7%)	12 (71%)	0,9436
Pigmentado	72 (45%)	12 (30%)	0,0277	56 (48,70%)	8 (47%)	0,8837
Extensión						
<i>pagetoide</i>	34 (21,2%)	7 (17,5%)	0,5032	24 (20,87%)	5 (29,4%)	0,3478
Componente						
<i>epidérmico</i>	90 (56,2%)	13 (33%)	0,0005	83 (72,17%)	12 (71%)	0,8744
<i>Ulceración</i>	8 (5%)	0	0,0939	2 (1,74%)	0	0,5524
<i>Inflamación</i>	86 (53,7%)	17 (43%)	0,0994	68 (59,13%9)	13 (76%)	0,1152

La morfología citológica más frecuente observada en todos los casos que muestran positividad para BRAF con inmunohistoquímica fue de tipo epitelioide en el 55% ($n=22$) de los casos ($p<0,0001$). Si se valora solamente los tumores de Spitz con inmunoexpresión para BRAF se observa igual predominio de la citología epitelioide en el 88% ($n=15$) de los casos ($p=0,0084$).

La forma polipoide de los tumores melanocíticos BRAF positivos con técnica de inmunohistoquímica se observa en el 20% de los casos ($n=8$) ($p=0,5883$) y si

se toman en cuenta sólo los tumores de Spitz esta característica se observa en el 71% de los casos (n= 12) ($p=0,9436$).

La presencia de pigmentación melánica es evidente en el 30% de los tumores valorados (n=12) ($p=0,0277$), sin embargo esta característica se observó en 8 tumores de Spitz (47%) pero no es un evento estadísticamente significativo ($p=0,9436$).

La extensión pagetoide en los tumores BRAF positivos con inmunohistoquímica se identifica en el 17,5% del total de los casos (n=7) ($p=0,5032$) y en el 29,4% de los tumores de Spitz (n=5) ($p=0,3478$).

La asociación del componente epidérmico en el grupo de tumores que expresan BRAF se observa en el 33% de los casos (n=13) ($p=0,0005$). En los tumores de Spitz está presente en el 71% de los casos (n=12), aunque no es una característica significativa en los tumores de Spitz ($p=0,8744$).

No se identifican casos con presencia de ulceración en su superficie que expresen con inmunohistoquímica BRAF ($p=0,0939$).

La presencia de infiltrado inflamatorio se observa en el 43% de los casos ($p=0,0994$) y en los tumores de Spitz se identifica en el 76% ($p=0,1152$).

Los casos que son positivos con el anticuerpo BRAF muestran una intensidad de tinción variable principalmente a nivel del citoplasma. A continuación se muestran algunos ejemplos de los casos positivos que se obtienen.

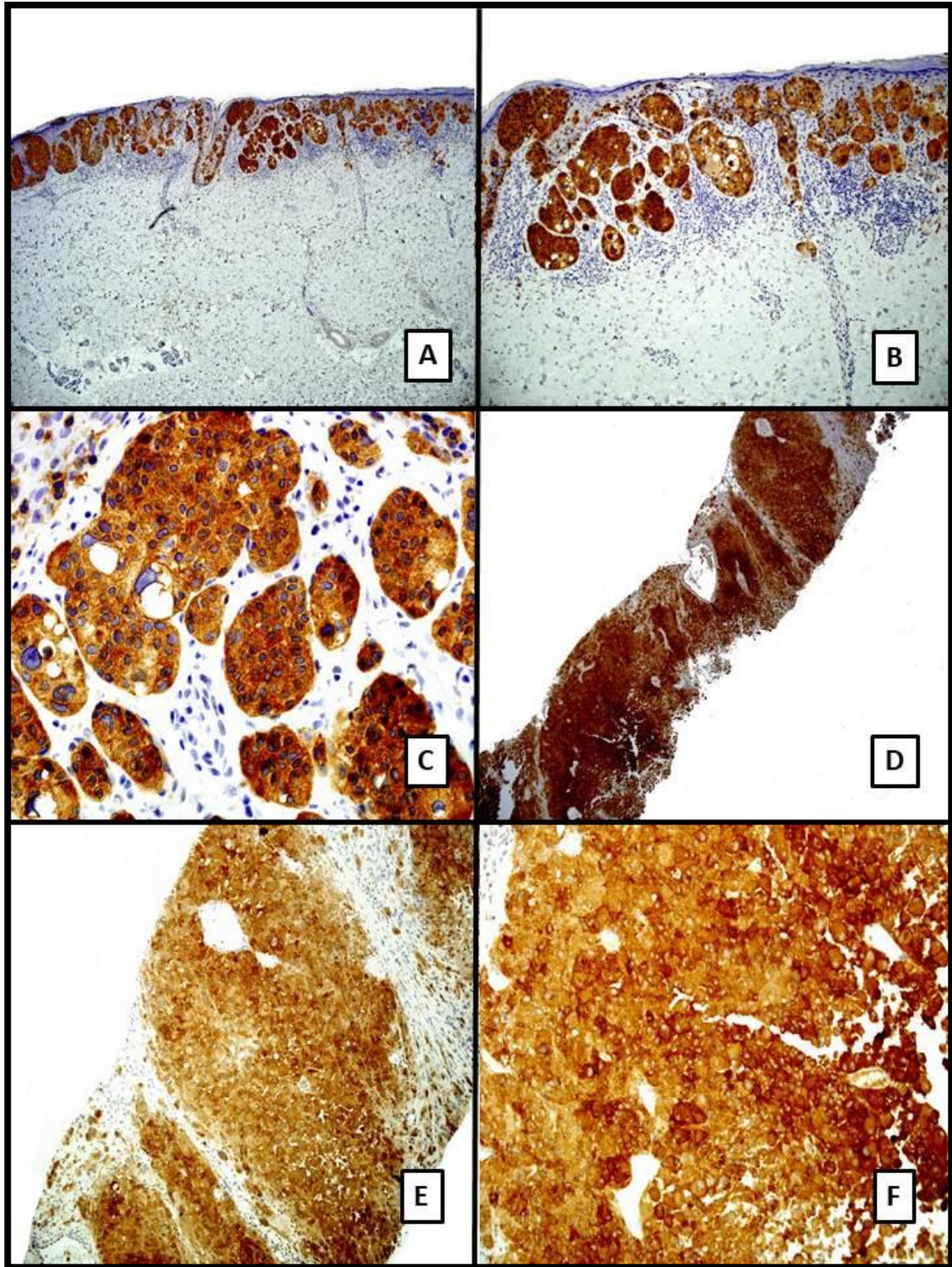


Figura 28 Melanomas BRAF positivo con técnica de inmunohistoquímica

A-F: Melanomas en los que se observa positividad intensa, citoplasmática para BRAF (X12,5; X100; X400; X12,5; X100; X400)

Existen muchos tipos diferentes de mutaciones que pueden conducir a la inactivación de la función de BAP1, lo cual constituye un problema para su detección utilizando técnicas moleculares. Por tanto, el desarrollo de estudios moleculares adecuados es difícil. Actualmente, la técnica de inmunohistoquímica es la mejor opción para la detección de mutaciones de BAP1 cuando se produce inactivación de su función (118).

Con técnica de inmunohistoquímica cuando BAP-1 no está mutado, lo habitual es que la expresión de la tinción, que es predominantemente nuclear, esta conservada. La tinción tiene una intensidad variable. En nuestro estudio se observa conservación de BAP-1 (tinción nuclear positiva con inmunohistoquímica) en el 87,5% de los casos (n=140). Se identifica BAP-1 conservado en 66 nevus de Spitz, en 24 tumores de Spitz atípicos, en 17 melanomas de Spitz, en 18 nevus y en 15 melanomas convencionales. En la figura 29 se puede observar con detalle la distribución de los resultados para BAP-1 conservado.

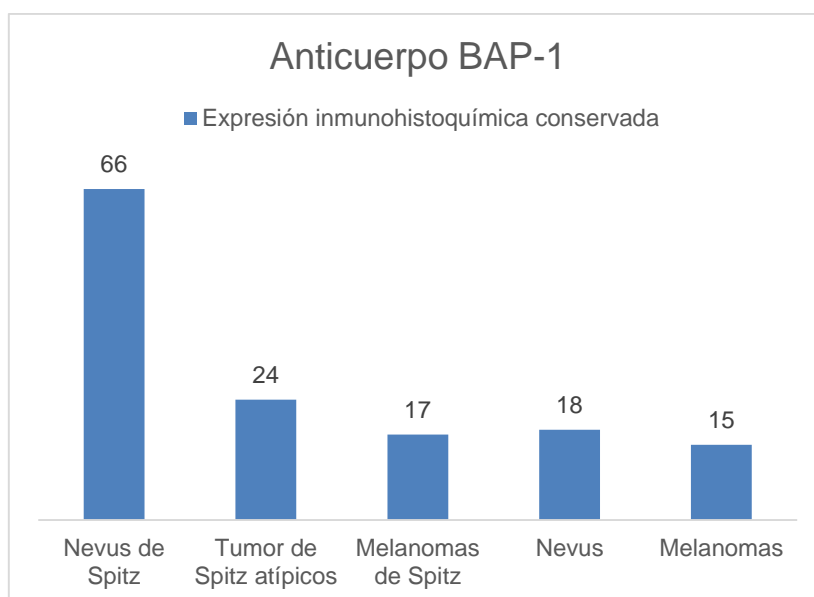


Figura 29 Resultados con el anticuerpo BAP-1

En la figura 21 se observa un ejemplo de un caso que muestra con técnica de inmunohistoquímica conservación de la expresión de BAP-1

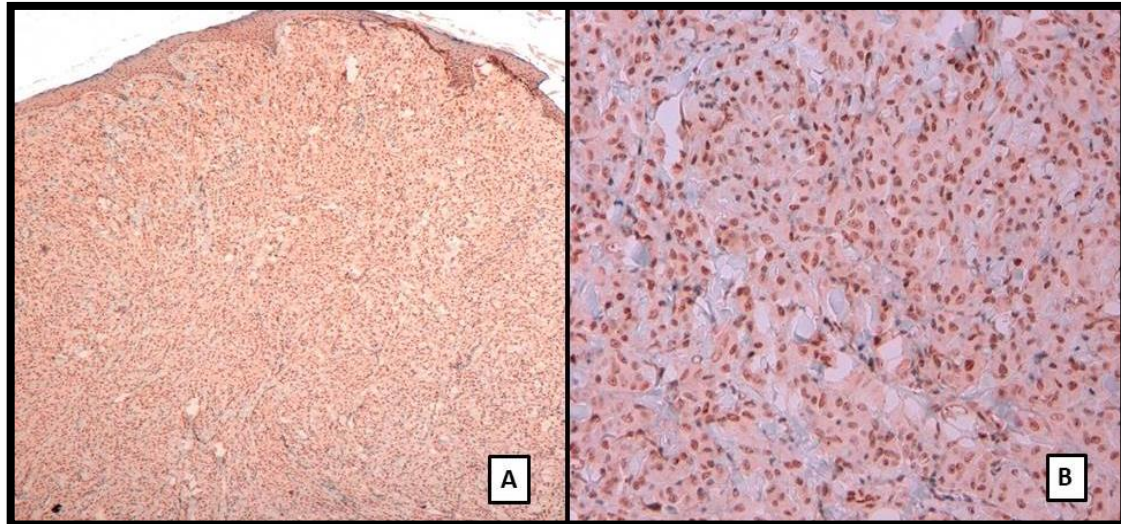


Figura 30 Nevus de Spitz con positividad para BAP-1.

A) Positividad difusa en toda la neoplasia (X50) B) Tinción nuclear positiva (X100)

Cuando se produce mutación de BAP-1 ocurre la inactivación de su función, por lo que con técnica de inmunohistoquímica se pierde la expresión de tinción. En los casos estudiados se observa pérdida de expresión de la tinción nuclear en el 12,5% (n=20) de los tumores, correspondiendo a 5 nevus de Spitz, 2 tumores de Spitz atípicos, 3 nevus (pérdida parcial y heterogénea), y en 9 melanomas de tipo convencional. De los 20 casos con pérdida de expresión de la tinción inmunohistoquímica de BAP-1, solo el 3,7% (n=6) se asoció a mutación de BRAF.

Las características histológicas del grupo de tumores melanocíticos con pérdida de expresión inmunohistoquímica de BAP1 y mutación de BRAF, muestran células neoplásicas con morfología polipoide, con el tumor centrado de forma predominante en la dermis, con células de tipo epitelioides y algunos tumores muestran infiltrado linfocitario periférico asociado. La mayoría de los pacientes de este grupo son de sexo femenino (n=4; 2,5%).

En la figura 31 se observa un ejemplo de un tumor melanocítico con pérdida de expresión inmunohistoquímica de BAP1 y mutación de BRAF.

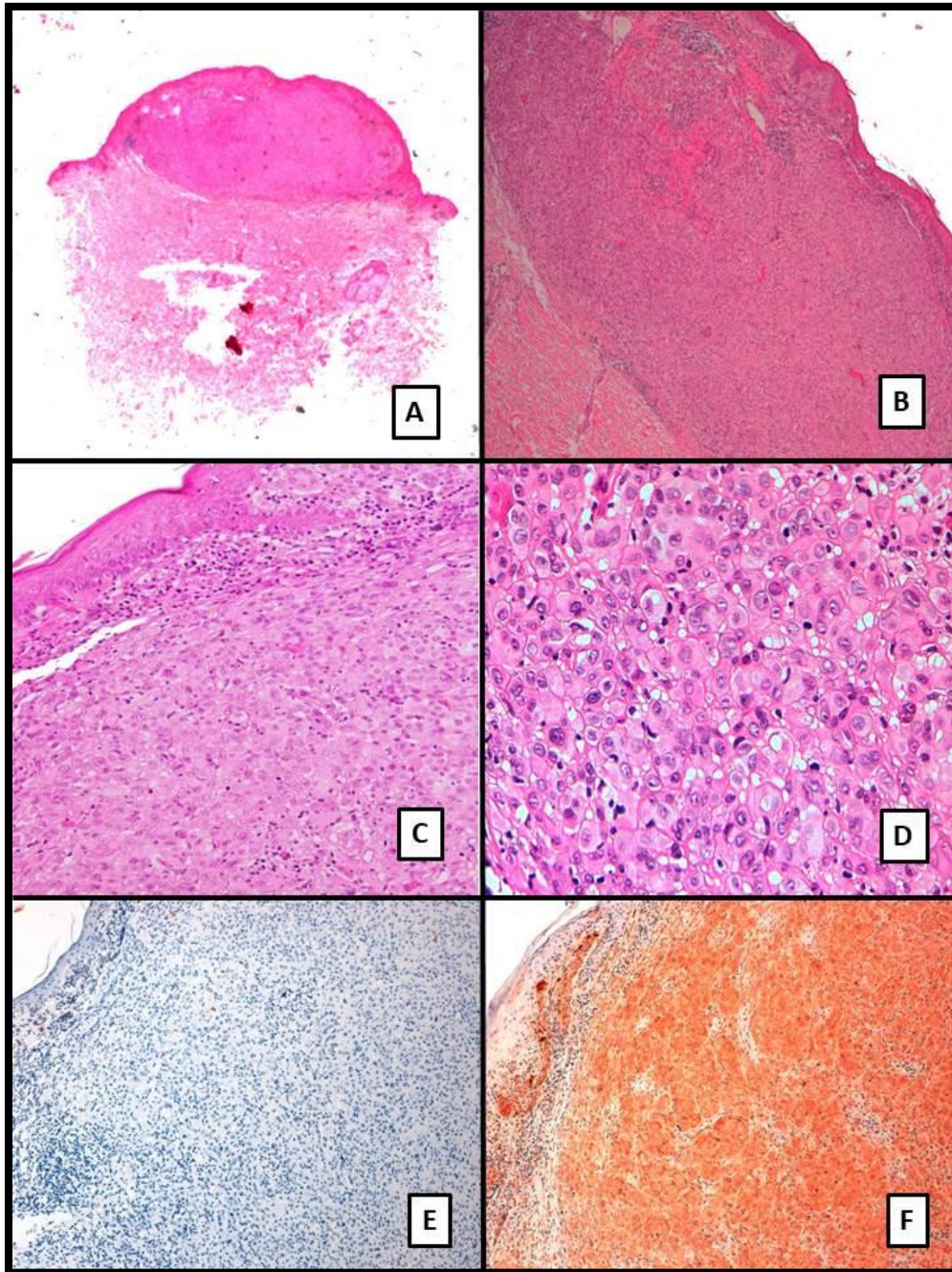


Figura 31 Imagen histológica de un tumor melanocítico con pérdida de expresión inmunohistoquímica de BAP1 y mutación de BRAF.

- A) Imagen panorámica en la que se observa morfología polipoide del tumor (HE) B) El tumor melanocítico está centrado en la dermis (HE-X50), C) y D) Morfología celular epitelioides (X100; X200) E) BAP-1 negativo con técnica de inmunohistoquímica (X100) F) BRAF positivo con inmunohistoquímica (X100)

Se realiza determinación en todas las muestras estudiadas de ROS-1 con técnica inmunohistoquímica. No se observa ningún caso positivo con este anticuerpo en nuestra serie. De la misma forma no se observan casos con inmunotinción positiva para MET y RET.

A modo de resumen, en la figura 32 se sintetiza la frecuencia de positividad de cada determinación realizada con los anticuerpos estudiados en todos los tumores melanocíticos de toda la muestra y en el grupo de los tumores de Spitz con los anticuerpos BAP-1, BRAF, ALK, NTRK, MET, RET, ROS-1.

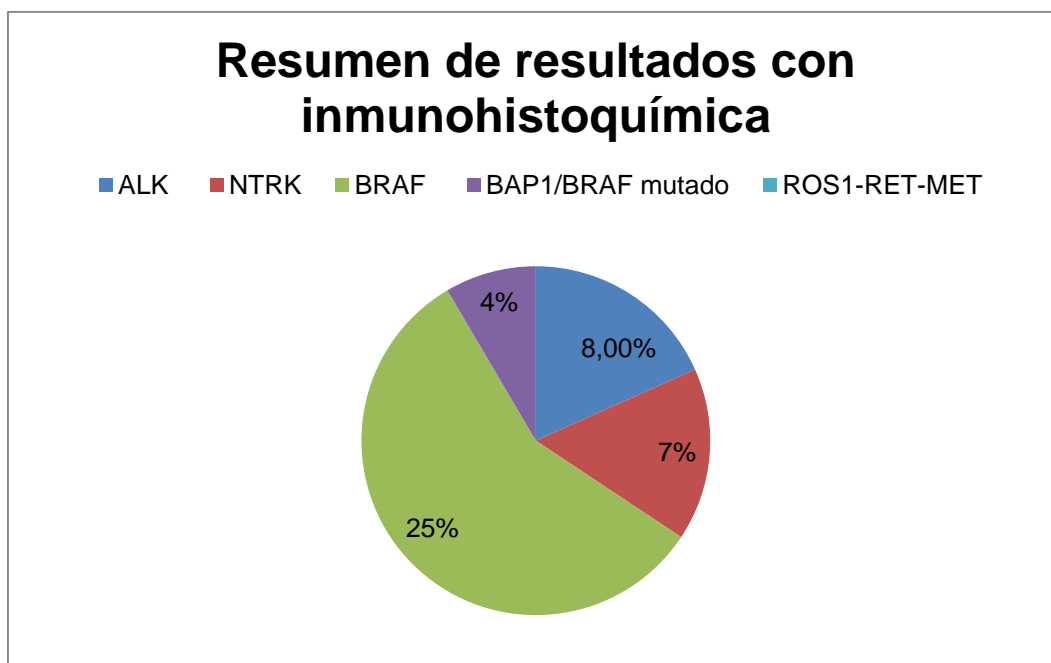


Figura 32 Relación de resultados de las determinaciones realizadas con técnica de inmunohistoquímica

Asociación del estado mutacional de los tumores melanocíticos con las características clínicas y fenotípicas histológicas

Para poder determinar si existe una verdadera asociación en los tumores melanocíticos entre los hallazgos fenotípicos de las características histológicas encontradas con las mutaciones que alberga cada tipo de tumor, se realiza primero un análisis univariado, cuyos resultados se resumen en la tabla 14.

Varios resultados del análisis univariado demuestran resultados estadísticamente significativos. Para interpretar estos resultados se debe tomar en cuenta que la mayoría de las variables son cualitativas dicotómicas o politómicas, por lo que los OR reflejan el aumento de las probabilidades de que un evento ocurra por unidad de incremento con respecto a la variable de referencia. Para las variables continuas como la edad, el OR que se muestra es el OR promedio por unidad de incremento. A continuación se describirán los resultados más significativos.

Los casos con translocación de ALK tras la realización de la regresión logística univariante, se puede observar que los resultados significativos corresponden a los casos con diagnóstico de tumor de Spitz atípico con translocación de ALK que tiene un OR de 3,99 (IC 1,19-13,31) ($p=0,0243$). La valoración del aspecto microscópico polipoide del tumor melanocítico muestra un OR de 4,55 (1,42-14,54) ($p=0,0106$).

Los resultados obtenidos para la presencia de pigmentación en los tumores melanocíticos al ser el OR menor a 1, se interpreta que si el tumor ésta pigmentado tiene una baja probabilidad estadística de asociarse a la translocación de ALK, en este caso el OR es de 0,20 (0,04-0,93) ($p=0,0407$). Lo mismo ocurre con la presencia de inflamación, ya que si el tumor tiene infiltrado inflamatorio asociado tiene una baja probabilidad de albergar translocación de ALK, en este caso corresponde a un OR de 0,23 (0,06-0,88) ($p=0,0311$).

En los casos con translocación de NTRK si se aumenta la edad en una unidad y todos los valores de las otras variables del modelo permanecen

constantes, los odds para albergar la translocación de NTRK es de 0,96 (0,92-0,99) ($p=0,041$). Si el tumor melanocítico corresponde a un tumor de Spitz atípico el OR es de 6,17 (1,63-23,33) de estar asociado a la translocación de NTRK ($p=0,007$). Por último si el tumor muestra una citología mixta, que recordemos que se considera mixta cuando el tumor tiene zonas con células epitelioides y otras fusiformes, el OR es de 19,75 (3,56-109,38) para asociarse a la translocación de NTRK ($p=0,0006$).

Para los casos con mutación de BRAF si se aumenta la edad en una unidad y todos los valores de las otras variables del modelo permanecen constantes, los odds para albergar la mutación de BRAF es de 1,02 (1,01-1,04) ($p=0,0097$). En relación al diagnóstico histológico, si un tumor melanocítico corresponde a un nevus convencional el OR es de 53,59 (12,91-222,49) de estar asociado a mutación de BRAF ($p<0,0001$), seguido del diagnóstico de melanoma de Spitz con un OR de 16,75 (4,27-66,78) ($p<0,0001$) y por último el diagnóstico de melanoma convencional con un OR de 6,89 (1,81-26,31) ($p=0,0047$).

Cuando se toma en cuenta la localización anatómica de la lesión melanocítica si ésta se encuentra en el abdomen el OR es de 6,27 (1,21-32,47) de albergar mutación de BRAF ($p=0,0288$), seguido del tórax con un OR de 3,25 (1,09-9,68) ($p=0,0339$) y por último en cabeza y cuello con un OR de 3,13 (1,09-8,97) ($p=0,0333$).

En relación a la morfología citológica, si la celularidad es de tipo redondeada el OR es de 8,87 (2,91-27,09) de tener mutación de BRAF ($p=0,0001$) y si la morfología es fusiforme es poco probable que albergue mutación de BRAF ya que el OR es menor a 1; siendo de 0,12 (0,03-0,54) ($p=0,0056$). Si el tumor melanocítico es pigmentado tiene baja probabilidad de asociarse a una mutación de BRAF ya que el OR es de 0,43 (0,19-0,92) ($p=0,0300$). Por último la presencia de componente epidérmico también es una característica histológica que si está presente es poco probable que se asocie a mutación de BRAF con un OR 0,27 (0,13-0,58) ($p=0,0007$).

Tabla 14 Resumen de las características clínicas e histológicas en relación a las mutaciones de los tumores melanocíticos

		ALK translocación		NTRK translocación		BRAF mutación	
Variable	Categoría	OR (IC 95%)	p-valor	OR (IC 95%)	p-valor	OR (IC 95%)	p-valor
Edad	-	0.98 (0.95-1.01)	0.2281	0.96 (0.92-0.99)	0.041	1.02 (1.01-1.04)	0.0097
Sexo	Masculino	1 (ref)					
	Femenino	1.23 (0.39-3.95)	0.7236	0.90 (0.26-3.09)	0.8716	1.19 (0.57-2.46)	0.6451
Dx	NS	1 (ref)					
	NSA	3.99 (1.19-13.31)	0.0243	6.17 (1.63-23.33)	0.007	3.05 (0.70-13.21)	0.1369
	MS	-		-		16.75 (4.27-66.78)	<0.0001
	N	-		-		53.59 (12.91-222.4)	<0.0001
	M	-		-		6.89 (1.81-26.31)	0.0047
Localización	Miembro superior	1 (ref)					
	Miembro inferior	1.60 (0.34-7.52)	0.5519	0.92 (0.23-3.65)	0.9108	0.78 (0.27-2.24)	0.6491
	Cabeza/cuello	4.50 (0.98-20.59)	0.0525	-		3.13 (1.09-8.97)	0.0333
	Tórax	0.86 (0.08-8.71)	0.8963	1.04 (0.19-5.80)	0.9643	3.25 (1.09-9.68)	0.0339
	Abdomen					6.27 (1.21-32.47)	0.0288
Citología	Epitelioide	1 (ref)					
	Fusiforme	3.37 (0.93-12.19)	0.0638	1.32 (0.28-6.15)	0.7264	0.12 (0.03-0.54)	0.0056
	Redondeada	-		-		8.87 (2.91-27.09)	0.0001
	Mixto	6.58 (0.99-43.55)	0.0506	19.750 (3.56-109.38)	0.0006	-	
Polipoide	No	1 (ref)					
	Si	4.55 (1.42-14.54)	0.0106	3.05 (0.87-10.63)	0.0805	0.79 (0.33-1.89)	0.5889
Pigmentado	No	1 (ref)					
	Si	0.20 (0.04-0.93)	0.0407	1.02 (0.29-3.49)	0.9749	0.43 (0.19-0.92)	0.0300
Extensión pagetoide	No	1 (ref)					
	Si	0.28 (0.04-2.29)	0.2399	2.27 (0.62-8.25)	0.2145	0.73 (0.29-1.84)	0.5044
Componente epidérmico	No	1 (ref)					
	Si	0.32 (0.09-1.07)	0.0642	3.78 (0.79-18.08)	0.0962	0.27 (0.13-0.58)	0.0007
Ulceración	No	1 (ref)					
	Si	<0.001 (<0.001->999.9)	0.9810	<0.001 (<0.001->999.99)	0.9736	<0.001 (<0.001->999.99)	0.9790
Inflamación	No	1 (ref)					
	Si	0.23 (0.06-0.88)	0.0311	4.21 (0.88-20.14)	0.0720	0.55 (0.27-1.13)	0.1017

Debido a los hallazgos significativos del modelo univariante, se realiza un modelo de regresión logística multivariante con las variables que tienen mayor

significación estadística, considerando aquellas con una $p < 0,15$ y partiendo de esas variables más significativas se ajusta el modelo.

En el modelo multivariante las características que finalmente demostraron mayor fuerza de asociación estadística con la translocación de ALK, es el diagnóstico de tumor de Spitz atípico con un OR de 4,20 (1,14-15,53), con un error estándar de 0,6669 ($p=0,0313$) y si la neoplasia no tiene componente epidérmico ésta lesión se asocia con mayor probabilidad a tener una translocación de ALK con un OR de 7,69 (1,96-25) con un error estándar 0,6790 ($p=0,0031$). Ver tabla 15.

Tabla 15 Tabla resumen de características histológicas asociadas a la translocación de ALK con modelo multivariado.

		ALK Translocación			
		OR (IC 95%)	ES	Chi ²	p-valor
Diagnóstico	TSA	4.20 (1.14-15.53)	0.6669	4.6343	0.0313
Componente epidérmico	no	7,69 (1,96-25)	0.6790	8.7645	0.0031

Con respecto a las variables que mostraron mayor asociación con la translocación de NTRK fueron el diagnóstico de tumor de Spitz atípico con un OR de 8,76 (1,79-42,66), con un error estándar de 0,8079 ($p=0,0072$). Además la citología de tipo mixto (con células fusiformes y epitelioides en la neoplasia) tiene un OR de 39,40 (2,69-576,7) para albergar la translocación de NTRK con un error estándar de 1,3691 ($p=0,0073$), seguido de la morfología fusiforme con un OR es de 8,76 (1,79-42,67) con un error estándar de 0,8662 ($p=0,8831$). Al ajustar el modelo, la presencia de inflamación tiene un OR de 12,29 (1,26-119,68) con un error estándar de 1,1611 ($p=0,0307$). Ver tabla 16.

Tabla 16 Tabla resumen de características histológicas asociadas a la translocación de NTRK con modelo multivariado.

		NTRK translocación			
		OR (IC 95%)	ES	Chi²	p-valor
Diagnóstico	NSA	8.76 (1.79-42.66)	0.8079	7.2151	0.0072
Citología	fusiforme	8.76 (1.79-42.67)	0.8662	0.0216	0.8831
	mixto	39.40 (2.69-576.7)	1.3691	7.2003	0.0073
Inflamación	si	12.29 (1.26-119.68)	1.1611	4.6692	0.0307

Por último el modelo multivariado ajustado para la mutación de BRAF se identifica que el diagnóstico histológico que con mayor probabilidad se asocia a la mutación de BRAF es el diagnóstico de nevus convencional con un OR de 29,51 (6,92-125,79) con un error estándar de 0,7398 ($p < 0,0001$), seguido del diagnóstico de melanoma de Spitz con un OR de 13,38 (3,23-55,47) con un error estándar de 0,7256 ($p = 0,0004$), luego le sigue el diagnóstico de melanoma convencional con un OR de 4,42 (1,12-17,37) con un error estándar de 0,6988 ($p = 0,0336$) y por último con el diagnóstico de tumor de Spitz atípico con un OR de 3,63 (0,79-16,76), con un error estándar de 0,7804 ($p = 0,0985$). En relación a las características citológicas si la neoplasia tiene una citológica epitelioides el tumor se asocia con mayor probabilidad a tener mutación de BRAF con un OR de 6,71 (1,38-33,3) ($p = 0,0177$). Ver tabla 17.

Tabla 17 Tabla resumen de características histológicas asociadas a la mutación de BRAF con modelo multivariado.

		BRAF mutación			
		OR (IC 95%)	ES	Chi ²	p-valor
Diagnóstico	TSA	3.63 (0.79-16.76)	0.7804	2.7290	0.0985
	MS	13.38 (3.23-55.47)	0.7256	12.7784	0.0004
	N	29.51 (6.92-125.79)	0.7398	20.9298	<0.0001
	M	4.42 (1.12-17.37)	0.6988	4.5165	0.0336
Citología	Epitelioide	6,71 (1,38-33,3)	0.8022	5.6235	0.0177

Por último en la tabla 18 se muestra la asociación de probabilidades observadas y respuestas observadas en cada una de las alteraciones moleculares incluidas en el modelo de regresión logística. Se quiere destacar los valores de “C”, donde nos indica el área bajo la curva del modelo, esta va de 0 a 1. Cuanto más cercano sea ese valor a 1 mejor discrimina el modelo. A partir de un área de 0,7 la discriminación del modelo se considera aceptable (Igual que en pruebas diagnósticas y curvas ROC).

Tabla 18 Asociación de probabilidades pronosticadas y respuestas observadas en el modelo de regresión logística.

Asociación de probabilidades pronosticadas y respuestas observadas			
	ALK	NTRK	BRAF
Concordancia (%)	69.0	81.5	81.2
Discordancia (%)	11.5	11.0	10.1
Vinculación (%)	19.4	7.5	8.7
Apareamientos	1092	946	4480
Somers' D	0.575	0.705	0.711
Gamma	0.714	0.762	0.778
Tau-a	0.135	0.143	0.277
c	0.788	0.853	0.855

HRAS

Para la valoración de HRAS se utiliza la técnica de hibridación in situ con fluorescencia (FISH), para detectar alteraciones del gen presente en el brazo corto del cromosoma 11. Solo se emplea la técnica de FISH para la determinación de HRAS, ya que no se dispone del anticuerpo como método de comparación.

La sonda de HRAS permite identificar la amplificación del gen. Se observa amplificación en el 1.8% (n=3) de los casos estudiados. Los casos corresponden: a un nevus de Spitz, a un tumor de Spitz atípico y un melanoma convencional.

En la Figura 33 se observa señalado con flechas las células que muestra amplificación para HRAS.

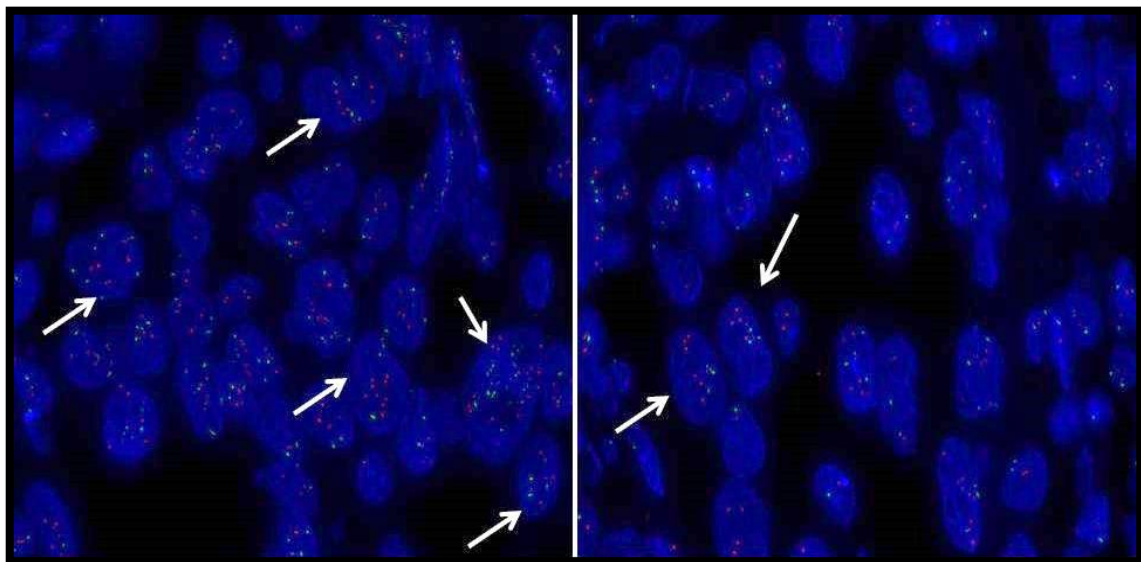


Figura 33 Tumores de Spitz con amplificación de HRAS

A. Nevus de Spitz B. Tumor de Spitz atípico, ambos con amplificación para HRAS

ALK

Para estudiar la presencia de translocación del gen ALK con técnica de FISH se utiliza una sonda “break apart”. En nuestra serie se identifica translocación de ALK con FISH en el 7.5% de los casos (n=12), de los cuales el 3.7% (n=6) corresponden a nevus de Spitz y el otro 3.7% (n=6) a tumores de Spitz atípicos.

En la figura 34 se observan ejemplos de los casos con translocación para ALK. Se señala con flechas las células que muestran la presencia de la translocación.

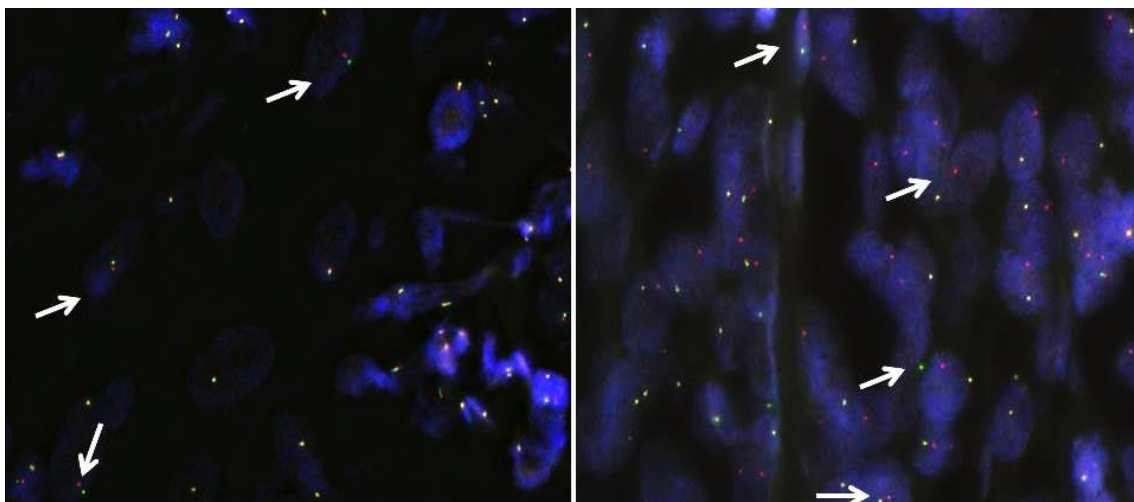


Figura 34 Tumores de Spitz con translocación de ALK

A) Nevus de Spitz y B) Tumor de Spitz atípico con translocación para ALK con FISH, sonda “break apart” (flecha).

NTRK

La valoración de NTRK con técnica de FISH se realiza con una sonda “break apart”, para valorar la presencia de translocación del gen. En las muestras estudiadas el 6,8% de los tumores (n=11) muestran translocación en dicho gen. De los casos con translocación de NTRK, el 5% (n=8) corresponden a tumores de Spitz atípicos y el 1,81% (n=3) a nevus de Spitz.

En la figura 35 se observan algunas imágenes de los casos obtenidos.

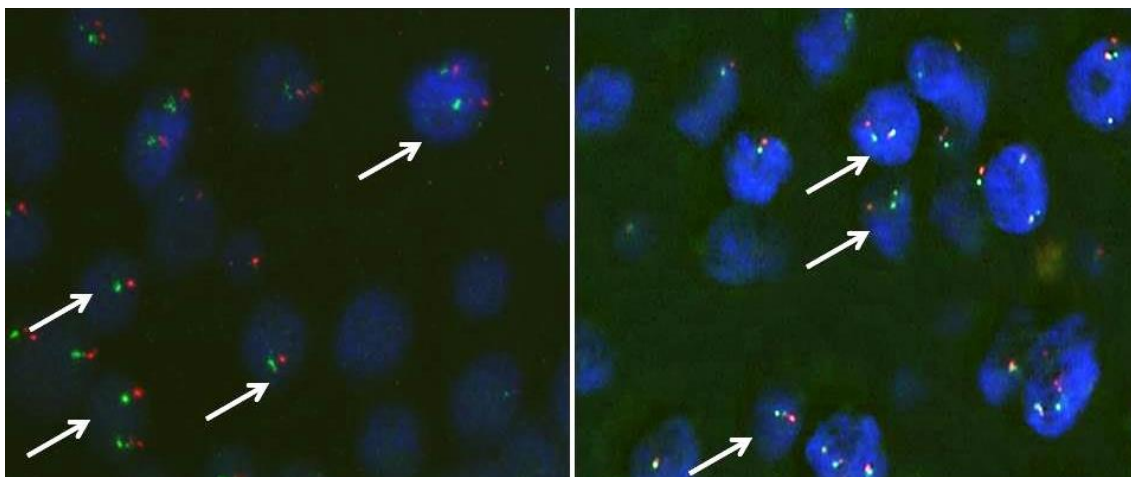


Figura 35 Tumores de Spitz con translocación de NTRK

A) Nevus de Spitz y B) Tumor de Spitz atípico con translocación para NTRK con FISH sonda “break apart” (flecha).

BRAF

Para la determinación de BRAF se utiliza en la mayoría de los casos la técnica de PCR con Cobas® y en otros el método Sanger. En nuestra serie se identifica mutación de BRAF en un 21,25% (n=34) de los casos. De los tumores en los que se identifica mutación de BRAF, el 8,7% (n=14) corresponden a nevos convencionales y el 4,3% (n=7) a melanomas convencionales. En los tumores de Spitz se observa que el 5,6% (n=9) de los casos de melanomas de Spitz, en el 1,8% (n=3) a tumores de Spitz atípicos y en el 0,6% (n=1) nevus de Spitz. En la figura 36 se observa una imagen de como se identifica un caso mutado para BRAF usando secuenciación Sanger (señalado con una flecha).

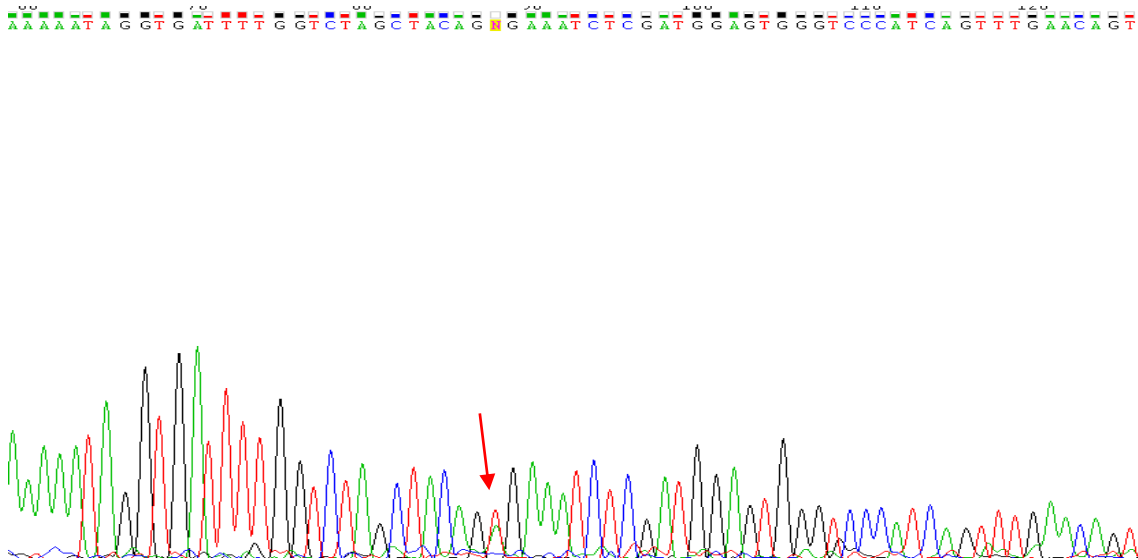


Figura 36 Melanoma con mutación V600E de BRAF, mediante técnica de PCR

MET, RET y ROS1

En las determinaciones con técnica de FISH para MET, RET y ROS1 no se identifica ningún caso con translocación o amplificación en el caso de MET.

En la figura 37 se resumen los casos que mostraron alteraciones mediante FISH y PCR.

Resumen de resultados con FISH y PCR

■ HRAS ■ ALK ■ NTRK ■ BRAF ■ MET-RET-ROS1

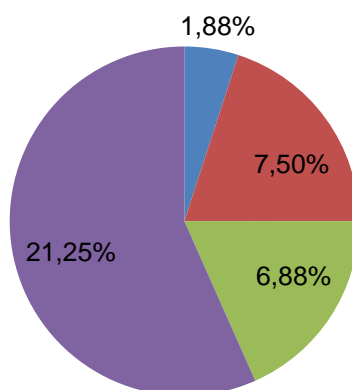


Figura 37 Resultados de técnicas moleculares y FISH en la totalidad de la muestra.

Comparación de resultados con técnicas de inmunohistoquímica con las técnicas de FISH y PCR.

En los tumores de Spitz, tras la obtención de los resultados con técnicas de inmunohistoquímica, FISH y PCR, se comparan los hallazgos para ver las diferencias de resultados entre las pruebas. Debido a que sólo se obtuvieron resultados con dos técnicas para las determinaciones de ALK, NTRK y BRAF serán las que se utilizarán para la comparación. Las determinaciones de MET, RET y ROS-1 se excluyen del análisis porque no se detectan casos con alteraciones para estos genes en nuestro estudio. Con respecto a HRAS y BAP-1 también se excluyen ya que sólo se usó FISH e inmunohistoquímica, respectivamente.

En los nevos de Spitz estudiados (n=71), se obtuvo positividad para ALK con técnica de inmunohistoquímica y también se identifica con técnica de FISH la presencia de translocación en el 7% de los casos (n=5).

En uno de los nevos de Spitz se identifica la translocación de ALK con FISH, pero no se observa inmunorreactividad con técnica de inmunohistoquímica.

En un caso se identifica positividad solo con inmunohistoquímica pero no se demuestra la translocación con técnica de FISH.

En la tabla 19 se resumen los resultados para ALK con inmunohistoquímica y técnica de FISH.

Tabla 19 Comparación de ALK con inmunohistoquímica y FISH en los nevos de Spitz.

Nevus de Spitz n=71							
ALK con FISH							
ALK IHQ		Positivo		Negativo		Total	
	Positivo	5	7,1%	1	1,4%	6	8,5%
	Negativo	1	1,4%	64	90,1%	65	91,5%
Total	6	8,5%	65	91,5%	71	100%	

En los tumores de Spitz atípicos, un 23% (n=6) de los casos muestran positividad con técnica de inmunohistoquímica y se identifica además la translocación de ALK con FISH. Sólo un caso es positivo con inmunohistoquímica pero no se observa translocación de ALK con FISH. Los datos se resumen en la tabla 20.

Tabla 20 Comparación de ALK con inmunohistoquímica y FISH en los tumores de Spitz atípicos.

Tumor de Spitz atípico n=26							
ALK con FISH							
ALK IHQ		Positivo		Negativo		Total	
	Positivo	6	23%	1	3,85%	7	26,92%
	Negativo	0	0	19	73,07%	19	73,07%
Total	6	23%	20	76,9%	26	100%	

En ningún melanoma de Spitz (n=18) se identifica translocación de ALK con ninguna de las dos técnicas (IHQ y FISH). En la tabla 21 se resumen la totalidad de los resultados para ALK.

Tabla 21 Totalidad de resultados de tumores de Spitz para determinación de ALK

Tumores de Spitz n=115							
ALK con FISH							
ALK IHQ		Positivo		Negativo		Total	
	Positivo	11	9,5%	2	1,7%	13	11,3%
	Negativo	1	0,8%	101	87,8%	102	97,14%
Total	12	10,4%	103	89,5%	115	100%	

Por último se calcula el coeficiente Kappa de Cohen que es una medida de concordancia, que se basa en comparar la correlación observada en un conjunto de datos, respecto a la que podría ocurrir por azar. Si el coeficiente Kappa es cercano al 1 la concordancia de las pruebas es adecuada. En el caso de las determinaciones de ALK con inmunohistoquímica y FISH tiene un coeficiente Kappa de 0,8654. Ver tabla 22.

Tabla 22 Coeficiente Kappa de Cohen para pruebas para determinación de ALK

Coeficiente simple Kappa para ALK	
Kappa	0.8654
ASE	0.0762
95% Límite inferior	0.7100
95% Límite superior	1.0000

NTRK

La determinación de la translocación de NTRK en los nevus de Spitz (n=71), es positiva con técnica de inmunohistoquímica y con FISH en el 4,2% de los casos (n=3). En un solo caso se identifica inmunorreactividad con técnica de inmunohistoquímica para NTRK. Los detalles de los resultados de ambas técnicas se resumen en la tabla 23.

Tabla 23 Comparación de NTRK con inmunohistoquímica y FISH en los nevus de Spitz.

Nevus de Spitz n=71							
NTRK con FISH							
NTRK IHQ		Positivo		Negativo		Total	
		Positivo	3	4,2%	1	1,4%	4
	Negativo	0	0	67	94,3%	67	94,3%
	Total	3	4,2%	68	96%	71	100%

En cuanto a los tumores de Spitz atípicos se observa positividad con inmunohistoquímica para NTRK y también la presencia de la translocación con técnica de FISH en el 26,9% (n=7).

En un caso se identifica translocación de NTRK en el FISH y no se observa positividad de tinción con la técnica de inmunohistoquímica. Ver tabla 24.

Tabla 24 Comparación de NTRK con inmunohistoquímica y FISH en los tumores de Spitz atípicos.

Tumor de Spitz atípico n=26							
NTRK con FISH							
NTRK IHQ		Positivo		Negativo		Total	
	Positivo	7	26,9%	0	0	7	26,9%
	Negativo	1	3,8%	18	69,2%	19	73,07%
	Total	8	30,7%	18	69,2%	26	100%

En los melanomas de Spitz (n=18) no se observa translocación de NTRK con ninguna de las dos pruebas (IHQ y FISH).

En la tabla 25 se puede ver un resumen de los resultados obtenidos para NTRK con las técnicas de FISH y PCR.

Tabla 25 Totalidad de resultados de tumores de Spitz para determinación de NTRK

Tumores de Spitz n=115							
NTRK con FISH							
NTRK IHQ		Positivo		Negativo		Total	
	Positivo	10	8,69%	1	0,86%	11	9,5%
	Negativo	1	0,86%	103	89,56%	104	90,4%
	Total	11	9,5%	104	90,4%	115	100%

Se calcula el coeficiente Kappa de Cohen en el caso de las determinaciones de NTRK con inmunohistoquímica y FISH tiene un coeficiente Kappa de 0,8995, siendo adecuada la concordancia. Ver tabla 26.

Tabla 26 Coeficiente Kappa de Cohen para pruebas para determinación de NTRK

Coeficiente simple Kappa para NTRK	
Kappa	0.8995
ASE	0.0702
95% Límite inferior	0.7618
95% Límite superior	1.0000

BRAF

La determinación para BRAF se realiza con PCR y con técnica de inmunohistoquímica. Los nevos de Spitz (n=71), son positivos con técnica de inmunohistoquímica y se detecta la mutación de BRAF con PCR en el 1,4% de los casos (n=1). Sin embargo, en 3 casos se observa positividad con inmunohistoquímica y pero no se detecta mutación al realizar PCR. Ver tabla 27.

Tabla 27 Comparación de BRAF con inmunohistoquímica y PCR en los nevos de Spitz.

Nevus de Spitz n=71							
BRAF PCR							
BRAF	IHQ	Positivo		Negativo		Total	
		Positivo	1	1,4%	3	4,2%	4
Negativo	0	0	67	94,3%	67	94,3%	
Total	1	1,4%	70	98,5%	71	100%	

En los tumores de Spitz atípicos se identifica en el 11,5% (n=3) la presencia de mutación de BRAF con PCR y también inmunoreactividad con técnica de inmunohistoquímica. Sólo un caso fue positivo con inmunohistoquímica pero no se detecta mutación de BRAF con PCR. Ver Tabla 28.

Tabla 28 Comparación de BRAF con inmunohistoquímica y PCR en los tumores de Spitz atípicos.

Tumor de Spitz atípico n=26							
BRAF PCR							
BRAF	IHQ	Positivo		Negativo		Total	
		Positivo	3	11,5%	1	3,8%	4
Negativo	0	0	22	84,6%	22	84,6%	
Total	3	11,5%	23	88,4%	26	100%	

En los melanomas de Spitz n=18, la mitad de los casos (n=9), son positivos para BRAF con inmunohistoquímica y también se identifica con PCR la mutación de BRAF. En el otro 50% de melanomas de Spitz (n=9) no se identifica mutación de BRAF con inmunohistoquímica ni PCR. Ver tabla 29.

Tabla 29 Totalidad de resultados de tumores de Spitz para determinación de BRAF

Tumores de Spitz n=115							
BRAF PCR							
BRAF IHQ		Positivo		Negativo		Total	
		Positivo	13	11,3%	4	3,47%	17
	Negativo	0	0	98	85,21%	98	85,21%
	Total	13	11,3%	102	88,68%	115	100%

Se calcula el coeficiente Kappa de Cohen en el caso de las determinaciones de BRAF con inmunohistoquímica y PCR tiene un coeficiente Kappa de 0,8471, siendo adecuada la concordancia. Ver tabla 30.

Tabla 30 Coeficiente Kappa de Cohen para pruebas para determinación de BRAF

Coeficiente simple Kappa para BRAF	
Kappa	0.8471
ASE	0.0742
95% Límite inferior	0.7016
95% Límite superior	0.9926

Con los resultados obtenidos intentamos refinar la clasificación morfológica de las lesiones melanocíticas, lo que podría ser de utilidad para formar subgrupos que son genéticamente homogéneos y poder “predecir” el comportamiento clínico y molecular de dichas lesiones.

Se realiza un algoritmo basándonos en los resultados del modelo ajustado del análisis multivariante, en el que se presenta cada variable con su magnitud de presentar el desenlace clínico. En la figura 38 se puede observar como partimos de la presencia de un paciente con una lesión melanocítica, la cual debe ser reseada y estudiada a nivel histológico. En la valoración histológica se debe de tomar en cuenta si la neoplasia tiene características de tumor de Spitz y posteriormente hay que determinar si tiene criterios histológicos de malignidad (como por ejemplo si el tumor es asimétrico, si tiene atipia citológica, mitosis sobretodo en áreas profundas, entre otros).

Si el tumor melanocítico tiene características de un tumor de Spitz y criterios de malignidad suficientes, recomendamos identificar a nivel histológico si tiene citología de morfología epitelioides (OR 6,71; $p=0,0177$) ya que es probable que el tumor albergue una mutación de BRAF en el caso de los melanomas de Spitz (OR: 13,38, $p=0,0004$) y el paciente pueda ser candidato a tratamientos específicos como es el caso de Vemurafenib. Si el tumor está constituido por una citología diferente a la epitelioides, se debe tomar en cuenta otras determinaciones moleculares como ALK, NTRK, ROS-1, HRAS, MET, RET.

En el caso de que el tumor no cumpla criterios diagnósticos de un melanoma de Spitz, se debe considerar que no esté asociado a nivel microscópico con presencia de componente epidérmico (OR 4,20, $p=0,031$), ya que puede tener una translocación de ALK en el caso de tratarse de un tumor de Spitz atípico (OR 4,20, $p=0,031$), el cual si el paciente tiene criterios clínicos de mal pronóstico podría ser candidato a tratamiento con Crizotinib. Por otra parte en los tumores de Spitz atípicos, no puede descartarse la posible mutación para BRAF (OR: 3,63, $p=0,0985$) y BAP-1.

Cuando un tumor melanocítico tiene criterios de malignidad pero tampoco suficientes para clasificarse como un melanoma pero con características de tumor de Spitz atípico podría estar asociado a translocación de NTRK (*OR* 8,76, $p=0,0072$), además hay que considerar las características citológicas como células de hábito fusiforme y epitelioides (morfología mixta) en el tumor (*OR* 39,40, $p=0,0073$). También la presencia de infiltrado inflamatorio puede estar asociado a translocación de NTRK (*OR* 12,23, $p=0,0307$). En el caso de que un paciente con un tumor de Spitz atípico con criterios clínicos de mal pronóstico podría ser candidato a tratamiento con Entrectenib.

Si un tumor de Spitz atípico no tiene ninguna de las características histológicas antes mencionada o si no muestra translocación de ALK, NTRK o BRAF, es necesario hacer determinación de ROS-1, HRAS, MET y RET.

Si el diagnóstico histológico corresponde a un nevus de Spitz, a pesar que no tenga ninguna implicación terapéutica, se pueden hacer determinaciones moleculares para una mejor clasificación tumoral. Principalmente se debe determinar ALK, NTRK, BRAF, HRAS, ROS-1, MET y RET.

Por último, si el diagnóstico del tumor melanocítico no se trata de un tumor de Spitz, se debe determinar la posible mutación de BRAF, siendo muy probable dicha mutación en los nevus convencionales (*OR* 29,51, $p<0,001$) y también un hecho observado en los melanomas convencionales (*OR* 4,42, $p=0,033$). Es de especial importancia dicha detección en los melanomas ya que son pacientes que con un tratamiento específico para esta diana terapéutica como lo es el uso de Vemurafenib, pueden aumentar su supervivencia libre de progresión de enfermedad.

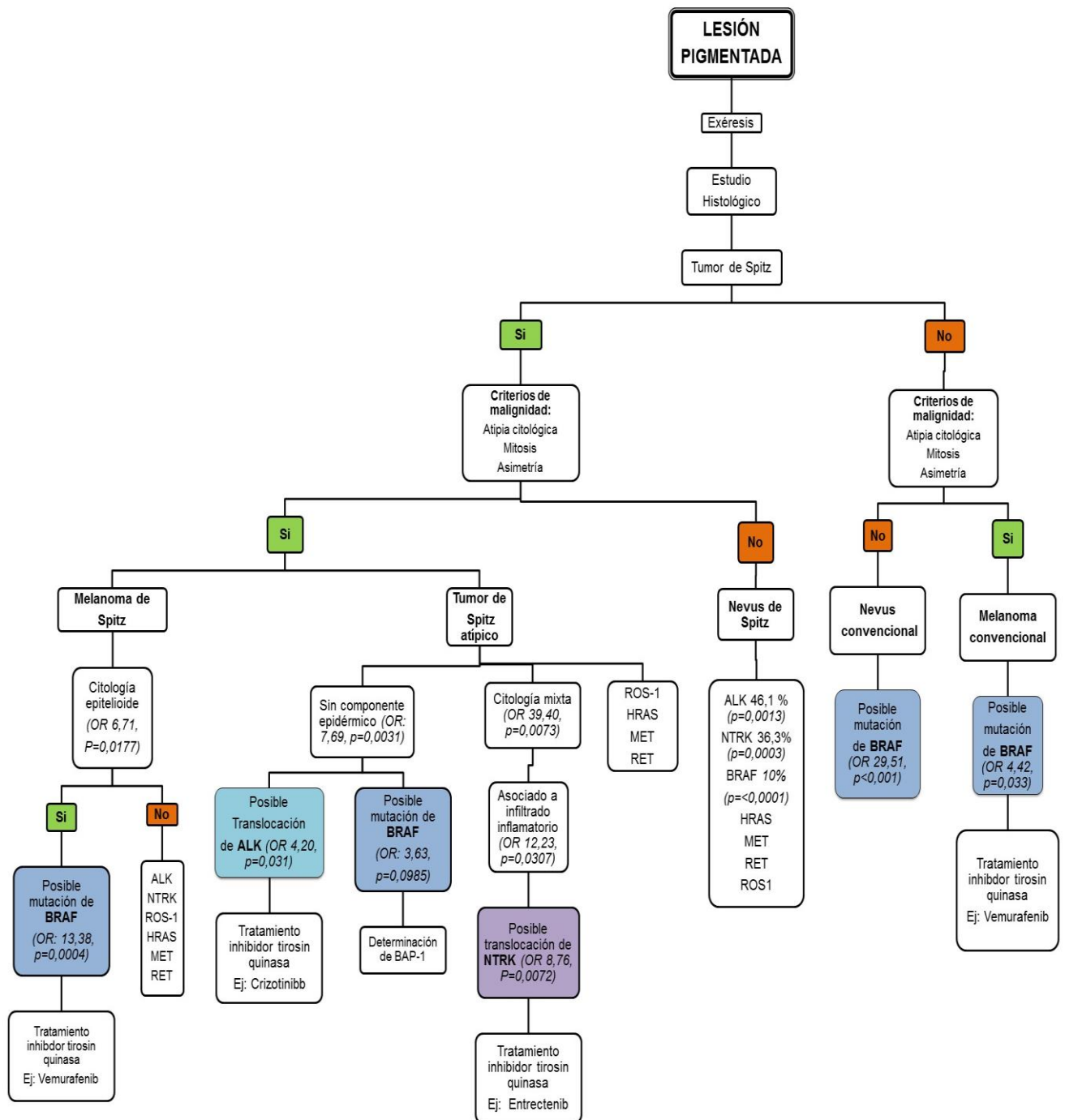


Figura 38 Algoritmo predictor de alteraciones moleculares en tumores melanocíticos

DISCUSIÓN

V. Discusión

El objetivo principal del estudio es caracterizar los tumores de Spitz. El análisis de los resultados obtenidos se realiza en relación a las neoplasias de Spitz comparándolos con los hallazgos encontrados en los nevus y melanomas convencionales. En cada caso se analizan los datos clínicos e histológicos, relacionados con las alteraciones moleculares identificadas. Además se consideran los resultados que se obtienen con los diferentes anticuerpos utilizados y se analizan los resultados obtenidos con otras técnicas, que en este caso corresponde a la técnica de FISH y PCR. Posteriormente se comentan las fortalezas y debilidades del estudio, así como en relación con otros estudios ya publicados y por último se plantean interrogantes no resueltas.

Análisis de las características clínicas de las lesiones melanocíticas

En el estudio realizado, como se ha comentado en diferentes ocasiones, se incluyeron pacientes que fueron diagnosticados de lesiones melanocíticas cutáneas, los cuales fueron escogidos al azar, pero que debían de cumplir que el tipo de lesión melanocítica fuese un tumor de Spitz (nevus de Spitz, tumor de Spitz atípico, melanoma de Spitz) o que fuese un nevus o un melanoma convencional; de esta manera podríamos observar en nuestro estudio el comportamiento tanto clínico, histológico y molecular de las diferentes neoplasias para poder establecer las diferencias biológicas entre ellas.

Edad

Respecto a la edad, el conjunto de la serie de todos los pacientes seleccionados (n=160) tiene un amplio rango de edad (entre 1 y 91 años), pero con una media de 38 años y una mediana de 34 años. Es de hacer notar que la edad de los pacientes con lesiones melanocíticas de Spitz son más jóvenes con respecto a los pacientes con tumores de tipo no Spitz. La media de la edad es de 26, 27 y 43 años, para los nevus de Spitz, tumores de Spitz atípicos y melanomas de Spitz respectivamente, en comparación con la media de edad de

los pacientes con nevus y melanomas convencionales que es de 39 y 54 años, respectivamente. Por lo que se podría decir que los pacientes con tumores de Spitz en nuestra serie tienen una leve tendencia a observarse en personas jóvenes.

La valoración de la edad es un elemento importante a considerar en los tumores melanocíticos, ya que no solamente permite conocer en que grupos de edad es más frecuente los tumores benignos o malignos, o como en nuestro estudio, saber a qué edades es más frecuente diagnosticar los diferentes tipos de tumores de Spitz; sino que también es un elemento a considerar como un factor pronóstico. En los melanomas, la edad avanzada se asocia con un peor pronóstico. En los pacientes jóvenes, a pesar de tener un tumor con características agresivas tienen un mejor pronóstico, lo que sugiere que el tumor puede tener una biología distinta en estos pacientes.

Los datos sobre el impacto de la edad se analizaron en 11.088 casos de melanoma en estadios I, II y III usando la base de datos utilizada para la séptima edición del sistema de estadificación de melanoma del "American Joint Committee on Cancer" (AJCC). En 10.233 pacientes con enfermedad en estadio I o II (es decir, con ganglios negativos) en el análisis multivariado se encontró que la edad era un factor pronóstico independiente para la supervivencia, junto con el sexo, el grosor del tumor primario, el índice mitótico, la presencia de ulceración y la localización del tumor. En 775 pacientes con enfermedad en estadio III, el análisis multivariado identificó cuatro factores asociados independientemente con la supervivencia: la edad, el número de ganglios linfáticos afectados, la presencia de ulceración y el índice mitótico. El melanoma que ocurre en pacientes menores de 20 años tiende a tener características más agresivas en el tumor primario (índice mitótico alto, ulceración, entre otros), pero los resultados de supervivencia son mejores que los observados con pacientes mayores (119).

En otro análisis, se estudió el impacto de la edad en la afectación de los ganglios linfáticos centinela en pacientes con melanoma en estadio clínico I y II. El aumento de la edad se asoció con una disminución de la incidencia de

afectación ganglionar en el análisis multifactorial. La incidencia más alta de afectación de los ganglios linfáticos centinela fue del 25.8% para los menores de 20 años de edad, en comparación con el 15.5% en los mayores. A pesar de esto, la edad avanzada se asoció con una mayor mortalidad a cinco años para los pacientes con enfermedad en estadio II (120).

Los tumores de Spitz, en general, ocurren en las primeras dos décadas de la vida, pero también pueden desarrollarse en adultos. Sin embargo la presencia de tumores de Spitz en pacientes mayores de 20 a 30 años tiene un mayor riesgo de desarrollar malignidad. Existe un sistema de clasificación basado en la edad del paciente y un subconjunto de características morfológicas para ayudar a determinar si un tumor de Spitz atípico tiene un riesgo bajo, intermedio o alto de metástasis. En general, la edad menor de 10 años se acepta como un criterio importante para discriminar los tumores de Spitz con menor riesgo de progresión neoplásica. Sin embargo, la importancia de la edad no debe sobreestimarse, ya que puede haber una propensión a diagnosticar tumores de Spitz atípicos en niños y melanomas en personas mayores, por lo que en casos difíciles se debe emplear alguna técnica complementaria(121).

Sexo

Respecto al sexo, observamos que más de la mitad de los casos corresponden a mujeres (57%; n=91/160). En el grupo de los tumores de Spitz también predomina el sexo femenino sobre todo en los nevus de Spitz (26%, n=42) y en los tumores de Spitz atípicos (9%, n=14).

El sexo también se considera un factor pronóstico. En las mujeres con diagnóstico de melanoma en estadio I y II, parece estar asociado con un mejor pronóstico. Además en las mujeres se suele observar con mayor frecuencia melanomas que no están ulcerados y que están localizados en las extremidades, siendo todos factores pronósticos favorables (119).

En un estudio de 2672 pacientes con melanoma en estadio I y II correspondientes a cuatro ensayos clínicos con terapia adyuvante, realizados por la Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento del Cáncer (EORTC), el género femenino se asoció con una supervivencia general y específica de la enfermedad significativamente mejor (OR: 0,70 y 0,74, respectivamente) (122).

En el ensayo Sunbelt Melanoma Trial en el que se incluyeron 1829 pacientes con melanoma (todos los cuales habían sido sometidos a una biopsia de ganglio linfático centinela) se demostró que el género masculino era un factor de riesgo independiente para una peor supervivencia general (riesgo relativo (RR) 1.45, IC 95% 1.21-1,77) (123).

También en un análisis que agrupa cinco ensayos clínicos de pacientes con melanoma en estadio III y IV, se determinó que las mujeres tenían una supervivencia significativamente mejor libre de recaída de la enfermedad en comparación con los hombres (124).

Los tumores de Spitz son neoplasias que se producen en todos los grupos étnicos. La presencia de tumores de Spitz en los hombres y las mujeres no muestra diferencias significativas, sin embargo puede haber predominio del sexo femenino en los adultos jóvenes (125).

Localización

Respecto a la localización, la mayoría de las lesiones melanocíticas estudiadas se localizan en miembros superiores (36%; n=58), seguida de los miembros inferiores (31%; n=50) y como localización menos frecuente se encuentra el abdomen (5%; n=8).

En los tumores de Spitz la distribución es similar a la observada en los resultados globales, correspondiendo el 28% (n=45) de los tumores de Spitz localizados en miembros superiores, el 25% (n=40) en miembros inferiores y el

3% (n=5) en abdomen. Sin embargo en nevus y melanomas convencionales, la localización más frecuente es en miembros superiores (8%; n=13), pero seguido de cabeza y cuello (7%; n=11).

Los nevus de Spitz pueden observarse en cualquier localización anatómica. Sin embargo, los lugares más comunes son en cabeza y cuello o las extremidades inferiores en los niños y el tronco o las extremidades en los adultos (125,126).

La localización también puede ser considerada en algunos tipos de tumores melanocíticos como un factor pronóstico, como es el caso de los pacientes con melanomas. Los melanomas cutáneos que surgen en el área de la cabeza y el cuello, el tronco y posiblemente la extremidad inferior tienen un peor pronóstico que los que surgen en la extremidad superior. Sin embargo, el sitio del tumor primario es menos importante que los factores incluidos en el sistema de estadificación AJCC como por ejemplo el espesor de Breslow del tumor, el índice mitótico, la presencia de ulceración y la afectación ganglionar (127,128) .

Análisis de las características histológicas de las lesiones melanocíticas

Analizamos una serie de características morfológicas en cada uno de los grupos de lesiones melanocíticas. El objetivo como ya se ha mencionado es relacionar características histológicas con los hallazgos moleculares. Este tipo de asociación ya ha demostrado ser útil en ciertos tumores, como en los tumores con pérdida de expresión de BAP1, que suelen tener características morfológicas distintivas.

Morfología celular

Se valora la morfología celular, tomando en cuenta el tamaño y forma del citoplasma, por lo que se dividieron en grupos, siendo: Epitelioide, fusiforme, mixto y redondeada.

Al analizar los resultados del conjunto de todas las lesiones melanocíticas, la morfología más frecuente es epitelioide (51,8%; n=82), seguido de la morfología fusiforme (30%; n=49), luego el patrón redondeado (13%; n=21) y en último lugar el patrón mixto en un 5% (n=8) de casos.

En el grupo de tumores de Spitz, es también más frecuente la morfología celular epitelioide (38%; n=62), seguido en frecuencia de la morfología fusiforme (28%; n=45), y por último lugar el patrón mixto (8%; n=5).

Valorar la morfología celular tiene dos finalidades, una de ellas es observar la frecuencia de los tipos morfológicos celulares encontrados en los tumores melanocíticos pero sobretodo en los tumores de Spitz; y por otro lado intentar determinar si existe alguna morfología celular que sea predominante en alguna de las alteraciones genéticas estudiadas. Algunos ejemplos de tumores con características morfológicas específicas son aquellos que tienen pérdida de expresión de BAP-1, en los que predominan células neoplásicas epitelioides con abundante citoplasma anfófilico (129), los tumores con reordenamiento de ALK que tienen una celularidad con una morfología fusiforme plexiforme (130), o los tumores de Spitz con mutación/ amplificación de HRAS en los que se observan células aisladas con núcleo vesicular y citoplasma anfófilico que se mezclan con las fibras de colágeno (54)

Morfología polipoide

Una de las características clínico-histológicas estudiadas es la presencia de la morfología polipoide, entendiéndose como esta cuando el tumor está

constituido por una proliferación melanocítica prominente, que otorga una forma protuberante en la superficie cutánea.

La característica polipoide se considera con el objetivo de identificar su asociación con alguna alteración molecular. Por ejemplo, los casos que tienen pérdida de expresión de BAP-1 suelen estar constituidos por una proliferación de melanocitos de gran tamaño que se observa predominantemente en la dermis generando su expansión, por lo que a veces adquieren una morfología protuberante/ polipoide (131).

Dentro de esta categoría en nuestra serie se encuentran un 23% (n=37) de los tumores melanocíticos y dentro del grupo de los tumores de Spitz el 20,6% (n=36) eran de morfología polipoide. Posteriormente se comentará la asociación de ésta característica morfológica con los hallazgos encontrados con inmunohistoquímica, así como en la técnica de FISH y PCR.

Pigmentación

Respecto a la pigmentación de las lesiones melanocíticas, en el conjunto de la serie se observa que el 45% (n=72) de las lesiones estaban pigmentadas, mientras que el grupo de tumores de Spitz, se observa pigmento melánico asociado a la neoplasia en un 35% (n=56).

Clínicamente los tumores melanocíticos sin pigmentación pueden ser un desafío y algunas veces implica un retraso significativo en el diagnóstico y tratamiento, lo que puede contribuir a un peor pronóstico (132). Las lesiones melanocíticas suelen estar pigmentadas, sin embargo en aproximadamente el 2% de los melanomas pueden presentarse sin evidencia clínica o histopatológica de pigmentación. Los melanomas de Spitz generalmente se presentan como pápulas o nódulos de crecimiento ligeramente eritematoso. Pueden ser no pigmentados o tener un color marrón, negro o azul. (133).

En un estudio de 628 pacientes con melanoma sin pigmentación, se determinó que estos tumores son significativamente más propensos a presentar metástasis regionales o distantes, así como pueden estar asociados a otros factores pronósticos desfavorables y por tanto tienen un aumento en la agresividad biológica (132). Además, en otros estudios se ha identificado que los pacientes con melanoma sin pigmentación tienen más probabilidades de tener mutaciones BRAF o KIT, lo que puede tener implicaciones importantes para el tratamiento (134).

Extensión pagetoide

Se considera extensión pagetoide cuando las células melanocíticas tienen una distribución intraepidérmica hacia la superficie córnea. Esta característica puede estar presente en las lesiones melanocíticas, pudiendo ser prominente y difusa en los melanomas. De todos los casos, sólo el 21% (n=34) muestra esta característica, en los nevus de Spitz 10/71 casos (6%), en los tumores de Spitz atípicos 5/26 casos (3%), en los melanomas de Spitz 7/18 casos (4%) y en los melanomas de tipo convencional 10/24 casos (6%), no se identifica en los nevus convencionales.

En los nevus de Spitz la extensión pagetoide, si está presente, es focal, escasamente celular y limitada al centro de la lesión o en la mitad inferior de la epidermis. En los tumores de Spitz atípicos se puede observar la presencia de extensión pagetoide extensa en un patrón de células pequeñas o nidos pequeños que involucran las capas superiores de la epidermis. Sin embargo, la asociación de paraqueratosis suprayacente también puede dar lugar a la diseminación pagetoide en lesiones benignas.(135).

En los tumores malignos como en el melanoma, se suele observar de forma más prominente como las células neoplásicas muestran una diseminación pagetoide que involucra todo el espesor o gran parte de la epidermis, a veces incluso la epidermis adquiere una imagen de “perdigones dispersos” (136).

Se identifica la presencia del componente epidérmico en el 56,2% (n=90) de la muestra y en cuanto a las lesiones de Spitz también es un hecho frecuente encontrado, en el 51,8% (n=83) de los tumores.

Durante la embriogénesis, los melanocitos derivados de la cresta neural migran hacia la epidermis y los folículos pilosos para residir en la capa basal de la epidermis. Estos melanocitos, poseen procesos dendríticos que transfieren melanosomas a los queratinocitos. Los nevos (tanto congénitos como adquiridos) están compuestos por melanocitos que han perdido sus procesos dendríticos y generalmente proliferan clonalmente para formar nidos de células. Los nevos adquiridos comienzan como una lesión plana (nevus de unión) y con el tiempo progresa a una lesión elevada (nevus compuesto). El concepto de "caída" de células de nevocas en la dermis, se ha utilizado para explicar la progresión de un nevus de unión a un compuesto. Sin embargo, este concepto ha sido desafiado por una vía alternativa que postula que la migración ascendente de los melanocitos hacia la epidermis forma la base de la formación de nevos (137).

Por otra parte la mayoría de los melanomas malignos surgen como tumores superficiales que se limitan a la epidermis, donde permanecen durante algún tiempo. Durante esta etapa, conocida como la fase de crecimiento horizontal o "radial", el melanoma es casi siempre curable, posteriormente en respuesta a la acumulación gradual de anomalías genéticas, el melanoma se transforma en un nódulo expansivo que se extiende más allá de la membrana basal e invade la dermis. Aunque los cambios moleculares que acompañan la progresión de un tumor melanocítico aún no se han dilucidado, se sugiere que están involucradas proteínas de progresión del ciclo celular, que se han asociado con la adquisición de potencial metastásico temprano en la progresión de algunos melanomas, como los melanomas acrales (137,138).

Ulceración

La ulceración se define como un defecto de la superficie epidérmica que se asocia a cambios reactivos (depósito de fibrina y neutrófilos), con adelgazamiento, borramiento o hiperplasia reactiva de la epidermis adyacente en ausencia de trauma o de un procedimiento quirúrgico reciente (128,139). En el caso de los melanomas, la presencia de ulceración es considerada una característica de mal pronóstico, independiente de la profundidad de invasión del melanoma. Si una lesión está ulcerada debe confirmarse a nivel histológico. En nuestra serie sólo el 5% (n=8) de los casos mostraban ulceración presente en melanomas convencionales (22,5%; n=6), en un melanoma de Spitz (<1%; n=1) y en un nevus de Spitz (<1%; n=1).

En el sistema de clasificación de la TNM de la 8va edición de la AJCC, la presencia de ulceración cambia la estadificación de T1a a T1b, T2a a T2b, etc., dependiendo del espesor del tumor. La ausencia de fibrina, neutrófilos o tejido de granulación en áreas de aparente ulceración serían pistas de que no se trata de una ulceración real. La ulceración puede estar presente en un melanoma in situ pero no afecta la estadificación. Varios estudios han demostrado que el grado de ulceración (medido como un porcentaje o diámetro del ancho del componente invasivo dérmico del tumor) predice con mayor precisión el pronóstico, con respecto a sólo indicar presencia o ausencia de ulceración (140,141).

Infiltrado inflamatorio

El infiltrado inflamatorio intratumoral (TILs) en el melanoma, también se ha considerado clásicamente como un factor pronóstico, aunque no exento de controversia sobre si es un factor de buen pronóstico o desfavorable. Los linfocitos intratumorales se pueden valorar en relación a la neoplasia de forma semicuantitativa. Para considerarse como linfocitos intratumorales los linfocitos tienen que rodear e interrumpir las células tumorales del componente invasivo del tumor (142).

Se suelen clasificar en: a) Linfocitos intratumorales no identificados: no hay linfocitos presentes o hay linfocitos presentes pero que no infiltran en el tumor b) linfocitos intratumorales escasos: los linfocitos se infiltran en el melanoma solo focalmente o en toda la base del tumor invasivo y c) linfocitos intratumorales abundantes: los linfocitos infiltran de forma difusa toda la base del tumor invasivo o se observa una permeación difusa del componente invasivo. Nosotros valoramos solo la presencia o ausencia de los linfocitos intratumorales sin clasificarlos de acuerdo a la cantidad de infiltración, en nuestra serie ésta característica se identificó en el 53,7% (n=86) de los casos correspondiendo a nevus de Spitz (25,6%; n=41), tumor de Spitz atípico (7,5%; n=12), melanoma de Spitz (8%; n=13) y en los melanomas convencionales (10,6%; n=17), no se observó esta característica en los nevus convencionales.

Análisis de los hallazgos inmunohistoquímicos

En los tumores de Spitz, en una muy pequeña cantidad de casos, se encuentran mutaciones en BRAF, NRAS, o KIT, que son oncogenes frecuentemente activados en neoplasias melanocíticas cutáneas convencionales, así como mutaciones en GNAQ o GNA11, oncogenes activados en los nevus azules y en los melanomas uveales. Sin embargo en los tumores de Spitz diversos estudios han identificado la presencia de amplificaciones y mutaciones en HRAS, BAP-1 así como reordenamientos genómicos que conducen a fusiones que involucran a la treonina quinasa BRAF o receptores de tipo tirosin quinasa como ALK, ROS1, NTRK1, RET y MET (71,84). Siendo estas alteraciones moleculares mutuamente excluyentes.

Las quinasas de fusión se forman al producirse reordenamientos intracromosómicos o intercromosómicos en los que la porción 3' de un gen quinasa se vincula a la parte 5' de otro gen, para dar lugar a una transcripción de ARNm, que codifica una proteína quimérica que genera la activación constitutiva de la actividad quinasa. Algunas de las quinasas, como ALK, ROS1 y RET, no se expresan en la mayoría de las células no neoplásicas, incluidos los

melanocitos, por tanto la expresión de la quinasa activada se considera un evento oncogénico en múltiples tipos de tumores diferentes.

Se han demostrado fusiones de quinasa en tumores de Spitz en todo el espectro de las lesiones desde nevus de Spitz hasta en los melanomas de Spitz, lo que indica que las fusiones representan el inicio de alteraciones oncogénicas, de forma similar a lo que ocurre con BRAF, NRAS, GNAQ y GNA11 en lesiones melanocíticas convencionales.

Para identificar la expresión de las proteínas resultantes de las alteraciones moleculares, se usaron anticuerpos comerciales para ALK, NTRK, BRAF, ROS-1, MET y RET.

Inmunohistoquímica ALK

La positividad para el anticuerpo ALK se considera en los casos que tuvieran expresión citoplasmática en la totalidad o casi la totalidad de las células melanocíticas neoplásicas, evitando las zonas que tengan mucho pigmento melánico o zonas de artefacto de la técnica para evitar los falsos positivos.

En nuestro estudio, los casos positivos con el anticuerpo ALK es del 8% (n=13), del total de las lesiones melanocíticas. El 3,75% (n=6) de nevus Spitz son positivos para ALK, así como el 4,37% (n=7) de los tumores de Spitz atípicos. No se detectan casos positivos en las lesiones con diagnóstico de melanoma de Spitz ni tampoco en las lesiones melanocíticas no Spitz (p=0,0013).

Los hallazgos son similares a los de otros estudios. El grupo de Wiesner et al, estudiaron 140 casos y en 72 de ellos (51,4%) encontraron reordenamientos de genes implicados en la vía tirosin quinasa, de los cuales el 10% (n=14), mostraban reordenamiento de ALK, y de ellos, el 10,7% (8 de 75) correspondían a nevus de Spitz, el 15,6% (5 de 32) a tumores de Spitz atípicos y el 3% (1 de 33) a melanomas de Spitz (71).

Las fusiones para ALK se asocian con los genes TPM3 y DCTN1. El grupo de Wiesner, propone que la presencia de una alteración de la vía tirosin quinasa dentro de todo el espectro de las lesiones de Spitz (desde benignas a malignas, aunque menos frecuente en éstas últimas), sugiere que este tipo de alteraciones ocurre muy tempranamente en la patogénesis tumoral, pero que no es un elemento suficiente para la transformación maligna, dicha observación es análoga a lo que ocurre en la mutación de los oncogenes BRAF, NRAS, GNAQ y GNA11 en lesiones melanocíticas convencionales (71).

En nuestra serie en los casos con positividad con inmunohistoquímica para ALK, la mediana de edad es de 28 años, con un rango intercuartílico de 13-35 años (percentil 25 y 75) ($p=0,1654$). Aunque la mayoría de los casos ALK positivos corresponden a mujeres (61,5%; $n=8$), la diferencia entre sexos no es significativa ($p=0,7232$). El predominio de translocación de ALK en pacientes mujeres y jóvenes, corresponden a los hallazgos similares encontrados por Yeh y colaboradores (143), así como en el grupo de Sapna et al (78). En la serie de Busam (83) no observaron predominio en cuanto al sexo pero también la media de edad se encontraba en un rango de pacientes jóvenes (16 años).

Las lesiones ALK positivas con inmunohistoquímica, se desarrollan predominantemente en cabeza y cuello (38,4%, $n=5$), seguido de miembros inferiores (30,7%, $n=4$), miembros superiores (23%, $n=3$) y en último lugar el tórax (7,69%, $n=1$). No se observaron lesiones ALK positivas localizadas en la región abdominal ($p=0,1748$). En los trabajos de Busam encontraron que el sitio más frecuente es en los miembros inferiores y menos frecuente en extremidades superiores (83). Según el grupo de Sapna (78) la localización más frecuente es también en las extremidades, seguida de la cabeza y el cuello y por último en el tronco, estos últimos resultados coinciden más con nuestros hallazgos.

Al comparar las características histológicas de los tumores positivos para ALK, se puede observar que la mayoría están constituidos por células de patrón fusiforme (53,8%; $n=7$), seguido de la morfología epitelioide (30,7%, $n=4$) y por último mixta (15,3%; $n=2$) ($p=0,0320$). Los tumores positivos con el anticuerpo ALK, solo se observa en los tumores de Spitz.

En el 53,8% (n=7) de los casos se identifica una morfología polipoide (p=0,0061), similar al descrito por el grupo de Sapna et al (presente en el 47% de los casos de su serie) (78).

Los tumores están pigmentados en el 15,3% (n=2) de los casos positivos para ALK con inmunohistoquímica (p=0,0251). En cuanto a la extensión pagetoide, está presente en el 7,6% (n=1) de los casos (p=0,2125). El componente intraepidérmico se observa en el 30,7% (n=4) (p=0,0533) y se identifica infiltrado inflamatorio en el 23% de los casos (n=3) (p=0,0207). No se observan casos positivos para ALK con ulceración de la superficie epidérmica.

En resumen se podría decir que los hallazgos significativos en el análisis inicial en nuestra serie que están en relación con la expresión de ALK son el diagnóstico histológico de tumor de Spitz, sobre todo en nevus de Spitz y tumor de Spitz atípico. Por otra parte la morfología polipoide de la lesión, la celularidad fusiforme, la pigmentación y el infiltrado inflamatorio son también hallazgos significativos cuando analizamos los datos mediante el test de Fisher.

Nuestros hallazgos son similares a los previamente descritos por Yeh I et al (143), los cuales escriben en su serie que la mayoría de los tumores con reordenamiento de ALK a menudo son exofíticos y compuestos de grandes nidos de melanocitos fusiformes dispuestos en forma alargada y orientados verticalmente, que a menudo demostraron extensión en forma de cuña, con un patrón de crecimiento marcadamente infiltrante en la periferia del tumor. La mayoría carecían de pigmento melánico, y algunos mostraban componente epidérmico con consumición de la misma (16%), hallazgos similares también fueron descritos por el grupo de Wiesner (71).

Kiruru M et al (144), estudiaron 38 nevus de Spitz y 67 tumores de Spitz atípicos en los que los pacientes tenían una media de edad de 21 años. De los 105 casos estudiados, el 26,7% mostraron reordenamiento para ALK (n=28), el cual es un poco más frecuente que lo obtenido en nuestros resultados. Ellos destacan que en los casos con reordenamiento para ALK predomina un patrón

de crecimiento fascicular (96,4%, 27/28), y la mayoría carece de melanina (89,3% 25/28). Sólo un pequeño grupo muestra ulceración (10% 3/28).

El grupo de Kiruru, realiza una comparación de las características histológicas en los casos con reordenamiento para ALK y fusión de NTRK. Estos autores demuestran que el patrón de crecimiento fascicular es un hecho muy frecuente en los tumores de Spitz con reordenamiento para ALK, pero que también es una característica que puede observarse en neoplasias que muestran fusión de NTRK (hasta en el 25%) y se puede identificar en casos negativos para ambas alteraciones genéticas (hasta en el 11%), por tanto concluyen que este patrón de distribución es una característica sensible pero no específica de neoplasias que muestran reordenamiento de ALK (144).

Los grupos de Busam y Sapna (78,83) por su parte identifican un patrón fascicular-plexiforme predominante en tumores de Spitz con reordenamiento de ALK con predominio de células neoplásicas de tipo fusiforme. No observaron pigmentación ni inflamación prominente.

Cuando realizamos la regresión logística univariante para determinar si realmente las características iniciales se asocian con el reordenamiento de ALK, identificamos que los resultados significativos corresponden a los casos con diagnóstico de tumor de Spitz atípico con translocación de ALK que tiene un OR de 3,99 (IC 1,19-13,31) ($p=0,0243$), así como la morfología polipoide tiene un OR de 4,55 (1,42-14,54) ($p=0,0106$). Finalmente si el tumor está pigmentado tiene una baja probabilidad de asociarse a la translocación de ALK, en este caso el OR es de 0,20 (0,04-0,93) ($p=0,0407$) y lo mismo ocurre con la presencia de inflamación con un OR de 0,23 (0,06-0,88) ($p=0,0311$).

Por último en el modelo ajustado multivariante las características que finalmente demostraron mayor fuerza de asociación estadística con la translocación de ALK, es el diagnóstico de tumor de Spitz atípico con un OR de 4,20 (1,14-15,53) ($p=0,0313$) y la presencia de componente epidérmico con un OR de 7,69 (1,96-25) ($p=0,0031$).

La positividad para el anticuerpo NTRK se considera cuando la tinción es difusa citoplasmática en las células neoplásicas. En nuestra serie es positivo en el 7% (n=11) de los casos, que corresponden a 4 nevos de Spitz y a 7 tumores de Spitz atípicos ($p=0,003$). Ningún melanoma de Spitz, nevus o melanomas convencionales son positivos.

El grupo de Wiesner et al, estudió casos con reordenamiento para NTRK. Los casos que mostraron fusión de NTRK correspondían a un 10,7% de nevos de Spitz (8 de 75), un 25% a tumores de Spitz atípicos (8 de 32) y en el 21,2% a melanomas de Spitz (7 de 33). En este estudio el porcentaje de casos con fusión de NTRK es mayor a la obtenida en nuestro estudio. Las parejas de fusión de NTRK encontradas en la serie de Wiesner corresponden a los genes LMNNA en el cromosoma 1q y a las translocaciones intercromosómicas con TP53 (71).

Sapna y colaboradores obtuvieron resultados similares, identificando fusiones de NTRK en el 17% de los casos estudiados (17 de 49), siendo 9 tumores de Spitz atípicos, 7 nevos de Spitz y 1 melanoma de Spitz (78).

La mediana de la edad de los pacientes en nuestra serie con fusión para NTRK, es de 22 años, con un rango intercuartílico de 10-30 años ($p=0,0359$). Estos pacientes son más jóvenes que los pacientes que tienen tumores con reordenamiento de ALK en nuestro estudio.

Las lesiones con fusión de NTRK en nuestra serie son más frecuentes en mujeres (64,5%, n=6) ($p=0,8716$). La localización más frecuente es en miembros superiores 45,4% (n=5), seguido de miembros inferiores 36,3% (n=4), y menos frecuente en tórax 18,1% (n=2). No se observa ningún caso con fusión de NTRK en cabeza y cuello o abdomen ($p=0,5614$).

Los hallazgos del grupo de Sapna en pacientes con tumores con fusión de NTRK, no mostraron un predominio de sexo y tenían una media de edad de 25

años. La mayoría de los casos estaban en tronco, seguido de extremidades y por último en cabeza y cuello (78).

Al analizar las características histológicas relacionadas con la fusión de NTRK, encontramos que la mayoría presenta una morfología celular de tipo epitelioide (36,3%; n=4), mixto (36,3%; n=4) o fusiforme (27,2%; n=3), ($p=0,0001$), son polipoides en un 45,4% (n=5), de los casos ($p= 0,0687$), y la presencia de pigmentación corresponde al 45,4% (n=5), de los casos ($p=0,9749$). La extensión pagetoide es un hallazgo presente en 36,3% (n=3) de los pacientes ($p=0,2042$). El componente epidérmico se observa en un 81,8% (n=9) de los casos ($p=0,0765$). El infiltrado inflamatorio prominente es identificado en el 81,8% (n=9), ($p=0,0530$). No se observan casos con fusión de NTRK con presencia de ulceración.

Kiruru M et, estudiaron las características histológicas de los tumores de Spitz con fusión de NTRK. De 105 casos, observaron positividad con inmunohistoquímica en 20 de ellos (19%), siendo este valor un poco superior a los resultados obtenidos en nuestra serie. Al valorar las características histológicas identificaron que el patrón de crecimiento de tipo fascicular estuvo presente en 5 de los 20 casos positivos (25%), por lo que ellos concluyen que este patrón no es predominante, pero que puede observarse en presencia de fusión de NTRK. Por otra parte identificaron que la morfología celular de tipo epitelioide era un rasgo observado en 9 de 20 casos (45%), por lo que representa una característica frecuente en este tipo de neoplasias. Además el 45% de casos no mostraban pigmentación relevante (144).

Sapna y colaboradores, identificaron que tumores con fusión de NTRK son de un tamaño pequeño y exofíticos (41%, n=7). La mayoría tiene un patrón de crecimiento en forma de cuña (47%, n=8) o un patrón inespecífico (41%, n=7). Se identificó hiperplasia epidérmica (88%, n = 15) y cuerpos de Kamino de forma frecuente (53%, n = 9). De hecho, observaron que los tumores con fusión de NTRK1 tienen 2.6 veces más probabilidades de tener cuerpos de Kamino ($p=0.0141$). Los casos no mostraron pigmentación relevante. La mayoría de las lesiones eran predominantemente fusocelulares (88%, n=14) ($P = 0.0244$) (78).

En nuestro estudio al hacer el análisis univariado identificamos que los casos con fusión de NTRK la edad tiene un OR de 0,96 (0,92-0,99) ($p=0,041$). En relación al diagnóstico de tumor de Spitz atípico el OR es de 6,17 (1,63-23,33) ($p=0,007$) y si el tumor tiene una citología mixta el OR es de 19,75 (3,56-109,38) ($p=0,0006$).

Finalmente en el modelo ajustado multivariado las características que se asocian con la fusión de NTRK de forma consistente son el diagnóstico de tumor de Spitz atípico con un OR de 8,76 (1,79-42,66), ($p=0,0072$), la citología de tipo mixto con un OR de 39,40 (2,69-576,7) ($p=0,0073$), seguido de la morfología fusiforme con un OR es de 8,76 (1,79-42,67) ($p=0,8831$) y la presencia de inflamación tiene un OR de 12,29 (1,26-119,68) ($p=0,0307$).

Inmunohistoquímica BRAF

El anticuerpo BRAF detecta la expresión proteica de la mutación de BRAF V600E. En nuestra serie se observa que el 25% (n=40) de los tumores melanocíticos muestran positividad con el anticuerpo de BRAF. De los tumores de Spitz son positivos con el anticuerpo BRAF el 14,78%. Las lesiones que más frecuentemente expresaron positividad para BRAF fueron los nevus convencionales, siendo positivos en un 40% (n=16), seguidos de los melanomas de Spitz con 22,5% (n=9), posteriormente los melanomas con un 17,5% (n=7), y por último los nevus de Spitz con un 10% (n=4), y los tumores de Spitz atípicos también con un 10% (n=4) ($p<0,0001$).

En la serie de Wiesner, se identifica la presencia de reordenamientos genéticos en tumores de Spitz, determinados mediante secuenciación de la serina/treonina quinasa BRAF. Los reordenamientos de BRAF estuvieron presentes en el 5,3% (4 de 75) de los nevus de Spitz, en un 6,3% (2 de 32) de los tumores de Spitz atípicos y en un 3% (1 de 33) de los melanomas de Spitz. Las parejas de reordenamiento encontradas para BRAF fueron los genes CEP89 y LSM14A. Además, detectaron translocaciones de BRAF en el 1,3% (1 de 75

casos) de los nevos de Spitz y en el 3,1% (1 de 32) tumores de Spitz atípicos estudiados (71).

En nuestra serie, la mediana de edad de los pacientes con lesiones melanocíticas que mostraban alteración de BRAF fue de 42 años con un rango intercuartílico de 31 y 53 años ($p=0,0027$), se puede observar que este grupo con mutación de BRAF son de mayor edad con respecto a los grupos de tumores con reordenamientos para ALK y NTRK.

La mayoría de los casos BRAF positivos con inmunohistoquímica corresponden a personas de sexo femenino, representado por un 60% ($n=24$) ($p=0,6449$). El lugar más frecuente de aparición de éstas lesiones, es miembro superior en el 25% ($n=10$), cabeza y cuello 25% ($n=10$), seguido del tórax con un 22,5% ($n=9$), miembros inferiores 17% ($n=7$) y abdomen con un 10% ($n=4$) ($p=0,0058$).

Si comparamos la positividad para BRAF con las características citológicas, la mayoría de los casos muestran un morfología celular de tipo epiteliode (55%; $n=22$), seguido de la celularidad de tipo mixta (40%; $n=16$) y por último de tipo fusiforme (5%; $n=2$) ($p<0,0001$). Sólo el 20% ($n=8$), son polipoides, ($p=0,5883$). El 30% ($n=12$) de los casos están pigmentados ($p=0,0277$). Se identifica extensión pagetoide, en el 17,5% ($n=7$) de los casos, ($p=0,5032$). El componente epidérmico está presente en el 33%, ($n=13$) ($p=0,0005$). No se identifica ningún caso con mutación de BRAF con ulceración, pero se observa infiltrado inflamatorio en un 43% de los casos ($n=17$) ($p=0,0994$).

El grupo de Sapna y col, identificaron 14 casos con mutación para BRAF en su serie de tumores de Spitz. Seis de las lesiones se desarrollaron en hombres y 8 mujeres. La edad promedio fue 24 años con un rango de 2 a 68 años. La mayoría de las lesiones se localizaban en extremidades (50%, $n=7$), seguido de cabeza/cuello (29%, $n=4$) y tronco (21%, $n=3$). La mayoría de las mutaciones de BRAF se diagnosticaron en tumores de Spitz atípicos ($n=9$), 2 en nevos de Spitz y 3 en melanomas de Spitz. La mayoría de las lesiones mostraron morfología en placa (36%, $n=5$), con hiperplasia epidérmica en el 71% ($n=10$). Solo 2 casos

tenían cuerpos de Kamino (14%). El 21% de los casos tenía extensión pagetoide (n=3) y la mayoría tenía como forma predominante células epitelioides ($p=0.0002$) (78).

En resumen las características más significativas en nuestra serie con respecto a la positividad de BRAF fueron la edad, el diagnóstico histológico, la localización anatómica, las características morfológicas citológicas y la presencia del componente epidérmico con el test exacto de Fisher.

Posteriormente en el análisis univariado en los casos con mutación de BRAF la edad tiene un OR de 1,02 (1,01-1,04) ($p=0,0097$). En relación al diagnóstico histológico, si un tumor melanocítico corresponde a un nevus convencional el OR es de 53,59 (12,91-222,49) ($p<0,0001$), si es un melanoma de Spitz un OR de 16,75 (4,27-66,78) ($p<0,0001$) y por último un melanoma convencional con un OR de 6,89 (1,81-26,31) ($p=0,0047$). Si el tumor se localiza en el abdomen el OR es de 6,27 (1,21-32,47) de albergar mutación de BRAF ($p=0,0288$), seguido del tórax con un OR de 3,25 (1,09-9,68) ($p=0,0339$) y por último en cabeza y cuello con un OR de 3,13 (1,09-8,97) ($p=0,0333$).

En relación a la morfología citológica, si la celularidad es de tipo redondeada el OR es de 8,87 (2,91-27,09) ($p=0,0001$) y si la morfología es fusiforme es poco probable que albergue mutación de BRAF ya que el OR es de 0,12 (0,03-0,54) ($p=0,0056$). Si el tumor melanocítico es pigmentado tiene baja probabilidad de asociarse a una mutación de BRAF ya que el OR es de 0,43 (0,19-0,92) ($p=0,0300$), al igual que la presencia de componente epidérmico con un OR 0,27 (0,13-0,58) ($p=0,0007$).

Por último en el modelo ajustado multivariante se identificaron las variables que tienen mayor asociación con la mutación de BRAF. El diagnóstico histológico que con mayor probabilidad se asocia a la mutación de BRAF es el diagnóstico de nevus convencional con un OR de 29,51 (6,92-125,79) ($p<0,0001$), seguido del diagnóstico de melanoma de Spitz con un OR de 13,38 (3,23-55,47) ($p=0,0004$), luego le sigue el diagnóstico de melanoma convencional con un OR de 4,42 (1,12-17,37) ($p=0,0336$) y por último con el diagnóstico de tumor

de Spitz atípico con un OR de 3,63 (0,79-16,76), ($p=0,0985$). En relación a las características citológicas si la neoplasia tiene una citológica epitelioides el tumor se asocia con mayor probabilidad a tener mutación de BRAF con un OR de 6,71 (1,38-33,3) ($p=0,0177$).

Inmunohistoquímica BAP1

La relevancia del gen supresor BAP1 la describieron Wiesner y sus colaboradores, cuando analizaron una serie de tumores de Spitz atípicos en pacientes que no tenían antecedentes familiares conocidos, ya que hasta entonces se conocía los efectos de las mutaciones a nivel germinal de BAP1. Analizaron 32 tumores de Spitz atípicos esporádicos para determinar las características histológicas, la expresión de BAP1 y el estado de mutación de BRAF, de los cuales el 28% ($n=9$) mostraron pérdida de expresión de BAP1, y de éstos el 89% ($n=8$) tenían mutaciones BRAF concomitantes. Solo 1 de los tumores de Spitz atípicos BAP1 positivo (4%) tenía mutación de BRAF ($p < 0,0001$). Los tumores BAP1 negativos con mutación de BRAF se localizaron principalmente en la dermis y estaban compuestos predominantemente por melanocitos epitelioides (61).

Las mutaciones BRAF son comunes en los nevos melanocíticos convencionales (80%) y en los melanomas (65%) pero son raros en los tumores de Spitz atípicos. Por otra parte sabemos que existe un grupo de neoplasias que forman parte de un síndrome autosómico dominante causado por la inactivación de mutaciones en la línea germinal del gen BAP1 (62), en el que los pacientes desarrollan múltiples tumores de Spitz y melanoma uveal. La gran mayoría de las neoplasias BAP1-negativas familiares muestran mutaciones BRAFV600E.

Todos los tumores melanocíticos con mutación de BAP1 tienen las mismas características histológicas y moleculares. Generalmente estos tumores están formados por un nevus convencional que expresa BAP1, y junto a éste una lesión intradérmica constituida por melanocitos epitelioides con núcleo oval y cromatina “abierta” con nucléolo y abundante citoplasma, que pierden expresión de BAP1

y que se asocia a BRAF mutado. Estas características distintivas permiten por tanto separarlo de la clasificación de nevus convencional o tumor de Spitz atípico, por lo que se les llama “BAPomas” (61,145).

Con técnica de inmunohistoquímica se considera positiva la expresión de BAP1, cuando la tinción es nuclear con cualquier intensidad, esto indica que no hay mutación del gen BAP-1. En nuestra serie se identifica conservación de BAP-1 en el 87,5% de los casos (n=140), correspondiendo a 66 nevus de Spitz, 24 tumores de Spitz atípicos, 17 melanomas de Spitz, 18 nevus y en 15 melanomas convencionales.

Cuando con la técnica de inmunohistoquímica se pierde la expresión de tinción de BAP-1 se debe a la inactivación de su función. En los casos estudiados se observa pérdida de expresión de la tinción nuclear en el 12,5% (n=20) de los tumores, correspondiendo a 5 nevus de Spitz, 2 tumores de Spitz atípicos, 3 nevus (pérdida parcial y heterogénea), y en 9 melanomas de tipo convencional. De los 20 casos con pérdida de expresión de la tinción inmunohistoquímica de BAP-1, solo el 3,7% (n=6) se asoció a mutación de BRAF. La mayoría de este grupo de tumores tiene una morfología polipoide, con células de tipo epitelioides y algunos con infiltrado linfocitario periférico asociado, predominando el sexo femenino (n=4; 2,5%).

Por tanto las mutaciones de BRAFV600E y la mutación de BAP1 definen un subconjunto morfológico de tumores de Spitz, que aunque el pronóstico sigue siendo controvertido, lo más frecuente es que este tipo de tumores no se asocie a metástasis.

Inmunohistoquímica RET Y MET

En nuestra serie no se obtuvo ningún caso positivo con MET ni con RET. Estos anticuerpos no son de uso habitual en los laboratorios de anatomía patológica, por lo que no se tiene experiencia en el manejo, dilución y preparación óptima de ellos y probablemente la limitación técnica ha contribuido

a este resultado, pero además los casos con reordenamientos RET y MET son raros.

En los trabajos de secuenciación realizados por Wiesner et al encontraron fusiones de RET en el 3% de la muestra estudiada, correspondiendo al 2,7% de los nevus de Spitz (2 de 75), al 3,1% de los tumores de Spitz atípicos (1 de 31) y al 3% de los melanomas de Spitz (1 de 33). Encontraron fusiones de RET en el cromosoma 10q11 involucrando la pareja de fusión a los genes KIF5B y GOLGA5 en el cromosoma 14q32 (71).

En la serie de Sapna, se identificó solo 1 caso con translocación RET. Un nevus de Spitz compuesto de 4 mm de diámetro con un patrón de crecimiento no específico y en forma de placa. Este caso mostró cuerpos Kamino y maduración completa y carecían de hiperplasia epidérmica, extensión pagetoide, y pigmentación. Las células eran epitelioides de tamaño intermedio con atipia nuclear leve (78). El grupo de Yeh y colaboradores identificaron reordenamientos de MET en el 0.5% de 1202 tumores de Spitz estudiados (114).

Inmunohistoquímica ROS1

En nuestra serie no obtuvimos ningún caso positivo mediante estudio de inmunohistoquímica para ROS1, a pesar de que es la fusión más frecuentemente encontrado en diversas series de otros autores.

En su estudio Wiesner y colaboradores encontraron 17% de casos con fusión de ROS1 de 140 casos analizados, el 26% (19 de 23) de nevus de Spitz, el 8% (3 de 34) de los tumores de Spitz atípicos y el 9% (3 de 33) de los melanomas de Spitz (71).

Los tumores de Spitz con fusiones de ROS1 generalmente se presentan como proliferaciones de melanocíticos bien delimitados y con morfología cupuliforme y con hiperplasia epidérmica irregular. Las parejas de fusión

encontradas para ROS1 fueron 9 genes (HLA A, MYO5A, PPFIBP1, ERC1, PWWP2A, CLIP1, TPM3, ZCCHC8 y KIAA1598) (71).

La expresión de la fusión PWWP2A-ROS1 en células melanocíticas mostraron aumento de la fosforilación de la proteína de fusión, lo que sugiere que la proteína quimérica resultante es constitutivamente activa y las vías de MAPK y PI3K están activadas. Observaron también que la fosforilación de PWWP2A-ROS1, AKT, S6 y SHP2, eran parcialmente inhibidos por crizotinib, que es un fármaco aprobado por la FDA para el cáncer de pulmón que actúa como un inhibidor de ALK y ROS1 (71).

Análisis de los hallazgos obtenidos con los FISH y PCR.

FISH de HRAS

El gen HRAS se encuentra en el cromosoma 11p y clásicamente se ha descrito la amplificación/mutación de HRAS en los nevus de Spitz y en los tumores de Spitz atípicos, y típicamente está prácticamente ausente en el melanoma (146,147). Cuando HRAS está mutado se asocia con aumento del número de copias; sin embargo la amplificación de HRAS de tipo “salvaje” es suficiente para transformar las células melanocíticas.

Estudios previos revelaron que aproximadamente el 20% de los nevus de Spitz albergan mutaciones de HRAS, frecuentemente acompañado por ganancia de copias del alelo mutante del brazo corto de HRAS. Los nevus de Spitz con estas alteraciones genéticas muestran características histológicas distintivas, que a menudo se presentan como una distribución de los melanocitos principalmente intradérmicos con una orientación horizontal en lugar de vertical, a menudo con marcada desmoplasia y presencia de colágeno denso entre las células melanocíticas epitelioides (146).

La amplificación o mutación de HRAS por sí mismo es insuficiente para inducir tumorigénesis por lo que requiere la alteración de otras vías. La evolución en tumores de Spitz puede ser similar a lo que ocurre en el colon en el que los pólipos hiperplásicos raramente progresan a carcinoma, frecuentemente tienen mutaciones de KRAS, en contraste con los pólipos displásicos que tienen un alto riesgo de progresión ya que además de las mutaciones de RAS adquieren mutaciones de APC. La activación de HRAS en los nevos de Spitz puede ser análoga a la activación de RAS en los pólipos hiperplásicos que resultan en una transformación incompleta de los melanocitos que muestran características de melanoma pero con un bajo índice de proliferación.

Las mutaciones en NRAS se encuentran en aproximadamente el 25% de los melanomas cutáneos primarios, pero sin embargo HRAS rara vez está mutado en los melanomas (148). Mutaciones en NRAS también se describen en los nevos melanocíticos congénitos y dependiendo de su tamaño pueden progresar a un melanoma (149). Por el contrario, los nevos de Spitz, no se consideran lesiones precursoras del melanoma. Se demostró que los casos con amplificación para HRAS, en un seguimiento de 6 a 8 años no mostraron metástasis. En los melanomas estudiados con CGH solo se ha encontrado un solo caso con una amplificación de HRAS, el cual correspondía a un melanoma acral con un pequeño cambio en el cromosoma 11p y no en todo el brazo como en el nevus de Spitz (150), esto indica que la presencia de mutaciones de HRAS y/o aumento del número de copias en los nevos de Spitz no aumenta el riesgo de progresión a melanomas, sin embargo el comportamiento de este tipo de lesiones debe ser mejor estudiado (71).

En un estudio de 170 tumores Spitz y tumores atípicos de Spitz, 7 de 24 (29%) lesiones con mutaciones de HRAS se diagnosticaron inicialmente como melanoma, sin embargo, ninguno de los pacientes desarrolló recurrencias o metástasis después de una mediana de seguimiento de 10 años (147)

En nuestro estudio, obtuvimos un 1,88% (n=3) de casos positivos que mostraban amplificación de HRAS con sonda de FISH, estos resultados

corresponden a un caso de nevus de Spitz, un tumor de Spitz atípico y un melanoma. La sonda de HRAS se utilizó en 20 casos, debido a dificultades técnicas, por lo que se seleccionaron los casos que tuvieran un patrón morfológico que describen los autores como distintivo de las neoplasias que puedan albergar amplificación de HRAS, es por esto que los casos positivos realmente corresponden al 15% de los 20 realizados, proporción similar a lo que describen algunos grupos en la literatura.

FISH de ALK

El oncogén ALK es clásicamente conocido en otros tumores como el linfoma anaplásico de células grandes y el tumor miofibroblástico inflamatorio. El reordenamiento de ALK se ha observado en todo el espectro de los tumores de Spitz desde benigno hasta maligno y se ha reconocido de forma recientemente como oncogénica.

Estudios previos han identificado mediante técnicas de secuenciación las parejas de genes con las que se suele asociar el gen de ALK cuando ocurre un reordenamiento, las más frecuentemente descritas son los genes DCTN1 y TPM3, sin embargo otros autores han descrito reordenamientos con NPM1 t(2;5), descrita en linfomas anaplásicos de células grandes, con TPR identificada en el adenocarcinoma de pulmón, con CLIP1 que también se puede asociar con ROS1 y GTF3C2. Además de estas parejas de fusión se han descrito aberraciones numéricas en el cromosoma 2 (que es donde se encuentra ALK). Algunos autores han demostrado la pérdida del cromosoma 1p que al parecer ocurre con frecuencia en todo el espectro de las neoplasias de Spitz (151).

La diversidad genética de los tumores de Spitz puede explicar la dificultad para desarrollar criterios para un diagnóstico fiable y reproducible para estos tumores. Los reordenamientos de ALK están presentes aproximadamente en un 8% de los nevus de Spitz, 5% en los tumores de Spitz atípicos y en el 1% de los melanomas de Spitz (71).

En nuestro estudio se hizo la hibridación con la sonda ALK (sonda de tipo “break apart”) como método de confirmación, solamente en los casos que mostraron positividad con técnicas de inmunohistoquímica, con una clara tinción intensa citoplasmática. Se obtuvieron con FISH, 6 casos positivos de nevus de Spitz y también 6 casos de tumores de Spitz atípicos, representando el 7,5% (n=12) de la totalidad de la muestra (n=160). La mayoría de los autores que han usado en sus trabajos la técnica de FISH para detección o confirmación de reordenamiento de ALK obtuvieron buena correlación con la positividad encontrada tanto con técnicas de inmunohistoquímica como con CGH (71).

El grupo de Amin et al, realizó determinaciones de ALK con inmunohistoquímica con posterior confirmación con FISH, obtuvieron una positividad del 34,5% (n=17). Ninguno de los tumores de Spitz con reordenamiento para ALK demostró suficientes criterios moleculares o morfológicos para un diagnóstico de melanoma de Spitz. Tres de los casos con reordenamiento para ALK demostraron ganancias en el número de copias en el dominio quinasa. Las ganancias en 1 de estos 3 casos fueron amplificaciones con 5 o más copias por célula. Los 3 casos fueron diagnosticados como tumores de Spitz atípicos. También estos autores identificaron que la mayoría eran neoplasias con un tamaño relativamente grande entre 9-10mm, por lo que piensan que en las neoplasias con reordenamiento de ALK se genera un retraso en la senescencia permitiendo por tanto un mayor número de divisiones celulares, resultando por tanto en tumores más grandes (78).

FISH de NTRK

El NTRK también conocido como receptor tirosin quinasa de neurotrofina, está constituido por 3 proto-oncogenes incluyendo NTRK1, NTRK2 y NTRK3 que codifican a las proteínas Trk A, Trk B y Trk C, respectivamente. Estos últimos están involucrados en procesos biológicos tales como supervivencia, diferenciación y plasticidad neuronal bajo circunstancias fisiológicas. Se sabe que los receptores de neurotrofina se sobre expresan en algunos carcinomas, y participan en la estimulación del crecimiento y diseminación tumoral, éstos

hallazgos han sido descritos en el cáncer de mama, colangiocarcinoma, cáncer colorrectal, ginecológico, neuroendocrino, de pulmón no microcítico, glándulas salivales, páncreas, sarcomas y en tiroides (152). La relevancia cada vez mayor de ésta fusión, deriva en que los inhibidores de Trk han demostrado una alta tasa de respuesta en pacientes con fusiones NTRK (153).

Los tumores con fusiones de NTRK1 muestran una fuerte tinción para NTRK1 en inmunohistoquímica, lo que ayuda a identificar los casos con fusiones de NTRK1. Las fusiones de NTRK1 se han descrito con una baja frecuencia en otras neoplasias malignas, e histopatológicamente los tumores de Spitz con fusiones de NTRK1 no demuestran características histomorfológicas específicas.

El grupo de Amin obtuvo un total de 17 tumores de Spitz con fusiones para NTRK, solamente un caso cumplió criterios suficientes para clasificarlo como melanoma de Spitz, y en 4 de los casos se identificaron ganancias en el número de copias del dominio quinasa (78). La positividad para NTRK se estima en un 16% de los tumores de Spitz, y la mayoría de los autores han tenido buena correlación de los hallazgos con otros métodos de detección de la fusión de NTRK detectada con FISH (71).

En nuestra serie al usar la sonda “break apart” observamos la fusión de NTRK en 3 nevus de Spitz y en 8 tumores de Spitz atípicos. No se observan casos positivos con FISH en melanomas de Spitz, ni en nevus y melanomas convencionales, por lo que en nuestros casos fue un hallazgo exclusivo de los tumores de Spitz. Por tanto los casos con fusión de NTRK representan un 6,88% (n=11) del total de la muestra (n=160), resultados un poco por debajo de la proporción de casos obtenidos en series de otros autores (71).

Recientemente Lezcano y colaboradores han descrito la presencia de fusiones de NTRK, tanto NTRK1 y 2, en melanomas metastásicos en pacientes adultos. Las determinaciones han sido realizadas por secuenciación pero han tenido buena correlación con técnicas de inmunohistoquímica. En la secuenciación se detectaron fusiones con los genes TRIM63, DDR2, GON4L y TRAF2. Por lo tanto, estos hallazgos en estos tumores puede proporcionar una

oportunidad terapéutica en un pequeño subconjunto de pacientes con melanoma metastásico (154).

PCR BRAF

La mutación de BRAF es un evento adquirido que ocurre temprano en las lesiones melanocíticas que conduce a la expansión clonal y la progresión tumoral. La evidencia que respalda esta interpretación se debe a que las mutaciones BRAF son comunes en nevus melanocíticos (70-80%), melanomas en fase de crecimiento vertical (40-50%) y en melanoma metastásico (40-50%). Sin embargo, raramente se detectan mutaciones BRAF en melanomas de fase de crecimiento radial (10%) o melanoma in situ (6%), que se cree que son las lesiones malignas iniciales antes del desarrollo de lesiones francamente invasivas (41).

La creencia de que la mutación en BRAF precede a todos los otros eventos oncogénicos en el melanoma, basado principalmente en el hecho de que las mutaciones BRAF están presentes en 70 a 80% de los nevus displásicos (155). Sin embargo, la relación precisa entre nevus y el desarrollo del melanoma no está totalmente clara, independientemente del mecanismo, cuando estas mutaciones de BRAF ocurren en el melanoma invasivo, la activación constitutiva resultante de MEK (y posteriormente ERK) conduce a la oncogénesis mediante la promoción del crecimiento celular y la inhibición de la apoptosis, así como la estricta dependencia de las células a la cascada de señalización (156).

En nuestro estudio, se empleó la técnica de PCR para contrastar los resultados obtenidos con la técnica de inmunohistoquímica para detectar mutación de BRAF. En nuestra serie detectamos mutación de BRAF con PCR en el 21,25% de los casos (n=34), de los cuales correspondían a 14 nevus y 7 melanomas convencionales. Con respecto a las neoplasias de Spitz se detectaron mutaciones de BRAF en 9 melanomas de Spitz, en 3 nevus de Spitz atípicos y en 1 nevus de Spitz.

Las mutaciones BRAF son eventos comunes en una variedad de nevus melanocíticos y melanomas cutáneos primarios. Hasta hace muy poco, se consideraba que las mutaciones de BRAF no se producen en tumores de Spitz pero el grupo de Fullen estudió 48 nevus de Spitz, 7 tumores de Spitz atípicos y 13 melanomas de Spitz. Se detectaron mutaciones de BRAF en 12 de 68 tumores de Spitz, de las cuales 2 eran melanomas de Spitz y 10 eran nevus de Spitz. Cinco de los 10 nevus de Spitz con BRAF mutado mostraban marcada atipia citológica y/o arquitectural. Se identificó un nevus de Spitz desmoplásico con mutación BRAF. Estos resultados indican que un pequeño subconjunto de nevus de Spitz, algunos con características histológicas atípicas, posee mutaciones de BRAF. Por lo tanto, el estado mutacional de BRAF no separa a todos los nevus de Spitz de los melanomas de Spitz, ni de las lesiones melanocíticas convencionales (157).

Gerami et al, estudiaron tumores de Spitz valorando las características histológicas y los hallazgos moleculares. Para los tumores que eran dudosos de ser melanomas utilizaron FISH. Al estudiar BRAF observaron que 5 pacientes tenían ganancias en el número de copias que implicaba el dominio quinasa de BRAF, de los cuales 3 eran tumores de Spitz atípicos, 1 era un nevus de Spitz y 1 era un melanoma de Spitz. También estos autores demostraron que los casos con reordenamiento de BRAF tenían mayor probabilidad de tener ganancias en el número de copias que implican el dominio quinasa de la proteína de fusión. Estos casos también mostraban amplificación en el número de copia en otras proteínas de fusión. Dos de los 5 casos fusionados con BRAF con ganancia en el número de copias, tenían 5 o más copias de la región dominio quinasa (158).

Bastian et al identificaron reordenamientos genéticos de la porción serina/treonina quinasa de BRAF en 4 de 75 nevus de Spitz (5.3%), en 2 de 32 (6.3%) tumores de Spitz atípicos y en 1 de 33 (3%) melanomas de Spitz. Los genes de fusión contenían los exones 1-16 de CEP89 seguidos por el dominio de quinasa de BRAF (codificado por los exones 9-18), o los exones 1-9 LSM14A seguidos por los exones 9-18 de BRAF, ambos resultando con pérdida del dominio NRAS de BRAF. Además de las translocaciones identificadas, 1 de 75 nevus de Spitz (1.3%) y 1 de 32 (3,1%) tumores de Spitz atípicos mostraron la

amplificación de BRAF con al menos 8 señales de fusión de BRAF por núcleo con FISH (61).

A pesar de que la mayoría de los autores describen alteraciones de fusión y amplificación de BRAF, nosotros sólo disponíamos de la técnica de PCR para detección de mutación de BRAF. Sin, embargo las alteraciones de BRAF como se observa en la literatura corresponden sobre todo a nevus, seguido de un gran porcentaje de melanomas. En el caso de los tumores de Spitz obtuvimos en tumores de Spitz atípicos y melanomas de Spitz la mayor proporción de casos con mutaciones de BRAF, lo cual también estos datos podían emplearse para intentar tratar a estos pacientes ya que actualmente es una diana terapéutica con tratamientos aprobados por la FDA para este tipo de mutaciones.

FISH de MET, RET y ROS-1

MET es un receptor de tirosina quinasa, que participa en funciones de angiogénesis, crecimiento e invasión celular y además tiene un papel en el desarrollo de los melanocitos. En 1984, fue identificado como proto-oncogén cuando se aisló TPR-MET, una quinasa de fusión de MET, constitutivamente activa de una línea celular humana in vitro. Recientemente, se han identificado alteraciones dentro de los intrones de MET que alteran la estructura de la proteína, por lo que conlleva una mayor actividad de MET en el adenocarcinoma de pulmón y en glioblastomas.

Yeh y colaboradores, identificaron reordenamientos de genes de MET que resultan en fusiones de MET en tumores de Spitz y melanomas. Las fusiones de MET aparecen en un patrón mutuamente excluyente con los oncogenes de melanoma previamente identificados, son constitutivamente activos y tumorigénicos, por lo tanto, pueden servir como dianas terapéuticas para un subconjunto de melanomas. Identificaron fusión de MET quinasa en el 0.5% de 1202 casos estudiados, que representaron dificultades diagnósticas. Se realizó secuenciación de dichos casos y se observó alteración en el número de copias

de MET en 6 casos y ganancias del número de copias de la porción distal del brazo largo del cromosoma 7 (114).

Todos los casos con fusiones de MET estudiados por el grupo Yeh, mostraron características histopatológicas de tumor de Spitz y se diagnosticaron de nevus de Spitz, tumores de Spitz atípicos o melanoma de Spitz. La clasificación de los tumores de Spitz a lo largo del espectro de benigno a maligno muestra poca reproducibilidad interobservador y esto puede deberse a la mayor diversidad oncogénica en tumores de Spitz en comparación con otros tumores melanocíticos.

Los tumores con fusiones de MET son más frecuentes en pacientes jóvenes (9-29 años, con un promedio de 20 años) similar a lo que observamos en las cohortes de tumores melanocíticos con otras fusiones de quinasas. Yeh et al defienden que las fusiones de MET se asocian con características histopatológicas de Spitz y son más frecuente en pacientes más jóvenes, aunque esto aún no se ha demostrado en otras neoplasias sólidas (114).

Las fusiones de RET son un hallazgo poco frecuente en los tumores de Spitz. Se observan fusiones de RET en menos del 5% de los tumores de Spitz y comúnmente involucran a las parejas de fusión los genes KIF5B y GOLGA5 (71). Se ha demostrado que la fusión de KIF5B-RET promueve la oncogénesis en cáncer de pulmón, y la fusión con GOLGA5 se describió por primera vez en carcinomas papilares de tiroides en niños expuestos a radiactividad en Chernobyl (159). Como los tumores de Spitz con fusión de RET son poco frecuentes y los anticuerpos RET no son fiables con técnica de inmunohistoquímica, hay pocos datos disponibles sobre sus características clínicas e histopatológicas.

En ratones, la sobreexpresión de RET produce una proliferación generalizada de melanocitos, formación de nevus y algunos melanomas. Los melanocitos que expresan fusiones RET muestran activación de PLC γ -1 y de las rutas MAPK / ERK y PI3K / AKT / MTOR (160).

La ventaja de detectar la presencia de fusión de RET es que existen fármacos inhibidores de RET tales como vandetanib o cabozantinib, ambos de uso clínico en el cáncer de tiroides con fusiones RET, que suprimen la actividad oncogénica y que también podrían ser útiles para el tratamiento de tumores de Spitz atípicos o melanomas con este tipo de fusión (64).

Realizamos determinación de RET, MET y ROS1 con sondas de FISH, en nuestra serie, para intentar detectar translocaciones que no fueron detectadas con inmunohistoquímica. Pero la dificultad técnica en el uso de ésta sonda, y la baja frecuencia de casos, dificultan la identificación de casos positivos.

Comparación de las técnicas de inmunohistoquímica con FISH y PCR

Para la detección de cada alteración de las proteínas de fusión en los tumores de Spitz se empleó la técnica de inmunohistoquímica para detectar la expresión proteica. El uso de inmunohistoquímica es más práctico y de mayor disponibilidad y manejo en los laboratorios de anatomía patológica. Se utilizaron las técnicas de hibridación fluorescente in situ (FISH) y PCR para BRAF para confirmar los casos positivos detectados por inmunohistoquímica y detectar falsos negativos.

ALK

Los resultados para ALK con las técnicas empleadas se comentaran por grupos diagnósticos.

Nevus de Spitz

De un total de 71 casos incluidos en nuestra serie con diagnóstico de nevus de Spitz, se obtiene con técnica de inmunohistoquímica positividad para ALK en el 8,4% de los casos (n=6), de los cuales el 7% (n=5), tuvieron concordancia con la técnica de FISH, pudiéndose identificar el reordenamiento con la sonda de hibridación y en el 1,4% (n=1), la inmunohistoquímica fue positiva pero el FISH fue negativo. La detección de ALK fue negativa en 65 casos y solo en el 1,4% (n=1), mostró positividad con técnica de FISH.

La mayoría de los casos analizados de los nevus de Spitz tuvieron resultados similares con ambas técnicas empleadas.

Tumor de Spitz atípico

Se incluyeron 26 tumores de Spitz atípicos, de los cuales 26,9% (n=7), fueron positivos con inmunohistoquímica para ALK y en el 23% (n=6) se identificó reordenamiento para ALK, con la sonda de FISH. Un caso 3,85% fue positivo con inmunohistoquímica y negativo con FISH.

Por otra parte el 73% (n=19) fue negativo para ALK, con técnica de inmunohistoquímica y con FISH. Los resultados con inmunohistoquímica y FISH en los tumores de Spitz atípicos fueron similares.

Melanoma de Spitz

Incluimos 18 casos de melanomas de Spitz. No se detectaron casos con reordenamiento para ALK con técnica de inmunohistoquímica ni con FISH.

La concordancia de las determinaciones de ALK con inmunohistoquímica y FISH tiene un coeficiente Kappa de 0,8654, es decir tienen una buena concordancia.

Aunque en los primeros estudios en los que se identificó el reordenamiento para ALK se hizo mediante NGS, que permitía detectar todas las alteraciones del exoma o genoma tumoral. Sin embargo las determinaciones realizadas con FISH y con inmunohistoquímica han demostrado buena correlación con otras técnicas moleculares, por tanto la inmunohistoquímica se puede considerar un método válido y reproducible en la mayoría de los laboratorios para detección de reordenamiento de ALK, a pesar de que tenga como limitación más relevante que no puede detectar la pareja específica del gen de fusión con ALK (151).

NTRK

Los resultados para NTRK con las técnicas empleadas se comentaran por grupos diagnósticos también.

Nevus de Spitz

Cuatro de 71 nevus de Spitz (5,6%) fueron positivos para NTRK con técnica de inmunohistoquímica, en 3 (4,2%) de los cuales se confirmaron con la sonda de FISH. Sólo un caso fue positivo con inmunohistoquímica y negativo con FISH, posiblemente por problemas técnicos con el FISH o porque no se seleccionó las células neoplásicas clonales con el reordenamiento.

Tumor de Spitz atípico

Se estudiaron 26 tumores de Spitz atípicos, de los cuales 7 (26,9%) fueron positivos con inmunohistoquímica y todos ellos se confirmaron con FISH.

El resto de los 19 casos de tumores de Spitz atípicos (73%) fueron negativos para NTRK, de los cuales el 69% (n=18) fueron también negativos con FISH. Hubo un caso (3,8%) que fue negativo con inmunohistoquímica pero positivo con FISH.

Melanoma de Spitz

De los 18 melanomas de Spitz incluidos en el estudio ninguno mostró positividad para NTRK con ninguna de las técnicas empleadas.

El coeficiente Kappa de Cohen en el caso de las determinaciones de NTRK con inmunohistoquímica y FISH tiene un coeficiente Kappa de 0,8995, siendo adecuada la concordancia.

La mayor parte de los estudios detectan las fusiones de NTRK mediante la secuenciación de siguiente generación (NGS), sin embargo, los análisis moleculares siguen siendo costosos a pesar de que tengan como ventajas que disminuyen el tiempo, los errores y la posibilidad de alteraciones del ácido nucleico. Por otro lado la técnica de inmunohistoquímica es un método bien establecido, generalmente menos costoso y rápido en comparación con las pruebas moleculares actuales y es el que se usa habitualmente en los laboratorios de anatomía patológica.

Hechtman et al, demostraron que las fusiones de NTRK son mutuamente excluyentes con respecto a otras alteraciones de oncogenes como de KRAS, NRAS y BRAF. La inmunohistoquímica detecta aproximadamente el 95% de los casos positivos y es 100% específico para fusiones NTRK. Esta alta especificidad refleja la expresión muy restringida de NTRK en tejidos no tumorales. De hecho, en estos tejidos, la expresión fisiológica de NTRK de tipo salvaje, puede limitar la interpretación de los resultados con técnicas de inmunohistoquímica (161).

BRAF

Los resultados para BRAF con las técnicas empleadas se comentaran por grupos diagnósticos.

Nevus de Spitz

Con la técnica de inmunohistoquímica con el anticuerpo VE1, el cuál es un anticuerpo monoclonal para la determinación BRAF V600E, se analizaron 71 nevus de Spitz y luego se realizó técnica de PCR para confirmación.

Con técnica de inmunohistoquímica se obtuvo positividad en el 5,6% (n=4), siendo solamente positivos el 1,4% (n=1) con PCR.

El resto, correspondiente a 67 casos fueron negativos tanto con técnica de inmunohistoquímica como con PCR.

Tumor de Spitz atípico

De 26 casos, el 15,3% (n=4), fueron positivos con inmunohistoquímica para BRAF con inmunohistoquímica, de los cuales el 11,5% (n=3) fueron confirmados por PCR, sin embargo un caso fue negativo por PCR.

Veintidos casos (84,6%) fueron casos negativos para la mutación BRAF V600E con ambas técnicas utilizadas.

Melanoma de Spitz

De los 18 melanomas de Spitz, el 50% (n=9) fueron positivos con técnica de inmunohistoquímica y PCR, mientras que el otro 50% fue también negativo con ambas técnicas. En este caso hubo una buena concordancia en ambos métodos.

Se calcula el coeficiente Kappa de Cohen en el caso de las determinaciones de BRAF con inmunohistoquímica y PCR tiene un coeficiente Kappa de 0,8471, siendo adecuada la concordancia.

La mutación de BRAF más frecuente en las lesiones melanocíticas es la V600E, el método habitualmente empleado es la técnica de PCR, ya que es una técnica relativamente rápida, muy sensible y específica. Sin embargo es mucho más accesible la realización de determinaciones con inmunohistoquímica.

Varios autores han determinado las diferencias entre ambas técnicas (inmunohistoquímica y PCR) en otras neoplasias, un ejemplo de ellos es el realizado por el grupo de Kowalska quienes estudiaron 140 casos con carcinoma papilar de tiroides; utilizando inmunohistoquímica con dos protocolos de tinción y con PCR mediante método Sanger y PCR a tiempo real. Se detectó la mutación de BRAF V600E en el 57,1% (80/140) pacientes por inmunohistoquímica con el primer método y 62,9% (88/140) pacientes por inmunohistoquímica con el segundo método. La mayor correlación en la detección de la mutación BRAF V600E se encontró entre inmunohistoquímica con el segundo método y PCR en tiempo real 94,2%, y 83,9%, respectivamente. Las correlaciones entre inmunohistoquímica con el primer método y Sanger y entre inmunohistoquímica con el segundo método y Sanger fueron 71,5% y 76,2%, respectivamente. Por tanto los autores concluyen que existe una falta de concordancia entre la detección de BRAF V600E por inmunohistoquímica y los métodos moleculares y que los métodos de inmunohistoquímica no pueden reemplazar los métodos moleculares para la detección de la mutación BRAF V600E (162).

Otros grupos han intentado reproducir estos estudios en pacientes con melanoma. Heffron et al estudiaron 132 pacientes, para determinación de mutaciones de BRAF con inmunohistoquímica y PCR. La incidencia de la mutación BRAF en esta cohorte fue de 28,8% (38/132). El anticuerpo tuvo una sensibilidad del 86,1% con una especificidad del 96,9%; el valor predictivo positivo fue 96,9%; y el valor predictivo negativo fue de 94,4%. La tasa de concordancia entre PCR e inmunohistoquímica fue de 95,1% (116/122). Los autores concluyen por tanto que la tasa de mutación BRAF fue de 28.8%, que fue menor que lo anteriormente publicado (40%-60%), sin embargo la alta concordancia de PCR e inmunohistoquímica, hacen de ésta última un método viable y rentable como una buena alternativa a la prueba de PCR y adecuada como para la detección de la mutación BRAF (163).

Riveiro-Falkenbach y colaboradores compararon los resultados de dos test para la detección de mutación de BRAFV600 en pacientes con melanoma primario y metastásico. Usaron RT-PCR Cobas® e inmunohistoquímica. De los 239 tumores examinados, 208 tumores mostraron resultados similares a los

obtenidos con Cobas®, mientras que 31 casos con inmunohistoquímica fueron discordantes. Un total de 112 muestras tenían la mutación BRAFV600E tanto con Cobas® e inmunohistoquímica, mientras que 96 muestras fueron de tipo “salvaje” con ambas técnicas. Veinticinco muestras tenían mutación de BRAF con inmunohistoquímica pero eran de tipo “salvaje” con Cobas®, y 6 eran de tipo “salvaje” con inmunohistoquímica pero mutadas según Cobas®. El porcentaje de las muestras que fueron consistentes fueron 87.03% (95% de confianza intervalo 82.56-91.50), y el valor de Kappa fue 0.7411 (95% intervalo de confianza 0.6571-0.8250). Estos resultados indican una buena concordancia entre las dos técnicas (164).

Análisis del algoritmo predictor

En un intento de integrar los hallazgos moleculares y las características clínico morfológicas de las neoplasias del espectro de los tumores de Spitz. El objetivo principal es crear un algoritmo simple que pueda ser útil en la práctica diaria para orientar nuestra decisión en realizar determinaciones moleculares en base a los hallazgos clínico-morfológicos.

El algoritmo se basa en los resultados del modelo ajustado del análisis multivariante, en el que se presenta cada variable con su magnitud de presentar el desenlace clínico. Se plantea el algoritmo iniciando con una lesión melanocítica, para estudio histológico. Si el tumor tiene características de melanoma de Spitz es probable que el tumor albergue una mutación de BRAF (*OR: 13,38, p=0,0004*) y si tiene citología epitelioide (*OR 6,71; p=0,0177*) ya que el paciente pueda ser candidato a tratamientos específicos como es el caso de Vemurafenib. Si el tumor está constituido por una citología diferente a la epitelioide, se debe tomar en cuenta otras determinaciones moleculares como ALK, NTRK, ROS-1, HRAS, MET, RET.

Cuando el tumor no sea un melanoma de Spitz, se debe considerar que no esté asociado a componente epidérmico (*OR 4,20, p=0,031*), ya que puede tener reordenamiento de ALK en el caso de tratarse de un tumor de Spitz atípico (*OR*

4,20, $p=0,031$), el cual si el paciente puede ser candidato a tratamiento con Crizotinib. Por otra parte en los tumores de Spitz atípicos, no puede descartarse la posible mutación para BRAF ($OR: 3,63, p=0,0985$) y BAP-1.

Un tumor de Spitz atípico podría estar asociado a fusión de NTRK ($OR 8,76, p=0,0072$), además hay que considerar las células de morfología mixta en el tumor ($OR 39,40, p=0,0073$). También la presencia de infiltrado inflamatorio puede estar asociado a fusión de NTRK ($OR 12,23, p=0,0307$). En el caso de que un paciente con un tumor de Spitz atípico con criterios clínicos de mal pronóstico podría ser candidato a tratamiento con Entrectenib.

Si un tumor de Spitz atípico no tiene ninguna de las características histológica antes mencionada o si no muestra reordenamientos de ALK, NTRK o BRAF, es necesario hacer determinación de ROS-1, HRAS, MET y RET.

Si es un nevus de Spitz, a pesar que no tenga ninguna implicación terapéutica, se pueden hacer determinaciones moleculares para una mejor clasificación tumoral. Principalmente se debe determinar ALK, NTRK, BRAF, HRAS, ROS-1, MET y RET.

Si no se trata de un tumor de Spitz, se debe determinar la posible mutación de BRAF, siendo muy probable dicha mutación en los nevus convencionales ($OR 29,51, p<0,001$) y en los melanomas convencionales ($OR 4,42, p=0,033$). Existe un tratamiento específico para esta diana terapéutica como lo es Vemurafenib.

Este algoritmo debe ser validado en estudios que puedan incluir más parámetros para poder clasificar a las lesiones de una manera más precisa, sin embargo, en nuestro caso al considerar solo las variables estadísticamente significativas se limita los elementos a considerar básicamente si una neoplasia melanocítica pueda tener un reordenamiento de ALK, NTRK o mutación de BRAF.

Fortalezas

Una vez evaluados los resultados obtenidos consideramos conveniente resaltar los puntos más valiosos de nuestro estudio:

- ✓ Una de las principales fortalezas de nuestra serie es centrar el estudio en lesiones melanocíticas de Spitz, ya que son lesiones que representan actualmente grandes dificultades diagnósticas y que tienen una incidencia alta en pacientes jóvenes, por lo que serían la principal población beneficiada en el correcto diagnóstico y posterior tratamiento.
- ✓ Integrar los hallazgos clínicos, histológicos, moleculares de este tipo de lesiones para poder mejorar su clasificación.
- ✓ La colaboración multicéntrica permitió incluir un mayor número de casos, que no se tenían disponibles en nuestro centro.
- ✓ En nuestro estudio participaron 3 expertos dermatopatólogos que pudieron confirmar el diagnóstico histológico para intentar clasificar las lesiones dudosas.
- ✓ Utilizar como primer método de clasificación con técnicas de inmunohistoquímica, que es una técnica accesible en la mayoría de centros de anatomía patológica y que no requiere de un gran entrenamiento para su uso.
- ✓ Plantear algoritmos diagnósticos que puedan servir de referencia para otros estudios más amplios y de esa manera ser guías en el manejo clínico de éstas lesiones.

- ✓ Comparar los resultados no solo con las lesiones melanocíticas de Spitz entre sí, sino también con los nevos y melanomas convencionales.
- ✓ Detectar alteraciones de la vía tirosin quinasa permite identificar oncogenes implicados en la patogénesis de las lesiones y actualmente muchos de ellos sirven como dianas terapéuticas para la utilización de fármacos específicos que mejoran en las lesiones malignas el tiempo libre de progresión de la enfermedad.

Debilidades

- ✓ El limitado tamaño de la muestra pudo haber sido un factor implicado en los resultados de ROS1, MET y RET, tomando en cuenta que los tumores de Spitz son relativamente infrecuentes dentro de las lesiones melanocíticas.
- ✓ Debido a la poca experiencia con la determinación de las alteraciones de la vía tirosin-quinasa, la incorporación de nuevos anticuerpos y técnicas de FISH, hizo difícil la realización e interpretación de los mismos, por lo que se tuvo que usar como referencia lo publicado en estudios previos
- ✓ La ausencia de positividad para MET, RET y ROS1 en los casos estudiados, pudo deberse a la baja incidencia, en el caso de MET y RET, pero también se debe plantear como posibilidad fallos en la fase pre-analítica que pudieron influir en los resultados finales.
- ✓ La determinación de HRAS por limitaciones técnicas no se pudo realizar en toda la muestra, por lo que la proporción de casos obtenidos no fue el esperado.
- ✓ Todos los materiales empleados en este estudio son de alto coste tanto los anticuerpos empleados con las técnicas de inmunohistoquímica como las sondas de FISH, y técnica de PCR, haciendo difícil y limitado su disponibilidad.

- ✓ No se detectó fusión de ROS1, a pesar de que es la fusión más frecuente encontrada en los tumores de Spitz por la mayoría de los autores. Tenemos la hipótesis que se debe a que la mayoría de estudios emplean técnicas de secuenciación para su detección, por lo que sería conveniente validar en los tumores de Spitz con el uso del anticuerpo de ROS1 para saber si es válido para su determinación en la práctica clínica o si no es recomendable y debe solo determinarse mediante técnicas moleculares.
- ✓ En el caso de MET y RET, tampoco se identificaron casos con estas fusiones. Algunos casos con técnica de inmunohistoquímica mostraban una tinción débil pero que no pudo ser confirmada con las sondas de FISH, por lo que quedarían por validar ambas técnicas para saber si son útiles en este tipo de fusiones, teniendo en cuenta la limitación de que ambas son alteraciones de baja frecuencia y su detección requiere una serie muy amplia o técnicas más sensibles como secuenciación genética.
- ✓ En el algoritmo planteado como predictor, se incluyen ciertas variables que en nuestro estudio fueron estadísticamente significativas para poder sub clasificar y agrupar a las lesiones melanocíticas en grupos y poder discriminar cuales tienen más probabilidad de albergar un tipo de translocación de la vía tirosin quinasa que otra. Sin embargo dada a la limitación del tamaño de la muestra hubo muchas variables que no se incluyeron en el algoritmo. Sería recomendable ampliar el estudio con muestras más amplias, para que los algoritmos resulten más robustos incluyendo más variables, y de ésta manera se puedan convertir en una herramienta de uso clínico diario.
- ✓ Por razones de diseño del estudio, no se realizó seguimiento de la evolución clínica de cada paciente, tomando en cuenta las características clínicas, histológicas y moleculares, ya que sería interesante en estudios futuros conocer cuál es el comportamiento biológico de lesiones melanocíticas de acuerdo al tipo de reordenamientos que expresan.

CONCLUSIONES

- 1) Los tumores de Spitz son lesiones frecuentes en personas jóvenes, a pesar que su incidencia con respecto a nevus y melanomas es menor. Son frecuentes en mujeres y están localizadas predominantemente en miembros superiores e inferiores.
- 2) La alteración de la vía tirosin-quinasa más frecuente detectada es la mutación de BRAF, seguida del reordenamiento de ALK, seguida de NTRK, mutación de BAP-1/BRAF y por último HRAS. No se identificaron casos con fusiones de ROS1, MET y RET.
- 3) La mutación de BRAF se asocia en primer lugar con el diagnóstico de nevus convencional, seguido de melanoma de Spitz, melanoma convencional y tumor de Spitz atípico; así como la morfología citológica de tipo epitelioides.
- 4) El reordenamiento de ALK se asocia con el diagnóstico de tumor de Spitz atípico y la ausencia de componente epidérmico.
- 5) La fusión de NTRK se asocia con el diagnóstico de tumor de Spitz atípico, citología de tipo mixto o fusiforme y la presencia de inflamación.
- 6) Los resultados obtenidos en las determinaciones de los reordenamientos de ALK y NTRK, se observaron de forma exclusiva en los tumores de Spitz.
- 7) Los resultados con las técnicas de inmunohistoquímica tienen una buena concordancia con los resultados con FISH y PCR. Por tanto podría ser considerada una técnica válida y útil para ser usada en los tumores de Spitz.
- 8) La presencia de las alteraciones de la vía tirosín quinasa en el espectro histopatológico de los tumores de Spitz sugiere que es un evento temprano en la progresión tumoral de estas neoplasias.
- 9) El algoritmo propuesto es únicamente una herramienta más que podría ser útil en la práctica diaria, para predecir alteraciones moleculares usando características clínico-histológicas.

10) La detección de nuevas vías oncogénicas que implican receptores de la vía tirosin quinasa es de gran utilidad ya que constituyen dianas terapéuticas, que actualmente disponen de fármacos aprobados por la FDA.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2012;12:390-9.
2. Sagebiel RW, Rorsman H. Ultrastructural identification of melanoc human embryos. *J Invest Dermatol.* 1970;54:96.
3. Smack DP, Korge BP, James WD. Keratin and keratinization. *J Am Acad Dermatol.* 1994;(30):85-102.
4. Elder DE, Johnson BL Jr, Elenitsas R, eds. Histology of the skin. In: Elder DE, Johnson BL Jr, Elenitsas R, eds. *Lever's Histopathology of the Skin.* 9th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. 35 p.
5. Seiberg M. Keratinocyte-melanocyte interactions during melanosome transfer. *Pigment Cell Res.* 2001;14:236-42.
6. Dulon M, Weichenthal M, Blettner M, Breitbart M, Hetzer M, Greinert R, et al. Sun exposure and number of nevi in 5- to 6-year-old European children. *J Clin Epidemiol.* noviembre de 2002;55(11):1075-81.
7. Buendía-Eisman A, Paláu-Lázaro MC, Arias-Santiago S, Cabrera-León A, Serrano-Ortega S. Prevalence of melanocytic nevi in 8- to 10-year-old children in Southern Spain and analysis of associated factors. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* diciembre de 2012;26(12):1558-64.
8. Zalaudek I, Schmid K, Marghoob AA, Scope A, Manzo M, Moscarella E, et al. Frequency of dermoscopic nevus subtypes by age and body site: a cross-sectional study. *Arch Dermatol.* junio de 2011;147(6):663-70.
9. Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. The transformation rate of moles (melanocytic nevi) into cutaneous melanoma: a population-based estimate. *Arch Dermatol.* marzo de 2003;139(3):282-8.
10. Hurwitz RM. Atypical or typical pagetoid cell: a subtle clue to differentiate a melanoma from a melanocytic nevus. *Dermatol Pract Concept.* 30 de abril de 2013;3(2):9-11.
11. Spatz A, Barnhill RL. The Spitz tumor 50 years later: revisiting a landmark contribution and unresolved controversy. *J Am Acad Dermatol.* febrero de 1999;40(2 Pt 1):223-8.
12. Allen AC. Juvenile melanomas of children and adults and melanocarcinomas of children. *Arch Dermatol.* septiembre de 1960;82:325-35.
13. Johnson BL, Honig PJ, Jaworsky C. *Pediatric Dermatopathology.* Newton, MA: Butterworth-Heinemann; 1994.
14. Information NC for B, Pike USNL of M 8600 R, MD B, Usa 20894. A new perspective for spitz tumors? [*Am J Dermatopathol.* 2005] - - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 18 de abril de 2015]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
15. Spitz S. Melanomas of childhood. *Am J Pathol.* mayo de 1948;24(3):591-609.

16. Menezes FD, Mooi WJ. Spitz Tumors of the Skin. *Surg Pathol Clin.* junio de 2017;10(2):281-98.
17. Smith KJ, Barrett TL, Skelton HG, Lupton GP, Graham JH. Spindle cell and epithelioid cell nevi with atypia and metastasis (malignant Spitz nevus). *Am J Surg Pathol.* noviembre de 1989;13(11):931-9.
18. Barnhill RL, Argenyi ZB, From L, Glass LF, Maize JC, Mihm MC, et al. Atypical Spitz nevi/tumors: lack of consensus for diagnosis, discrimination from melanoma, and prediction of outcome. *Hum Pathol.* mayo de 1999;30(5):513-20.
19. Casso EM, Grin-Jorgensen CM, Grant-Kels JM. Spitz nevi. *J Am Acad Dermatol.* diciembre de 1992;27(6 Pt 1):901-13.
20. Herreid PA, Shapiro PE. Age distribution of Spitz nevus vs malignant melanoma. *Arch Dermatol.* marzo de 1996;132(3):352-3.
21. McCormack CJ, Conyers RK, Scolyer RA, Kirkwood J, Speakman D, Wong N, et al. Atypical Spitzoid neoplasms: a review of potential markers of biological behavior including sentinel node biopsy. *Melanoma Res.* octubre de 2014;24(5):437-47.
22. Ludgate MW, Fullen DR, Lee J, Lowe L, Bradford C, Geiger J, et al. The atypical Spitz tumor of uncertain biologic potential: a series of 67 patients from a single institution. *Cancer.* 1 de febrero de 2009;115(3):631-41.
23. Ferrara G, Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, Di Blasi A, Pellacani G, et al. The spectrum of Spitz nevi: a clinicopathologic study of 83 cases. *Arch Dermatol.* noviembre de 2005;141(11):1381-7.
24. Vollmer RT. Use of Bayes rule and MIB-1 proliferation index to discriminate Spitz nevus from malignant melanoma. *Am J Clin Pathol.* octubre de 2004;122(4):499-505.
25. Yazdan P, Cooper C, Sholl LM, Busam K, Rademaker A, Weitner BB, et al. Comparative analysis of atypical spitz tumors with heterozygous versus homozygous 9p21 deletions for clinical outcomes, histomorphology, BRAF mutation, and p16 expression. *Am J Surg Pathol.* mayo de 2014;38(5):638-45.
26. Ferlay J, Shin H-R, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 15 de diciembre de 2010;127(12):2893-917.
27. Qin J, Berwick M, Ashbolt R, Dwyer T. Quantifying the change of melanoma incidence by Breslow thickness. *Biometrics.* septiembre de 2002;58(3):665-70.
28. Dennis LK, Vanbeek MJ, Beane Freeman LE, Smith BJ, Dawson DV, Coughlin JA. Sunburns and risk of cutaneous melanoma: does age matter? A comprehensive meta-analysis. *Ann Epidemiol.* agosto de 2008;18(8):614-27.
29. LeBoit P, Burg G, Weedon D, et al. Melanocytic tumors. In: LeBoit PE, Burg G, Weedon D, et al, editors. Lyon (France): IARC Press; 2006. p. 49–120.
30. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* noviembre de 1970;172(5):902-8.

31. Niebling MG, Haydu LE, Karim RZ, Thompson JF, Scolyer RA. Reproducibility of AJCC Staging Parameters in Primary Cutaneous Melanoma: An Analysis of 4,924 Cases. *Ann Surg Oncol*. 13 de julio de 2013;20(12):3969-75.
32. Allen AC, Spitz S. Malignant melanoma; a clinicopathological analysis of the criteria for diagnosis and prognosis. *Cancer*. enero de 1953;6(1):1-45.
33. Kamino H. Spitzoid melanoma. *Clin Dermatol*. diciembre de 2009;27(6):545-55.
34. Hamre MR, Chuba P, Bakhshi S, Thomas R, Severson RK. Cutaneous melanoma in childhood and adolescence. *Pediatr Hematol Oncol*. agosto de 2002;19(5):309-17.
35. Schmid-Wendtner MH, Berking C, Baumert J, Schmidt M, Sander CA, Plewig G, et al. Cutaneous melanoma in childhood and adolescence: an analysis of 36 patients. *J Am Acad Dermatol*. junio de 2002;46(6):874-9.
36. Argenziano G, Catricalà C, Ardigò M, Buccini P, De Simone P, Eibenschutz L, et al. Seven-point checklist of dermoscopy revisited. *Br J Dermatol*. abril de 2011;164(4):785-90.
37. Magro CM, Yaniv S, Mihm MC. The superficial atypical Spitz tumor and malignant melanoma of superficial spreading type arising in association with the superficial atypical Spitz tumor: A distinct form of dysplastic Spitzoid nevomelanocytic proliferation. *J Am Acad Dermatol*. mayo de 2009;60(5):814-23.
38. Lallas A, Moscarella E, Longo C, Kyrgidis A, de Mestier Y, Vale G, et al. Likelihood of finding melanoma when removing a Spitzoid-looking lesion in patients aged 12 years or older. *J Am Acad Dermatol*. enero de 2015;72(1):47-53.
39. Davies M, Samuels Y. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*. 14 de octubre de 2010;29(41):5545-55.
40. van Engen-van Grunsven ACH, Kusters-Vandeveld H, Groenen PJTA, Blokx WAM. Update on Molecular Pathology of Cutaneous Melanocytic Lesions: What is New in Diagnosis and Molecular Testing for Treatment? *Front Med*. 2014;1:39.
41. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 27 de junio de 2002;417(6892):949-54.
42. Maldonado JL, Fridlyand J, Patel H, Jain AN, Busam K, Kageshita T, et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst*. 17 de diciembre de 2003;95(24):1878-90.
43. Takata M, Murata H, Saida T. Molecular pathogenesis of malignant melanoma: a different perspective from the studies of melanocytic nevus and acral melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. febrero de 2010;23(1):64-71.
44. Whiteman DC, Pavan WJ, Bastian BC. The melanomas: a synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin. *Pigment Cell Melanoma Res*. octubre de 2011;24(5):879-97.

45. Dhomen N, Marais R. BRAF signaling and targeted therapies in melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* junio de 2009;23(3):529-45, ix.
46. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet.* enero de 2003;33(1):19-20.
47. Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:239-71.
48. van Dijk MCRF, Bernsen MR, Ruiter DJ. Analysis of mutations in B-RAF, N-RAS, and H-RAS genes in the differential diagnosis of Spitz nevus and spitzoid melanoma. *Am J Surg Pathol.* septiembre de 2005;29(9):1145-51.
49. Lee S, Barnhill RL, Dummer R, Dalton J, Wu J, Pappo A, et al. TERT Promoter Mutations Are Predictive of Aggressive Clinical Behavior in Patients with Spitzoid Melanocytic Neoplasms. *Sci Rep.* 10 de junio de 2015;5:11200.
50. Gerami P, Cooper C, Bajaj S, Wagner A, Fullen D, Busam K, et al. Outcomes of atypical spitz tumors with chromosomal copy number aberrations and conventional melanomas in children. *Am J Surg Pathol.* septiembre de 2013;37(9):1387-94.
51. Gerami P, Scolyer RA, Xu X, Elder DE, Abraham RM, Fullen D, et al. Risk assessment for atypical spitzoid melanocytic neoplasms using FISH to identify chromosomal copy number aberrations. *Am J Surg Pathol.* mayo de 2013;37(5):676-84.
52. Shen L, Cooper C, Bajaj S, Liu P, Pestova E, Guitart J, et al. Atypical spitz tumors with 6q23 deletions: a clinical, histological, and molecular study. *Am J Dermatopathol.* diciembre de 2013;35(8):804-12.
53. Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:779-827.
54. Bastian BC, LeBoit PE, Pinkel D. Mutations and copy number increase of HRAS in Spitz nevi with distinctive histopathological features. *Am J Pathol.* septiembre de 2000;157(3):967-72.
55. Dimonitsas E, Liakea A, Sakellariou S, Thymara I, Giannopoulos A, Stratigos A, et al. An update on molecular alterations in melanocytic tumors with emphasis on Spitzoid lesions. *Ann Transl Med.* junio de 2018;6(12):249.
56. Da Forno PD, Fletcher A, Pringle JH, Saldanha GS. Understanding spitzoid tumours: new insights from molecular pathology. *Br J Dermatol.* enero de 2008;158(1):4-14.
57. Ventii KH, Devi NS, Friedrich KL, Chernova TA, Tighiouart M, Van Meir EG, et al. BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization. *Cancer Res.* 1 de septiembre de 2008;68(17):6953-62.
58. Jensen DE, Proctor M, Marquis ST, Gardner HP, Ha SI, Chodosh LA, et al. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene.* 5 de marzo de 1998;16(9):1097-112.

59. Yu H, Pak H, Hammond-Martel I, Ghram M, Rodrigue A, Daou S, et al. Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 de enero de 2014;111(1):285-90.
60. Ismail IH, Davidson R, Gagné J-P, Xu ZZ, Poirier GG, Hendzel MJ. Germline mutations in BAP1 impair its function in DNA double-strand break repair. *Cancer Res*. 15 de agosto de 2014;74(16):4282-94.
61. Wiesner T, Murali R, Fried I, Cerroni L, Busam K, Kutzner H, et al. A distinct subset of atypical Spitz tumors is characterized by BRAF mutation and loss of BAP1 expression. *Am J Surg Pathol*. junio de 2012;36(6):818-30.
62. Wiesner T, Obenaus AC, Murali R, Fried I, Griewank KG, Ulz P, et al. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet*. octubre de 2011;43(10):1018-21.
63. Carbone M, Ferris LK, Baumann F, Napolitano A, Lum CA, Flores EG, et al. BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MBAITs. *J Transl Med*. 2012;10:179.
64. Wiesner T, He J, Yelensky R, Esteve-Puig R, Botton T, Yeh I, et al. Kinase fusions are frequent in Spitz tumors and spitzoid melanomas. *Nat Commun*. 2014;5:3116.
65. Birchmeier C, Birnbaum D, Waitches G, Fasano O, Wigler M. Characterization of an activated human ros gene. *Mol Cell Biol*. septiembre de 1986;6(9):3109-16.
66. Acquaviva J, Wong R, Charest A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. *Biochim Biophys Acta*. enero de 2009;1795(1):37-52.
67. Sonnenberg-Riethmacher E, Walter B, Riethmacher D, Gödecke S, Birchmeier C. The c-ros tyrosine kinase receptor controls regionalization and differentiation of epithelial cells in the epididymis. *Genes Dev*. 15 de mayo de 1996;10(10):1184-93.
68. Xiong Q, Chan JL, Zong CS, Wang LH. Two chimeric receptors of epidermal growth factor receptor and c-Ros that differ in their transmembrane domains have opposite effects on cell growth. *Mol Cell Biol*. abril de 1996;16(4):1509-18.
69. Zong CS, Zeng L, Jiang Y, Sadowski HB, Wang LH. Stat3 plays an important role in oncogenic Ros- and insulin-like growth factor I receptor-induced anchorage-independent growth. *J Biol Chem*. 23 de octubre de 1998;273(43):28065-72.
70. Rikova K, Guo A, Zeng Q, Possemato A, Yu J, Haack H, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell*. 14 de diciembre de 2007;131(6):1190-203.
71. Wiesner T, He J, Yelensky R, Esteve-Puig R, Botton T, Yeh I, et al. Kinase fusions are frequent in Spitz tumours and spitzoid melanomas. *Nat Commun*. 2014;5:3116.
72. Bergethon K, Shaw AT, Ou S-HI, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 de marzo de 2012;30(8):863-70.

73. Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Lett.* 28 de agosto de 2001;169(2):107-14.
74. Weier HU, Rhein AP, Shadravan F, Collins C, Polikoff D. Rapid physical mapping of the human trk protooncogene (NTRK1) to human chromosome 1q21-q22 by P1 clone selection, fluorescence in situ hybridization (FISH), and computer-assisted microscopy. *Genomics.* 20 de marzo de 1995;26(2):390-3.
75. Nakagawara A, Liu XG, Ikegaki N, White PS, Yamashiro DJ, Nycum LM, et al. Cloning and chromosomal localization of the human TRK-B tyrosine kinase receptor gene (NTRK2). *Genomics.* 20 de enero de 1995;25(2):538-46.
76. Valent A, Danglot G, Bernheim A. Mapping of the tyrosine kinase receptors trkA (NTRK1), trkB (NTRK2) and trkC(NTRK3) to human chromosomes 1q22, 9q22 and 15q25 by fluorescence in situ hybridization. *Eur J Hum Genet EJHG.* abril de 1997;5(2):102-4.
77. Vaishnavi A, Le AT, Doebele RC. TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy. *Cancer Discov.* enero de 2015;5(1):25-34.
78. Amin SM, Haugh AM, Lee CY, Zhang B, Bublely JA, Merkel EA, et al. A Comparison of Morphologic and Molecular Features of BRAF, ALK, and NTRK1 Fusion Spitzoid Neoplasms. *Am J Surg Pathol.* abril de 2017;41(4):491-8.
79. Farago AF, Le LP, Zheng Z, Muzikansky A, Drilon A, Patel M, et al. Durable Clinical Response to Entrectinib in NTRK1-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer.* diciembre de 2015;10(12):1670-4.
80. Doebele RC, Davis LE, Vaishnavi A, Le AT, Estrada-Bernal A, Keysar S, et al. An Oncogenic NTRK Fusion in a Patient with Soft-Tissue Sarcoma with Response to the Tropomyosin-Related Kinase Inhibitor LOXO-101. *Cancer Discov.* octubre de 2015;5(10):1049-57.
81. Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2 de agosto de 2007;448(7153):561-6.
82. Mariño-Enríquez A, Dal Cin P. ALK as a paradigm of oncogenic promiscuity: different mechanisms of activation and different fusion partners drive tumors of different lineages. *Cancer Genet.* noviembre de 2013;206(11):357-73.
83. Busam KJ, Kutzner H, Cerroni L, Wiesner T. Clinical and pathologic findings of Spitz nevi and atypical Spitz tumors with ALK fusions. *Am J Surg Pathol.* julio de 2014;38(7):925-33.
84. Botton T, Yeh I, Nelson T, Vemula SS, Sparatta A, Garrido MC, et al. Recurrent BRAF kinase fusions in melanocytic tumors offer an opportunity for targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* noviembre de 2013;26(6):845-51.
85. Takahashi M, Cooper GM. ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol Cell Biol.* abril de 1987;7(4):1378-85.
86. Arighi E, Borrello MG, Sariola H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* octubre de 2005;16(4-5):441-67.

87. Truzzi F, Marconi A, Lotti R, Dallaglio K, French LE, Hempstead BL, et al. Neurotrophins and their receptors stimulate melanoma cell proliferation and migration. *J Invest Dermatol.* agosto de 2008;128(8):2031-40.
88. Stella MC, Comoglio PM. HGF: a multifunctional growth factor controlling cell scattering. *Int J Biochem Cell Biol.* diciembre de 1999;31(12):1357-62.
89. Cooper CS, Park M, Blair DG, Tainsky MA, Huebner K, Croce CM, et al. Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. *Nature.* 6 de septiembre de 1984;311(5981):29-33.
90. Maestrini E, Tamagnone L, Longati P, Cremona O, Gulisano M, Bione S, et al. A family of transmembrane proteins with homology to the MET-hepatocyte growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 de enero de 1996;93(2):674-8.
91. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell.* abril de 2003;3(4):347-61.
92. Siegfried JM, Weissfeld LA, Singh-Kaw P, Weyant RJ, Testa JR, Landreneau RJ. Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 1 de febrero de 1997;57(3):433-9.
93. Christensen JG, Burrows J, Salgia R. c-Met as a target for human cancer and characterization of inhibitors for therapeutic intervention. *Cancer Lett.* 8 de julio de 2005;225(1):1-26.
94. Ma PC, Maulik G, Christensen J, Salgia R. c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition. *Cancer Metastasis Rev.* diciembre de 2003;22(4):309-25.
95. Roh MR, Eliades P, Gupta S, Tsao H. Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res.* noviembre de 2015;28(6):661-72.
96. Busam KJ. Molecular pathology of melanocytic tumors. *Semin Diagn Pathol.* 1 de noviembre de 2013;30(4):362-74.
97. 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.* 17 de noviembre de 2005;353(20):2135-47.
98. Solus JF, Kraft S. Ras, Raf, and MAP kinase in melanoma. *Adv Anat Pathol.* julio de 2013;20(4):217-26.
99. McCalmont TH, Vemula S, Sands P, Bastian BC. Molecular-microscopical correlation in dermatopathology. *J Cutan Pathol.* abril de 2011;38(4):324-6, 323.
100. Kutzner H, Metzler G, Argenyi Z, Requena L, Palmedo G, Mentzel T, et al. Histological and genetic evidence for a variant of superficial spreading melanoma composed predominantly of large nests. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* junio de 2012;25(6):838-45.
101. Fang Y, Dusza S, Jhanwar S, Busam KJ. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis of melanocytic nevi and melanomas: sensitivity, specificity, and

- lack of association with sentinel node status. *Int J Surg Pathol*. octubre de 2012;20(5):434-40.
102. Gaiser T, Kutzner H, Palmedo G, Siegelin MD, Wiesner T, Bruckner T, et al. Classifying ambiguous melanocytic lesions with FISH and correlation with clinical long-term follow up. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. marzo de 2010;23(3):413-9.
 103. Cheng DT, Mitchell TN, Zehir A, Shah RH, Benayed R, Syed A, et al. Memorial Sloan Kettering-Integrated Mutation Profiling of Actionable Cancer Targets (MSK-IMPACT): A Hybridization Capture-Based Next-Generation Sequencing Clinical Assay for Solid Tumor Molecular Oncology. *J Mol Diagn JMD*. mayo de 2015;17(3):251-64.
 104. Busam KJ, Sung J, Wiesner T, von Deimling A, Jungbluth A. Combined BRAF(V600E)-positive melanocytic lesions with large epithelioid cells lacking BAP1 expression and conventional nevomelanocytes. *Am J Surg Pathol*. febrero de 2013;37(2):193-9.
 105. Busam KJ, Wanna M, Wiesner T. Multiple epithelioid Spitz nevi or tumors with loss of BAP1 expression: a clue to a hereditary tumor syndrome. *JAMA Dermatol*. marzo de 2013;149(3):335-9.
 106. 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*. 21 de agosto de 2006;95(4):496-505.
 107. Kaye VN, Dehner LP. Spindle and epithelioid cell nevus (Spitz nevus). Natural history following biopsy. *Arch Dermatol*. diciembre de 1990;126(12):1581-3.
 108. Urso C. Time to reconsider Spitzoid neoplasms? *Dermatol Pract Concept*. abril de 2016;6(2):43-8.
 109. Su LD, Fullen DR, Sondak VK, Johnson TM, Lowe L. Sentinel lymph node biopsy for patients with problematic spitzoid melanocytic lesions: a report on 18 patients. *Cancer*. 15 de enero de 2003;97(2):499-507.
 110. Roaten JB, Partrick DA, Pearlman N, Gonzalez RJ, Gonzalez R, McCarter MD. Sentinel lymph node biopsy for melanoma and other melanocytic tumors in adolescents. *J Pediatr Surg*. enero de 2005;40(1):232-5.
 111. Lallas A, Kyrgidis A, Ferrara G, Kittler H, Apalla Z, Castagnetti F, et al. Atypical Spitz tumours and sentinel lymph node biopsy: a systematic review. *Lancet Oncol*. abril de 2014;15(4):e178-183.
 112. Wiesner T, Kutzner H, Cerroni L, Mihm MC, Busam KJ, Murali R. Genomic aberrations in spitzoid melanocytic tumours and their implications for diagnosis, prognosis and therapy. *Pathology (Phila)*. febrero de 2016;48(2):113-31.
 113. Surriga O, Rajasekhar VK, Ambrosini G, Dogan Y, Huang R, Schwartz GK. Crizotinib, a c-Met inhibitor, prevents metastasis in a metastatic uveal melanoma model. *Mol Cancer Ther*. diciembre de 2013;12(12):2817-26.
 114. Yeh I, Botton T, Talevich E, Shain AH, Sparatta AJ, de la Fouchardiere A, et al. Activating MET kinase rearrangements in melanoma and Spitz tumours. *Nat Commun*. 2015;6:7174.

115. Kasprzyk A, Secker-Walker LM. Increased sensitivity of minimal residual disease detection by interphase FISH in acute lymphoblastic leukemia with hyperdiploidy. *Leukemia*. marzo de 1997;11(3):429-35.
116. Jackson M, Marks L, May GHW, Wilson JB. The genetic basis of disease. *Essays Biochem*. 03 de 2018;62(5):643-723.
117. Emanuel PO, Andea AA, Vidal CI, Missall TA, Novoa RA, Bohlke AK, et al. Evidence behind the use of molecular tests in melanocytic lesions and practice patterns of these tests by dermatopathologists. *J Cutan Pathol*. noviembre de 2018;45(11):839-46.
118. pubmeddev, al SA et. BAP1 protein loss by immunohistochemistry: a potentially useful tool for prognostic prediction in patients with uveal melanoma. - PubMed - NCBI [Internet]. [citado 5 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24247622>
119. Balch CM, Soong S, Gershenwald JE, Thompson JF, Coit DG, Atkins MB, et al. Age as a prognostic factor in patients with localized melanoma and regional metastases. *Ann Surg Oncol*. noviembre de 2013;20(12):3961-8.
120. Balch CM, Thompson JF, Gershenwald JE, Soong S-J, Ding S, McMasters KM, et al. Age as a predictor of sentinel node metastasis among patients with localized melanoma: an inverse correlation of melanoma mortality and incidence of sentinel node metastasis among young and old patients. *Ann Surg Oncol*. abril de 2014;21(4):1075-81.
121. Spatz A, Calonje E, Handfield-Jones S, Barnhill RL. Spitz tumors in children: a grading system for risk stratification. *Arch Dermatol*. marzo de 1999;135(3):282-5.
122. Joosse A, Collette S, Suciú S, Nijsten T, Lejeune F, Kleeberg UR, et al. Superior outcome of women with stage I/II cutaneous melanoma: pooled analysis of four European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trials. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de junio de 2012;30(18):2240-7.
123. Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, Noyes RD, Goydos JS, Beitsch PD, et al. Gender-related differences in outcome for melanoma patients. *Ann Surg*. mayo de 2006;243(5):693-8; discussion 698-700.
124. Joosse A, Collette S, Suciú S, Nijsten T, Patel PM, Keilholz U, et al. Sex is an independent prognostic indicator for survival and relapse/progression-free survival in metastasized stage III to IV melanoma: a pooled analysis of five European organisation for research and treatment of cancer randomized controlled trials. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 de junio de 2013;31(18):2337-46.
125. Dal Pozzo V, Benelli C, Restano L, Gianotti R, Cesana BM. Clinical review of 247 case records of Spitz nevus (epithelioid cell and/or spindle cell nevus). *Dermatol Basel Switz*. 1997;194(1):20-5.
126. Weedon D, Little JH. Spindle and epithelioid cell nevi in children and adults. A review of 211 cases of the Spitz nevus. *Cancer*. julio de 1977;40(1):217-25.

127. Thompson JF, Soong S-J, Balch CM, Gershenwald JE, Ding S, Coit DG, et al. Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 de junio de 2011;29(16):2199-205.
128. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, Thompson JF, Reintgen DS, Cascinelli N, et al. Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 15 de agosto de 2001;19(16):3622-34.
129. Carbone M, Yang H, Pass HI, Krausz T, Testa JR, Gaudino G. BAP1 and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(3):153-9.
130. Saraggi D, Salmaso R, Zamuner C, Munari G, Lanza C, Alaibac MS, et al. Prevalence of ALK gene alterations among the spectrum of plexiform spitzoid lesions. *J Am Acad Dermatol*. octubre de 2018;79(4):728-35.
131. Gammon B, Traczyk TN, Gerami P. Clumped perinuclear BAP1 expression is a frequent finding in sporadic epithelioid Spitz tumors. *J Cutan Pathol*. junio de 2013;40(6):538-42.
132. Moreau JF, Weissfeld JL, Ferris LK. Characteristics and survival of patients with invasive amelanotic melanoma in the USA. *Melanoma Res*. octubre de 2013;23(5):408-13.
133. Huvos AG, Shah JP, Goldsmith HS. A clinicopathologic study of amelanotic melanoma. *Surg Gynecol Obstet*. diciembre de 1972;135(6):917-20.
134. Massi D, Pinzani P, Simi L, Salvianti F, De Giorgi V, Pizzichetta MA, et al. BRAF and KIT somatic mutations are present in amelanotic melanoma. *Melanoma Res*. octubre de 2013;23(5):414-9.
135. Busam KJ, Barnhill RL. Pagetoid Spitz nevus. Intraepidermal Spitz tumor with prominent pagetoid spread. *Am J Surg Pathol*. septiembre de 1995;19(9):1061-7.
136. Tannous ZS, Lerner LH, Duncan LM, Mihm MC, Flotte TJ. Progression to invasive melanoma from malignant melanoma in situ, lentigo maligna type. *Hum Pathol*. junio de 2000;31(6):705-8.
137. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med*. 12 de noviembre de 2015;373(20):1926-36.
138. Bastian BC. Understanding the progression of melanocytic neoplasia using genomic analysis: from fields to cancer. *Oncogene*. 19 de mayo de 2003;22(20):3081-6.
139. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more «personalized» approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. marzo de 2017;67(2):93-9.
140. Gershenwald JE, Ross MI. Sentinel-lymph-node biopsy for cutaneous melanoma. *N Engl J Med*. 5 de mayo de 2011;364(18):1738-45.

141. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long GV, Ross MI et al. Melanoma staging: Evidencebased changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. 2017. 472-92. p.
142. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* febrero de 2006;19 Suppl 2:S71-87.
143. Yeh I, de la Fouchardiere A, Pissaloux D, Mully TW, Garrido MC, Vemula SS, et al. Clinical, histopathologic, and genomic features of Spitz tumors with ALK fusions. *Am J Surg Pathol.* mayo de 2015;39(5):581-91.
144. Kiuru M, Jungbluth A, Kutzner H, Wiesner T, Busam KJ. Spitz Tumors: Comparison of Histological Features in Relationship to Immunohistochemical Staining for ALK and NTRK1. *Int J Surg Pathol.* mayo de 2016;24(3):200-6.
145. Cardili L, Viana CR, Germano A, Fernandes M, Barcellos D, Landman G. Immunoexpression of BAP1, ROS1, and ALK in Spitzoid Melanocytic Tumors. *Int J Surg Pathol.* septiembre de 2018;26(6):514-20.
146. Bastian BC, LeBoit PE, Pinkel D. Mutations and copy number increase of HRAS in Spitz nevi with distinctive histopathological features. *Am J Pathol.* septiembre de 2000;157(3):967-72.
147. van Engen-van Grunsven ACH, van Dijk MCRF, Ruiten DJ, Klaasen A, Mooi WJ, Blokx WAM. HRAS-mutated Spitz tumors: A subtype of Spitz tumors with distinct features. *Am J Surg Pathol.* octubre de 2010;34(10):1436-41.
148. Jiveskog S, Ragnarsson-Olding B, Platz A, Ringborg U. N-ras mutations are common in melanomas from sun-exposed skin of humans but rare in mucosal membranes or unexposed skin. *J Invest Dermatol.* noviembre de 1998;111(5):757-61.
149. Egan CL, Oliveria SA, Elenitsas R, Hanson J, Halpern AC. Cutaneous melanoma risk and phenotypic changes in large congenital nevi: a follow-up study of 46 patients. *J Am Acad Dermatol.* diciembre de 1998;39(6):923-32.
150. Bastian BC, Kashani-Sabet M, Hamm H, Godfrey T, Moore DH, Bröcker EB, et al. Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res.* 1 de abril de 2000;60(7):1968-73.
151. Yeh I, de la Fouchardiere A, Pissaloux D, Mully TW, Garrido MC, Vemula SS, et al. Clinical, histopathologic, and genomic features of Spitz tumors with ALK fusions. *Am J Surg Pathol.* mayo de 2015;39(5):581-91.
152. Demir IE, Tieftrunk E, Schorn S, Friess H, Ceyhan GO. Nerve growth factor & TrkA as novel therapeutic targets in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1866(1):37-50.
153. TRK Inhibitor Shows Early Promise. *Cancer Discov.* enero de 2016;6(1):OF4.
154. Lezcano C, Shoushtari AN, Ariyan C, Hollmann TJ, Busam KJ. Primary and Metastatic Melanoma With NTRK Fusions. *Am J Surg Pathol.* agosto de 2018;42(8):1052-8.

155. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet.* enero de 2003;33(1):19-20.
156. Sharma A, Trivedi NR, Zimmerman MA, Tuveson DA, Smith CD, Robertson GP. Mutant V599E-Braf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res.* 15 de marzo de 2005;65(6):2412-21.
157. Fullen DR, Poynter JN, Lowe L, Su LD, Elder JT, Nair RP, et al. BRAF and NRAS mutations in spitzoid melanocytic lesions. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* octubre de 2006;19(10):1324-32.
158. Gerami P, Busam K, Cochran A, Cook MG, Duncan LM, Elder DE, et al. Histomorphologic assessment and interobserver diagnostic reproducibility of atypical spitzoid melanocytic neoplasms with long-term follow-up. *Am J Surg Pathol.* julio de 2014;38(7):934-40.
159. Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, Lengfelder E, Beimfohr C, Hoelzel D, et al. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* marzo de 2000;6(3):1093-103.
160. Kato M, Takahashi M, Akhand AA, Liu W, Dai Y, Shimizu S, et al. Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene.* 8 de octubre de 1998;17(14):1885-8.
161. Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, Drilon A, Zehir A, Frosina D, et al. Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions. *Am J Surg Pathol.* noviembre de 2017;41(11):1547-51.
162. Szymonek M, Kowalik A, Kopczyński J, Gąsior-Perczak D, Pałyga I, Walczyk A, et al. Immunohistochemistry cannot replace DNA analysis for evaluation of BRAF V600E mutations in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget.* 26 de septiembre de 2017;8(43):74897-909.
163. O'Brien O, Lyons T, Murphy S, Feeley L, Power D, Heffron CCB. BRAF V600 mutation detection in melanoma: a comparison of two laboratory testing methods. *J Clin Pathol.* noviembre de 2017;70(11):935-40.
164. Riveiro-Falkenbach E, Villanueva CA, Garrido MC, Ruano Y, García-Martín RM, Godoy E, et al. Intra- and Inter-Tumoral Homogeneity of BRAF(V600E) Mutations in Melanoma Tumors. *J Invest Dermatol.* diciembre de 2015;135(12):3078-85.