

**NEVUS DISPLÁSICO: GRADACIÓN DE LA ATIPIA Y
CORRELACIÓN DE LA ATIPIA CON MARCADORES DE
PROLIFERACIÓN Y DE MIGRACIÓN CELULAR.**

**TESIS PARA ACCEDER AL GRADO DE DOCTOR EN LA FACULTAD DE
MEDICINA DE LA UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

PRESENTADA POR MONTSERRAT ARUMI URIA

BARCELONA 2001

-Als meus pares Lluís i Estrella,
pel seu constant i infatigable recolzament

ÍNDICE

ÍNDICE.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	7
I.- INTRODUCCIÓN.....	10
1.- MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS.....	11
2.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	13
2.1.- NEVUS DISPLÁSICO.....	13
2.2.- ANTÍGENO Ki-67.....	18
2.3.- ANTICUERPO HMB-45.....	19
2.4.- ACETIL-COLINA TRANSFERASA (ChAT).....	20
II.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
1.- CORRELACIÓN DEL GRADO DE ATIPIA DE LOS NAA CON HISTORIA PERSONAL DE MELANOMA.....	22
1.1.- SELECCIÓN DE MATERIAL.....	22
1.2.- GRADACIÓN DE LA ATIPIA.....	23
1.2.1.- Atipia leve.....	23
1.2.2.- Atipia moderada.....	24
1.2.3.- Atipia severa.....	26
1.3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
2.- GRADACIÓN DE LA ATIPIA DE LOS NAA Y Ki-67.....	31
2.1.- SELECCIÓN DE MATERIAL.....	31
2.2.- TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA.....	35
2.3.- MÉTODO DE EVALUACIÓN.....	38
2.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	39

3.- GRADACIÓN DE LA ATIPIA DE LOS NAA Y ChAT.....	41
3.1.- SELECCIÓN DE MATERIAL.....	41
3.2.- TÉCNICA INMUNOHISTOQUIMICA.....	43
3.3.- MÉTODO DE EVALUACIÓN.....	45
3.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46
III.- RESULTADOS.....	47
1.- CORRELACIÓN DEL GRADO DE ATIPIA DE LOS NAA CON HISTORIA PERSONAL DE MELANOMA.....	48
2.- GRADACIÓN DE LA ATIPIA DE LOS NAA Y Ki-67.....	53
3.- GRADACIÓN DE LA ATIPIA DE LOS NAA Y ChAT.....	61
3.1.- EXPRESIÓN DE ChAT EN LOS MELANOCITOS.....	61
3.2.- EXPRESIÓN DE ChAT EN LOS QUERATINOCITOS.....	63
4.- ICONOGRAFÍA.....	69
IV.- DISCUSIÓN.....	79
1.- CORRELACIÓN DEL GRADO DE ATIPIA DE LOS NAA CON HISTORIA PERSONAL DE MELANOMA.....	80
2.- GRADACIÓN DE LA ATIPIA DE LOS NAA Y Ki-67.....	84
3.- GRADACIÓN DE LA ATIPIA DE LOS NAA Y ChAT.....	92
V.- CONCLUSIONES.....	95
VI.- BIBLIOGRAFÍA.....	98

AGRADECIMIENTOS

Hay una frase célebre de Rudolf Virchow que dice “ la gente se inspira más por un buen maestro que por un buen trabajo”, y yo quiero agradecer al Profesor Dr. Sergi Serrano Figueras, Jefe de Servicio del Servicio de Patología del Hospital del Mar, todo lo que se de Patología. Él ha sabido transmitirme con sus continuos consejos, a parte de conocimientos, la ilusión por este arte que es ser patólogo. Así mismo, a él le debo la oportunidad de haber podido completar mi formación en EEUU. También quiero agradecerle su continua motivación para la realización de esta tesis.

Al Dr. N Scott McNutt, Director del Servicio de Dermatopatología del New York Presbyterian Hospital-Weill Medical College of Cornell University, quiero agradecerle el que me permitiera estar en su departamento y pusiera los pilares de lo que ha sido esta tesis, pero lo que es mas importante, que haya sido mi principal referencia en el difícil mundo de la Dermatopatología.

Al Dr. Barranco, adjunto del Servicio de Patología del Hospital del Mar, por su inestimable ayuda, su continuo estímulo y consejos tanto durante mi formación como patóloga como durante la realización de esta tesis.

A Jon A.Reed, Jefe de Sección de Dermatopatología del New York Presbyterian Hospital-Weill Medical College of Cornell University, le agradezco todos los consejos e ideas recibidas durante la realización de este trabajo.

Al Profesor José M^a Giménez Camarasa, catedrático y Jefe de Servicio de Dermatología del Hospital del Mar, el estímulo y los consejos prestados para la realización de los aspectos clínicos de esta tesis.

A Josep M^a Manresa, miembro del Servicio de Estadística del Institut Municipal de Investigació Médica, quiero agradecer la colaboración prestada en el proceso e interpretación de los datos estadísticos de la presente tesis.

A Bridget Finnerty, “Master Science” , por su destacada ayuda en la selección y el proceso técnico de las muestras, sin las cuales este proyecto de tesis no hubiera sido posible.

A Nilda L. Morales, responsable de secretaria de Dermatopatología del New York Presbyterian Hospital-Weill Medical College of Cornell University por todas las molestias que le ocasioné y por su continua paciencia en todos los trámites burocráticos de la selección de muestras.

A todo los componentes del Servicio de Patología del Hospital del Mar, quiero agradecerles su estímulo y ayuda en la realización de la presente tesis.

Quiero expresar así mismo mi agradecimiento, en general, a todos los que aquí no puedo mencionar, pero que de una forma u otra han hecho posible la realización de la presente tesis doctoral.

I.- INTRODUCCIÓN

1.- MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS

En el momento actual, la incidencia melanoma maligno está aumentando de forma vertiginosa año tras año. En el año 1995, 32.100 personas desarrollaron esta enfermedad en EEUU y murieron 7.200 pacientes; en el año 1996 se registraron 38.000 nuevos casos, por tanto la incidencia aumentó en un 12% con respecto al año anterior. Con estos datos se puede estimar que si la incidencia en 1980 fue de 1 de cada 250 personas y en 1987 de 1 de cada 135, en el año 2000 la incidencia habrá sido de 1 de cada 75 personas. En el melanoma, el número de nuevos casos diagnosticados crece más rápidamente que en otros tumores malignos y la mortalidad aumenta un 5% por año en la población caucásica. Existen muchas razones que podrían explicar este incremento: aumento de la exposición solar en general, aumento de la cantidad de radiación UVB y UVC en la luz solar y la falta de protección adecuada contra los rayos UVA mediante la utilización de crema de protección solar. La detección precoz del melanoma aumenta el número de casos por año pero no explica la elevación de la mortalidad a causa del melanoma. Asimismo, hay descritos varios factores de riesgo y, consecuentemente, varias poblaciones de riesgo. En este sentido, se ha determinado que el riesgo estaría en relación con factores múltiples, incluyendo el número total de nevus “benignos” mayores de 2mm, el número de nevus clínicamente atípicos mayores de 5mm, la tendencia a la formación de múltiples pecas o léntigos, la propensión a las quemaduras solares, la historia de quemaduras solares especialmente durante la niñez, el tiempo pasado al aire libre en un país soleado antes de los 12 años o entre los 10 y los 24 años, la historia de cáncer no melanocítico, la historia personal de melanoma, la

historia familiar de melanoma y la historia de nevus displásico también conocido como nevus con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos (NAA).⁽¹⁻¹²⁾

Dentro de dichas poblaciones de riesgo, los individuos que tienen nevus displásicos son el objetivo de la investigación presentada. Estas lesiones desde su descripción en 1978^(13,14) han sido tema de controversia en diferentes sentidos, desde el nombre asignado, a los criterios clínicos e histológicos propios que las caracterizan. Asimismo, la gradación de las mismas según su grado de atipia en leve, moderada o severa, ha generado múltiples controversias al basarse en criterios histológicos, quizás susceptibles de cierta subjetividad y por su utilidad o no con respecto al riesgo de padecer melanoma, teniendo en cuenta que no todos los nevus displásicos van a ser “precursores obligados” de melanoma. En este contexto, el presente trabajo pretende evaluar en primer lugar si el grado de atipia de los nevus displásicos tiene alguna relación con el riesgo de desarrollar melanoma y en segundo lugar buscar un marcador que permita realizar una clasificación basada en criterios objetivos no susceptibles de interpretación subjetiva, mediante un análisis de datos clínicos y técnicas inmunohistoquímicas para detectar el antígeno Ki- 67, marcador de proliferación, y la Acetil-Colina Transferasa (ChAT), marcador de migración.

2.- ANTECEDENTES HISTÓRICOS

2.1- NEVUS DISPLÁSICO

Los nevos displásicos fueron descritos en 1978 por dos grupos al mismo tiempo, el grupo de Clark y cols y el de Lynch y cols.^(13,14). Estas lesiones se describieron en dos situaciones clínicas distintas. Inicialmente fueron descritos en pacientes que presentaban un gran número de dichos nevos en pacientes con historia familiar de melanoma, constituyendo el “B-K mole syndrome” según el grupo de Clark⁽¹³⁾ o el “Familial atypical multiple mole melanoma síndrome”(FAMMM) según Lynch⁽¹⁴⁾. Posteriormente, se describió el “síndrome del nevus displásico esporádico” en relación con la presencia de un número menor de estos nevos en pacientes sin historia familiar de melanoma⁽¹⁵⁾. No obstante, cabe destacar que aunque se describió en 1978, ya en el año 1820 Norris⁽¹⁶⁾ y en 1950 Cawley⁽¹⁷⁾ describieron la presencia de melanoma familiar en familias en las que habían pacientes con múltiples nevos además de melanomas. Desde la descripción de los nevos displásicos por Clark et al y Lynch et al, las relaciones exactas con el melanoma familiar y con el riesgo de melanoma individual han sido fuente de controversia

El principio de dicha controversia es la definición básica de esta lesión, tanto desde el punto de vista de sus características clínicas como histológicas⁽¹⁸⁻³²⁾. Clark inicialmente habla de la presencia de hiperplasia melanocítica atípica como sinónimo de displasia melanocítica por la presencia de melanocitos en forma de célula aislada o en forma de pequeños grupos que presentan algunas de las características de los melanocitos malignos, cambios mesenquimales en la

dermis papilar y de un infiltrado linfocitario⁽¹³⁾. El uso del término “displasia” fue centro de múltiples polémicas, no existe una sola y única definición de “displasia” en patología general y por eso su utilización podría llevar a la confusión^(18,20,23-25). En este contexto, se realizaron múltiples estudios para analizar las características histológicas de los mismos y buscar criterios histológicos reproducibles. Algunos de los grupos daban mayor énfasis a las características arquitecturales sin tener en cuenta la citología, mientras que para otros se debían incluir además de los criterios arquitecturales, las características citológicas de los melanocitos^(24,33-46).

Según Clark, se trataba clínicamente de lesiones pigmentadas de forma irregular y coloración variada de más de 5 mm de diámetro⁽¹³⁾. Desde el punto de vista clínico se realizaron muchos estudios para valorar sus características y para estudiar los criterios mas adecuados, el grado de reproducibilidad de los mismos y la correlación con los hallazgos histológicos⁽⁴⁷⁻⁵⁵⁾.

A pesar de todos estos estudios, debieron realizarse dos reuniones de consenso en el NIH de los EEUU. La primera, cuyos resultados se publicaron en 1984, determinó que los criterios histológicos que definían la lesión eran principalmente arquitecturales porque la atipia citológica, aunque era frecuentemente observada, no se consideraba esencial⁽⁵⁶⁾. No obstante, dado que la controversia continuó, se realizó una segunda reunión de consenso en 1992⁽⁵⁷⁾, en la cual se definió el síndrome del nevus displásico como la aparición de melanomas en uno o más de los familiares de primer y segundo grado, presencia de un gran número de nevus (normalmente >50), algunos de los cuales son atípicos y de tamaño variable, y la presencia de características histológicas

distintivas. Estos pacientes presentaban un riesgo de melanoma en su vida del 100% si vivían más de setenta años. Asimismo, se determinó que existían individuos con este tipo de lesiones fuera de un contexto familiar de melanoma y con un número inferior de nevos atípicos, que presentaban un mayor riesgo de presentar melanoma que la población general, aunque inferior al de los casos familiares. Además, en esta reunión, se definieron las características clínicas e histológicas de los nevos “displásicos”. A nivel histológico se puso el énfasis en las características arquitecturales y la atipia de los melanocitos, sugiriéndose que clínicamente se utilizara el término de “nevus atípico” e histológicamente el de “nevus con alteración arquitectural y atipia citológica de los melanocitos, con una estimación del grado de atipia”, ya que algunas de las lesiones podían presentar muy pocos melanocitos atípicos, mientras que en otras la atipia melanocítica podía ser tan extensa y severa que el diagnóstico diferencial con el melanoma in situ podía ser muy difícil⁽⁵⁷⁾. Este último punto, la gradación de atipia, se convirtió en una nueva fuente de controversia con respecto a los criterios a utilizar para su gradación y su reproducibilidad. Aunque Clark nunca gradó los cambios histológicos descritos en los nevos displásicos, otros autores si lo hicieron^(48,58-59).

La presencia de nevos con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos (NAA) en individuos fuera del contexto familiar del síndrome obligó a realizar estudios sobre su prevalencia en la población. Los resultados varían entre un 1,8 – 18 %^(5,60-67), destacando el trabajo de Crutcher y cols⁽⁶²⁾ en el cual la prevalencia de los NAA en la población de Napa Valley de California (EEUU) fue del 4,9% con confirmación histológica, a diferencia de la mayoría

de los trabajos publicados al respecto, que se basan mayoritariamente en hallazgos clínicos.

Los NAA han sido definidos como precursores obligados de melanoma, pero no todos los NAA van a dar lugar a un melanoma. Se han realizado muchos estudios para determinar los factores de riesgo de melanoma, entre ellos los NAA. Aunque un factor de riesgo importante de melanoma sería el número total de nevus del paciente, se ha visto que los NAA serían un factor de riesgo “per se”. No obstante el riesgo relativo (RR) que se ha determinado varía entre un 3,9 y un 8,8^(3,5,66,68-75). Estos datos se han hallado sobretodo en base a observaciones clínicas, excepto el trabajo de Titus-Ernstoff y cols⁽⁴⁾ que refiere un RR de 6,2 para pacientes con NAA y se basa en datos histológicos. Un factor a tener en cuenta en este caso es la correlación clínico-patológica de los NAA. Los resultados obtenidos muestran que bastantes lesiones clasificadas clínicamente como nevus atípico, posteriormente no son confirmadas histológicamente y al revés. Un buen ejemplo de la primera situación son los resultados de Roush y cols⁽⁵⁵⁾ en el que solo el 15% de los nevus clínicamente atípicos y sospechosos de NAA fueron confirmados histológicamente, o el de Grob y cols⁽⁶⁵⁾, en el que solo fueron confirmados un 18%. Por otro lado, en el estudio de Piepkorn y cols⁽⁵¹⁾ se observaron características histológicas de NAA en un 53% de nevus que clínicamente no fueron clasificados como nevus atípicos. Sin embargo, Piepkorn y cols⁽⁵¹⁾ incluyeron lesiones de NAA sin atipia citológica en el estudio mencionado.

A pesar de estos resultados algunos autores que siguen sin creer que los NAA sean un importante factor de riesgo de melanoma, ya que, según ellos, los

nevus que suelen asociarse de forma mayoritaria con el melanoma son los nevus “benignos”^(20,32). En este sentido, se han publicado estudios en los que se ha estudiado la presencia de NAA residual asociado a melanoma, que han dado como resultado que entre un 20-40% de los melanomas presentaban NAA residual asociado al melanoma, más en las lesiones pequeñas que en las grandes. Si se tiene en cuenta que los casos familiares de NAA significan menos de un 5% del total de la incidencia de melanoma, el resto de casos en los que se asocia el NAA a melanoma, deben ser los llamados casos “esporádicos”⁽⁷⁶⁻⁸²⁾.

Un punto a destacar es el que hace referencia a la actitud terapéutica y preventiva con respecto los pacientes que presentan NAA. Por lo que se refiere a los casos familiares, está claro que estos deben ser controlados de cerca y de forma frecuente, recomendándose la utilización de métodos fotográficos en algunos trabajos, y según la mayoría de autores realizar exéresis solo de las lesiones más atípicas o aquellas que han cambiado sus características⁽⁸³⁻⁸⁷⁾. El hecho de que en estos pacientes a lo largo de toda su vida, les aparezcan y desaparezcan nevus, atípicos o no clínicamente, hace desistir de la actitud de extirpar todos o la mayoría de sus nevus atípicos^(88,89). En los casos no familiares o esporádicos, el control del paciente debe realizarse pero no de forma tan frecuente, dependiendo de la autorevisión y la toma de precauciones con respecto a la protección solar. Un punto a tener en cuenta es la vista de conjunto (realización de screenings) para detectar la población de riesgo. En este sentido, el estudio de la relación coste-beneficio no ha aconsejado poner en práctica muchos programas de prevención a gran escala para detectar a la población de riesgo sobretodo en países europeos, a diferencia de los EEUU donde si existen

muchos programas voluntarios para estudiar la población general, aunque si se aconseja realizar campañas publicitarias informativas sobre las medidas preventivas a tomar de forma individual^(67,90-92).

2.2- Antígeno Ki-67

El antígeno Ki-67 es una proteína nuclear no-histona. Los anticuerpos monoclonales anti-Ki67 existentes (MIB-1) detectan dos proteínas no-histonas de 395 y 345 kDa respectivamente. Estas son proteínas nucleares asociadas a proliferación celular que se expresan en todas las fases del ciclo celular excepto en la fase G0 (fase de reposo) y en la fase inicial de G1, es decir, está presente en la fase tardía de G1, fase S, fase G2 y fase M⁽⁹³⁻⁹⁶⁾. Su expresión se ha utilizado como marcador de proliferación celular y como determinante de la fracción de crecimiento celular de las células presentes en los tejidos^(97,98). Consecuentemente, su detección en el presente trabajo nos permite conocer el índice de proliferación de las células a estudio. Este índice puede medirse mediante otros métodos, como sería el recuento de mitosis que detecta el número de células en fase M, detección histoquímica de los AgNOR que detecta las regiones organizadoras nucleolares, la detección de incorporación de análogos de la timidina como la bromodeoxiuridina (BrdU) y la yododeoxiuridina (IdU) que detectan células en fase S, otros antígenos de proteínas asociadas a proliferación celular como el PCNA que se detecta en las mismas fases que el Ki-67, las ciclinas que regulan el paso de una fase a otra del ciclo, las polimerasas y la citometría de flujo⁽⁹⁹⁻¹⁰²⁾.

La expresión de Ki-67 se ha estudiado en numerosas situaciones patológicas, observándose una asociación entre el índice de proliferación y el grado de malignidad en varias de ellas⁽¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾.

En las lesiones melanocíticas, el Ki-67 se ha utilizado como posible marcador pronóstico en la progresión del melanoma. Un alto índice de expresión de Ki-67 en melanomas nodulares primarios con índice de Breslow alto sería un factor de mal pronóstico^(106, 107). En este sentido se demostró la asociación de enfermedad metastásica con un alto índice de Ki-67 en melanomas primarios con Breslow alto, pero no así en melanomas con un índice de Breslow bajo⁽¹⁰⁸⁾. No obstante, existe un estudio en la literatura en el que, con el mismo índice de Breslow, no se demostraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de Ki-67 entre los melanomas que dan lugar a metástasis y los que no lo hacen con el mismo índice de Breslow⁽¹⁰⁹⁾. Respecto a su utilidad práctica, se ha especulado sobre su valor en el diagnóstico diferencial entre el nevus de Spitz y el melanoma, así como entre el melanoma nevoide y los nevus “benignos”^(110,111).

2.3. Anticuerpo HMB-45

El anticuerpo HMB-45 reconoce una glicoproteína presente en los premelanosomas. Este anticuerpo se expresa en los melanomas de forma mayoritaria en un 98% de los casos, excepto en aproximadamente el 50% de los melanomas metastásicos y en menos del 50% de los melanomas desmoplásicos^(112,113). En lesiones névicas, su expresión suele observarse sobretodo en las células névicas dispuestas en tecas de la unión dermo-

epidérmica, y de forma menos intensa o negativa en el componente dérmico, si estos son compuestos o intradérmicos. La presencia de positividad en la parte más superficial del componente dérmico y la disminución del número de células que lo expresan a medida que estas descienden, hasta llegar a no expresarlo en la parte más profunda, se ha relacionado con el proceso de “maduración” de los melanocitos. Existen algunas excepciones como los nevos de Spitz con componente dérmico que pueden mostrar positividad en casi todo el espesor del mismo ^(114,115,116).

2.4- Acetil-colina transferasa (ChAT)

La acetil-colina transferasa es una enzima que sintetiza la acetil-colina del sistema colinérgico. Este sistema tiene dos tipos de receptores, los receptores nicotínicos y los muscarínicos. Este último, es decir, el sistema muscarínico colinérgico es expresado de forma transitoria por las células embrionarias neuronales y no neuronales durante la morfogénesis ⁽¹¹⁷⁾. En esta misma línea, las células de la cresta neural, de las que proceden los melanocitos, también lo expresan durante su proceso de migración ⁽¹¹⁸⁾. Varios estudios sugieren que podría estar relacionado con la regulación del movimiento celular. Asimismo, se ha observado su presencia en varios tumores y en melanomas, que sugieren que dicho mecanismo jugaría un papel en la regulación de la infiltración tumoral y el proceso metastásico ^(119,120).

II.- MATERIAL Y MÉTODOS

1- CORRELACIÓN DEL GRADO DE ATIPIA DE LOS NAA CON HISTORIA PERSONAL DE MELANOMA.

1.1-SELECCIÓN DE MATERIAL

Se revisaron los informes de los 20.272 nevus melanocíticos que fueron recibidos para diagnóstico histopatológico de rutina entre los años 1.989 y 1.996, ambos inclusive, en la División de Dermatopatología del “New York Presbyterian Hospital-Weill Medical College of Cornell University” (por deferencia del Dr N. Scott McNutt). Del total de 20.272 nevus diagnosticados, 6.275 (31%) fueron diagnosticados como nevus con alteración arquitectural (NAA), también denominados nevus displásicos, que a su vez fueron clasificados en tres categorías según su grado de atipia: “leve”, “moderado” y “severo”. Los 6.275 NAA fueron agrupados según el número de pacientes, observándose que pertenecían a 4.481 pacientes. Dichos pacientes con NAA fueron clasificados en tres grupos, según el nevus con mayor grado de atipia que presentaban (leve, moderada o severa) que fue asignado en el momento del diagnóstico, antes de conocerse la historia clínica. Se revisaron los datos clínicos de cada uno de estos 4.481 pacientes para determinar si presentaban historia personal previa de melanoma o no. En los pacientes con historia personal de melanoma, se determinó la edad y el sexo de cada uno de ellos. En el caso de que el paciente presentase varias lesiones con el mismo grado de atipia, se tomó como edad de referencia la que tenía en el momento del primer diagnóstico y, en el caso de que el mismo paciente presentase múltiples lesiones con diferente

grado de atipia, se recogió la edad que tenía el paciente en el momento del diagnóstico del nevus con mayor grado de atipia.

1.2-GRADACIÓN DE LA ATIPIA.

En las biopsias cutáneas se determinó en primer lugar el tipo de lesión névica. Desde 1983 hasta 1996, en el “ New York Presbyterian Hospital-Weill Medical College of Cornell University” en el caso de que se observara la presencia de una lesión melanocítica juntural o compuesta, con elongación y distorsión de las crestas epidérmicas, teclas névicas dispuestas a los lados y en las puntas de las crestas epidérmicas, fibrosis eosinofílica dérmica alrededor de las crestas, extensión del componente juntural más allá del componente dérmico en las lesiones compuestas, y según las características de los melanocitos en cada caso, se consideraba como un nevus con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos (“nevus displásicos”). Durante este tiempo, los nevus que se consideró que tenían alteración arquitectural fueron clasificados en tres grados según la gradación de la atipia de los nevus, como “leves”, “moderados” y “severos”. La base de esta clasificación sigue en parte las recomendaciones del Dr. Martin C. Mihm, Jr, respecto a la clasificación citológica^(59,121), incluyendo los criterios arquitecturales. Los criterios utilizados en el laboratorio se pueden resumir en la tabla 1. A continuación se desarrollan de manera desglaonada.

1.2.1-ATIPIA LEVE:

Los nevus eran básicamente simétricos y en el caso de ser compuestos, estos mostraban una extensión del componente juntural más allá

del componente dérmico, al menos por tres crestas epidérmicas, lo que se conoce como “extensión juntural” o “shoulder”. Las crestas epidérmicas suelen estar ligeramente elongadas y distorsionadas. Asimismo, existe fibrosis dérmica papilar evidente, muchas veces eosinofílica, y ocasionalmente presenta lamelas finas debajo de las puntas de las crestas epidérmicas. Las células névicas están dispuestas tanto de forma individual como en grupos en la unión dermo-epidérmica, estando preferentemente dispuestas en las crestas epidérmicas, con muy poca afectación de la región suprapapilar. A gran aumento, los núcleos de los melanocitos son ovoides o elipsoidales, hipercromáticos, indentados y muchas veces sin nucleolo visible o con nucleolo único muy pequeño. Hay variabilidad considerable de la forma nuclear. El citoplasma frecuentemente está colapsado, formando un espacio claro o halo alrededor de la célula. Para su clasificación, se toman las características citológicas de las células névicas las situadas en la periferia de la unión dermo-epidérmica. No suele observarse migración pagetoide de los melanocitos a capas altas y, en caso de que exista una mínima migración, nunca debe localizarse en la periferia de la lesión. No suelen observarse mitosis en el componente dérmico.

1.2.2-ATIPIA MODERADA

Los nevus retienen su simetría, y presentan un componente juntural que se extiende más allá de tres crestas epidérmicas del componente dérmico. Las crestas epidérmicas también se encuentran frecuentemente elongadas y distorsionadas, formando un complejo de interconexiones, especialmente en

el centro de la lesión. Los márgenes de la lesión están muy bien delimitados de la epidermis adyacente libre de lesión névica. Existe una mezcla de células névicas melanocíticas alargadas dentro del complejo de crestas epidérmicas entremezcladas, formadas por células névicas dispuestas de forma individual y en grupos. La proliferación de células névicas se localiza principalmente en las crestas pero puede afectar las regiones situadas entre las crestas epidérmicas y en el centro de la lesión, aunque nunca en la periferia de la misma. Las tecas están dispuestas de forma irregular a los lados de las crestas epidérmicas elongadas. Las células névicas individuales pueden aparecer dispersas entre los queratinocitos de las crestas, pero la dispersión es realmente mínima en la epidermis por encima de las crestas y en la región situada entre ellas. En el centro de la lesión, pero nunca en la periferia, puede encontrarse migración a capas altas de algunas tecas y de células individuales. Esto es particularmente cierto en las lesiones acrales. La dermis papilar es fibrosa con haces de colágeno eosinofílico. Si existe componente dérmico, las tecas suelen estar dispuestas en grupos separados en un estroma con ocasionales linfocitos y melanófagos. Las tecas en la dermis son generalmente del mismo tamaño o, incluso, más pequeñas que las situadas en la epidermis. La parte dérmica está generalmente limitada a la dermis papilar y puede mostrar muy poca o solo focal disminución en el tamaño del núcleo a medida que desciende a la dermis (lo que se conoce como maduración). A gran aumento, el núcleo de las células névicas es bastante variable en tamaño y en el patrón de cromatina. Muchos melanocitos tienen un tamaño mayor o igual al de los queratinocitos, son hipercromáticos y de forma elipsoidal o

romboidal, con nucleolo visible en el centro del núcleo. El citoplasma suele estar agrandado comparado con los de los melanocitos inactivos normales y no siempre se colapsa ni muestra el halo a su alrededor. En algunas células, se observa melanina finamente dispersa en el citoplasma. No se observa la presencia de mitosis atípicas en el componente intraepidérmico ni de mitosis frecuentes y no atípicas. Tampoco se encuentran mitosis en las células névicas situadas en la parte más profunda de la parte dérmica de la lesión. Puede observarse ocasionalmente alguna mitosis no atípica en la parte superior del componente dérmico, cerca de la epidermis y a nivel anexial.

1.2.3-ATIPIA SEVERA

Los nevos están frecuentemente distorsionados, lo cual pone de manifiesto la dificultad inicial en el diagnóstico diferencial de estos nevos con los melanomas. No obstante, retienen cierta simetría. El componente juntural se extiende más allá del componente dérmico, si se trata de una lesión compuesta. A más aumento, se observan las crestas epidérmicas distorsionadas que contienen teclas irregulares de células névicas que tienden a ser confluentes en algunas áreas de la lesión, observándose fusión de teclas de crestas epidérmicas adyacentes. Las teclas predominan sobre las células individuales, aunque en el centro de la lesión puede existir cierta migración de células individuales si se examina la lesión muy detenidamente. No obstante, no debe existir migración de células névicas individuales en la epidermis situada en la periferia de la lesión, que debe estar bien delimitada. El componente dérmico tiende a ser abundante y las teclas contienen un mayor

número de células de mayor tamaño que en los nevos de menor atipia. Entre las tecas existe colágeno, melanófagos y linfocitos. Es habitual encontrar fibrosis eosinofílica en la dermis, asociada con la distorsión de las crestas epidérmicas. Asimismo, es notable la fibroplasia lamelar en aproximadamente la mitad de los casos. Las características principales de atipia severa resultan evidentes. Los núcleos de las células névicas son alargados y de mayor tamaño (de 1,5x a 2x o más) que los de los queratinocitos. Frecuentemente, existe una mezcla de células con núcleos hipercromáticos y bizarros junto con otras de núcleos más pequeños con cromatina más dispersa. No existe la atipia confluyente que se esperaría encontrar en el melanoma. Los nucleolos normalmente son prominentes. Estas características pueden encontrarse tanto en las células fusiformes como en las epitelioides. Pueden hallarse mitosis en el componente juntural pero nunca en la parte profunda del componente dérmico, en el adulto. La parte dérmica no presenta atipia confluyente, y tiende a mostrar maduración focal en la dermis.

Existen modificaciones de los criterios en ciertas circunstancias: cuando los nevos se dan en niños prepúberes, las tecas normales son más grandes que las de los adultos y el tamaño celular y nuclear puede ser bastante más grande, con nucleolo prominente; se puede ver focos de atipia celular. En los casos en que es posible distinguir entre estos nevos y los nevos de Spitz en niños, entonces pueden clasificarse como nevos con alteración arquitectural (NAA). Nosotros intentamos disminuir el grado en la evaluación de la atipia de estos NAA, de severo a moderado y de moderado a leve en estas

circunstancias. Por el contrario, en los NAA de los adultos, se sobregradan las lesiones cuando existe migración “pagetoide” en la periferia de la lesión, o cuando se encuentran mitosis en la parte más profunda del componente dérmico siendo en estas circunstancias, clasificados como melanoma maligno invasivo.

TABLA 1: Características citológicas e histológicas de los nevus melanocíticos benignos, los nevus con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos (atipia leve, atipia moderada y atipia severa) y los melanomas malignos.

Característica histológica	Nevus no Atípico(NMB)	NAA-leve	NAA-moderado	NAA-severo	Melanoma maligno.
Delimitación lateral	Bien delimitada	Ligeramente menor	Moderado	Moderado	Mala delimitación
Simetría	Conservada	Conservada	Conservada	Ligeramente asimétrica	Asimétrica
Extensión juntural	Rara	Presente	Presente	Presente	Ocasionalmente
Distorsión crestas epidermis	Ocasional	Ocasional	Casi siempre	Siempre	Ocasionalmente
Fibrosis	Regresiva	Normalmente	Siempre	Siempre	Ocasionalmente
Distribución melanocitos	Tecas>> Célula suelta	Tecas> Célula suelta	Tecas> Célula suelta	Tecas> Célula suelta	Célula suelta> Tecas
Migración pagetoide	Ocasional, y si existe, es central	Raramente	Ocasional, y si existe es central	Ocasional, y si existe es central	Frecuentemente y periférica
Area entre crestas epid.	Preservada	Preservada	Normalmente preservada	Normalmente afectado	Afectado
Tamaño nuclear	Relación edad	Pequeño	Medio	Grande	Medio/grande
Nucleolo	Relación edad	Pequeño	Medio	Grande	Grande
Cromatina	Uniforme	Condensada	Parcialmente expandida	Expandida, a veces en grumos	Expandida, hiper cromática y en grumos
Mitosis dermis	Muy escasas y superficiales	Muy escasas y superficiales	Muy escasas y superficiales	Muy escasas y superficiales	Superficiales y profundas

NMB: nevus melanocítico benigno o no atípico; **NAA-leve:** nevus melanocítico con alteración arquitectural y atipia leve de los melanocitos; **NAA-moderada:** nevus melanocítico con alteración arquitectural y atipia moderada de los melanocitos. **NAA-severa:** nevus melanocítico con alteración arquitectural y atipia severa de los melanocitos.

1.3-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos han sido tratados estadísticamente siguiendo tres procesos que se relacionan a continuación:

- Análisis de la Varianza (ANOVA) para comparar datos numéricos y datos cualitativos. Los datos se expresan como media con la desviación estándar como datos en paréntesis.
- Prueba de Chi-cuadrado (χ^2) de tendencia lineal para las tablas de contingencia para el contraste de la hipótesis de independencia entre dos variables categóricas.
- Cálculo de la Odds Ratio como medida de asociación entre NAA e historia personal de melanoma. Los datos se expresan como resultado de la Odds Ratio con el intervalo de confianza del 95% en paréntesis.

Se ha establecido el nivel de significación estadística en una $p < 0,05$.

2-GRADACIÓN DE LA ATIPIA DE LOS NAA Y Ki-67

2.1-SELECCIÓN DE MATERIAL

Un total de 144 lesiones melanocíticas pertenecientes a 144 pacientes fueron incluidas en esta parte del estudio. Las preparaciones histológicas y los bloques fueron elegidos de los archivos de la División de Dermatopatología del “New York Presbyterian Hospital-Weill Medical College of Cornell University” desde los años 1994 al 1998. Los casos fueron seleccionados en primer lugar según el material disponible en los bloques para realizar el estudio inmunohistoquímico y en segundo lugar si los casos eran ejemplos claros de cada uno de los tres grados de atipia. Se incluyeron 18 casos de nevus melanocíticos benignos compuestos (NMB), 18 melanomas malignos “*in-situ*” (MM *in-situ*), y 108 nevus con alteración arquitectural y atipia citológica de los melanocitos (NAA). Estos 108 nevus se dividieron en las siguientes subcategorías: 36 NAA con atipia leve, 36 NAA con atipia moderada, 36 NAA con atipia severa.

TABLA 2: Relación de casos incluidos en el estudio de la expresión de Ki-67, edad y sexo de cada uno de ellos.

CASO	LESION	EDAD	SEXO
1	NMB	20	V
2	NMB	14	M
3	NMB	43	M
4	NMB	35	V
5	NMB	19	V
6	NMB	52	V
7	NMB	57	M
8	NMB	25	V
9	NMB	33	M
10	NMB	48	M

11	NMB	60	M
12	NMB	75	V
13	NMB	37	M
14	NMB	20	M
15	NMB	42	V
16	NMB	51	M
17	NMB	43	M
18	NMB	44	M
19	NAA-leve	62	V
20	NAA-leve	32	V
21	NAA-leve	24	M
22	NAA-leve	81	V
23	NAA-leve	31	M
24	NAA-leve	41	V
25	NAA-leve	38	M
26	NAA-leve	16	V
27	NAA-leve	33	M
28	NAA-leve	35	M
29	NAA-leve	72	V
30	NAA-leve	49	V
31	NAA-leve	39	M
32	NAA-leve	48	M
33	NAA-leve	41	M
34	NAA-leve	30	V
35	NAA-leve	26	M
36	NAA-leve	31	V
37	NAA-leve	33	M
38	NAA-leve	57	V
39	NAA-leve	31	V
40	NAA-leve	36	M
41	NAA-leve	60	V
42	NAA-leve	40	M
43	NAA-leve	36	V
44	NAA-leve	32	M
45	NAA-leve	59	M
46	NAA-leve	35	V
47	NAA-leve	73	M
48	NAA-leve	43	M
49	NAA-leve	26	M
50	NAA-leve	51	V
51	NAA-leve	50	M
52	NAA-leve	32	M
53	NAA-leve	59	V
54	NAA-leve	60	V
55	NAA-mod	37	V
56	NAA-mod	28	M
57	NAA-mod	44	M
58	NAA-mod	24	M
59	NAA-mod	44	V
60	NAA-mod	45	V
61	NAA-mod	22	M
62	NAA-mod	47	M
63	NAA-mod	49	M
64	NAA-mod	33	V
65	NAA-mod	29	V
66	NAA-mod	37	M
67	NAA-mod	48	V

68	NAA-mod	23	V
69	NAA-mod	43	M
70	NAA-mod	36	M
71	NAA-mod	26	V
72	NAA-mod	42	M
73	NAA-mod	32	M
74	NAA-mod	50	M
75	NAA-mod	57	V
76	NAA-mod	45	V
77	NAA-mod	78	V
78	NAA-mod	57	M
79	NAA-mod	41	M
80	NAA-mod	28	V
81	NAA-mod	29	M
82	NAA-mod	30	M
83	NAA-mod	32	V
84	NAA-mod	43	V
85	NAA-mod	26	M
86	NAA-mod	46	M
87	NAA-mod	43	M
88	NAA-mod	76	V
89	NAA-mod	30	M
90	NAA-mod	78	M
91	NAA-severa	51	V
92	NAA-severa	43	M
93	NAA-severa	34	V
94	NAA-severa	27	M
95	NAA-severa	35	V
96	NAA-severa	36	V
97	NAA-severa	71	M
98	NAA-severa	44	M
99	NAA-severa	28	M
100	NAA-severa	25	M
101	NAA-severa	48	V
102	NAA-severa	53	V
103	NAA-severa	23	M
104	NAA-severa	63	V
105	NAA-severa	55	M
106	NAA-severa	43	M
107	NAA-severa	65	V
108	NAA-severa	25	M
109	NAA-severa	30	M
110	NAA-severa	48	M
111	NAA-severa	31	M
112	NAA-severa	43	V
113	NAA-severa	40	V
114	NAA-severa	41	V
115	NAA-severa	56	M
116	NAA-severa	42	M
117	NAA-severa	66	M
118	NAA-severa	76	M
119	NAA-severa	30	M
120	NAA-severa	39	V
121	NAA-severa	28	M
122	NAA-severa	15	M
123	NAA-severa	58	M
124	NAA-severa	29	V

125	NAA-severa	26	V
126	NAA-severa	43	M
127	MM in-situ	47	V
128	MM in-situ	52	V
129	MM in-situ	55	V
130	MM in-situ	39	M
131	MM in-situ	40	V
132	MM in-situ	62	M
133	MM in-situ	80	M
134	MM in-situ	69	V
135	MM in-situ	57	M
136	MM in-situ	71	M
137	MM in-situ	76	V
138	MM in-situ	83	M
139	MM in-situ	59	M
140	MM in-situ	48	M
141	MM in-situ	70	M
142	MM in-situ	58	V
143	MM in-situ	61	M
144	MM in-situ	69	V

Se obtuvieron nuevas secciones del material parafinado de cada uno de los bloques seleccionados para el estudio, que se compararon con las secciones iniciales para asegurar que los nuevos cortes eran apropiados para el estudio, confirmar el diagnóstico original y el grado de atipia del nevus. Los criterios para la clasificación de las lesiones fueron los mismos que se mencionan en el apartado anterior .

TABLA 3: Número de casos incluidos en cada grupo, media de edad, rango de edad y relación de varones / mujeres en cada grupo.

LESIONES	Nº CASOS	Media (Rango)	Varones/ Mujeres
NMB	18	39,8a (14-75)	7/11
NAA leve	36	42,8a (16-81)	17/19
NAA moderada	36	41a (22-78)	15/21
NAA severa	36	41,9a (15-76)	14/22
MM in situ	18	60a (39-83)	8/10

2.2-TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

Se obtuvieron secciones de 5 micrómetros de grosor de cada bloque de parafina para cada caso, utilizándose portas cargados con cargas positivas (“Probe-on Plus, Fischer Scientific Company, Pittsburg, PA, USA”). Se realizó un doble marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo MIB-1 para el antígeno Ki-67 y con el anticuerpo HMB-45 para melanocitos, siguiendo el método rápido de Reed y cols⁽¹²²⁾, y aplicando la técnica de capilaridad, según el protocolo que se describe a continuación:

1. Desparafinación

- A- Poner las preparaciones histológicas a 65°C durante 10 minutos.
- B- Incubar durante 3 minutos a 65°C con DeWax (BioGenex, San Ramón, CA, USA).
- C- Incubar durante 2 minutos a 65°C con DeWax.
- D- Incubar durante 1 minuto a 65°C con DeWax.

2. Rehidratación:

- A- Lavar con alcohol absoluto dos veces.
- B- Lavar con alcohol al 95% dos veces.
- C- Lavar con Universal Buffer dos veces.

3. Desenmascaramiento antigénico mediante calor:

- A- Incubar con urea (2,5% w/v, pH 9.0) a 95°C durante 20 minutos.
- B- Lavar con agua destilada.

4. Bloqueo de biotina, peroxidasa y fosfatasa alcalina endógena:

- A- Bloqueo de biotina:

A.1- Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en una solución de clara de huevo (tres claras de huevo y 1 litro de agua destilada).

A.2- Lavar con agua destilada tres veces.

A.3- Biotina (0,2% w/v en PBS) a temperatura ambiente durante 15 minutos.

A 4- Lavar con agua destilada.

B- Bloqueo de la peroxidasa:

B.1- Incubar con peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos a temperatura ambiente.

B.2- Lavar con agua destilada tres veces.

C- Bloqueo de la fosfatasa alcalina:

C.1- Incubar con Levamisole 2mM durante 15 minutos a temperatura ambiente.

C.2- Lavar con agua destilada.

C.3- Lavar con Universal Buffer durante 1 minuto.

5. ***Anticuerpo primario:*** anticuerpo monoclonal de ratón HMB-45 (DAKO, Carpinteria, CA, USA) a una concentración de 1:75 durante 1 hora a temperatura ambiente.
6. ***Lavar en Universal Buffer*** durante 1 minuto, tres veces.
7. ***Anticuerpo secundario:*** incubar con un anticuerpo IgG de caballo anti-ratón unido a biotina (Vector, Burlingame, CA, USA) a una dilución de 1:100, durante 1 hora a temperatura ambiente.
8. ***Lavar con Universal Buffer*** durante 1 minuto, tres veces.

9. **Sistema de detección:** detección mediante reacción con fosfatasa-alcalina-estreptavidina (Boehriner Mannheim, Indianapolis, IN, USA), durante una hora a temperatura ambiente.
10. **Lavar con Universal Buffer** durante un minuto, tres veces.
11. **Cromógeno:** incubar con sustrato de fosfatasa alcalina (Vector Kit#1, Burlingame, CA, USA) durante 2 minutos bajo control microscópico.
12. **Parar la reacción** del cromógeno con agua destilada.
13. **Lavar con Universal Buffer** durante 1 minuto, tres veces.
14. **Anticuerpo primario:** incubar con el segundo anticuerpo primario, anticuerpo monoclonal de ratón MIB-1 contra el antígeno Ki-67 (Immunotech, Marseille, Francia), a una concentración de 1:50 a 4°C durante 12horas.
15. **Lavar con universal Buffer**
16. **Anticuerpo secundario:** anticuerpo IgG de caballo anti-ratón unido a biotina (Vector, Burlingame, CA, USA) a una dilución de 1:100 durante 30 minutos a temperatura ambiente.
17. **Lavar con Universal Buffer** durante 1 minuto, tres veces.
18. **Sistema de detección:** incubar con el sistema de detección streptavidina conjugada con biotina (Vector, Burlingame, CA, USA) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
19. **Cromógeno:** tetrahidrocloreuro 3,3'-diaminobenzidina utilizando como sustrato peróxido de hidrógeno, durante unos 5 a 10 minutos, a temperatura ambiente.
20. **Tinción de contraste** con un método de Giemsa modificado:

- A- Calentar solución de Giemsa en microondas durante 20 segundos
- B- Incubar las secciones en la solución anterior durante 7 minutos.
- C- Teñir en hematoxilina durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Mediante esta técnica se obtienen los núcleos Ki-67 positivos de color “marrón”, los citoplasmas de las células HMB-45 positivas rojas y la melanina de los melanocitos y los melanófagos de color verde.

2.3-MÉTODO DE EVALUACIÓN CUANTITATIVA

Se contaron todas las células HMB-45 positivas de la unión dermo-epidérmica, tanto las que eran solo HMB-45 positivas como las que eran HMB-45 y Ki-67 positivas, a un aumento de 100X y con un ocular de 10X. De esta manera se contabilizaron todas las células melanocíticas HMB-45 positivas y las células melanocíticas Ki-67 (MIB-1) positivas situadas en la unión dermo-epidérmica. Dado que los queratinocitos son negativos para el anticuerpo HMB-45, estos fueron descartados. Los resultados de cada lesión se expresaron como la proporción de células melanocíticas positivas para los dos anticuerpos (Ki-67 y HMB-45) con respecto al total de células HMB-45 positivas con nucleos visibles de la unión dermo-epidérmica. El número total de células positivas para HMB-45 contadas en cada caso oscilaba entre 27 y 2.489, según el tamaño de la muestra en cada caso.

2.4-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos han sido tratados estadísticamente mediante las siguientes pruebas que se relacionan a continuación:

- Análisis de la varianza (ANOVA), para comparar datos numéricos y datos cualitativos. Se comparó la proporción de células positivas en cada caso según las siguientes situaciones: en primer lugar NMB versus NAA, versus MM in-situ; en segundo lugar NAA-leve versus moderado versus severo. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos. Los datos se expresan como media, con la desviación estándar en paréntesis.
- Se buscaron puntos de corte óptimos que clasificaran a los grupos de la manera más adecuada posible en función del valor del porcentaje de Ki-67/HMB-45, por lo que se siguieron dos estrategias:
 - 1- Para encontrar más de un punto de corte hemos aplicado el método de análisis discriminante.
 - 2- Cuando buscábamos un solo punto de corte hemos aplicado el método de dinteles descrito por Robert y cols.⁽¹²³⁾ Este procedimiento, que asume la distribución normal de la variable original, consiste en una aproximación probabilística basada en el teorema de Bayes que maximiza las probabilidades de una clasificación correcta resolviendo una ecuación de segundo grado. Se trata de una aproximación enteramente “no apriorística” que proporciona imparcialidad a la asignación del punto de corte.

En ambos casos, y dado que las condiciones de aplicabilidad requieren la distribución normal de la variable a estudio, fue necesario realizar una transformación logarítmica de los valores a estudiar.

- Cálculo de la especificidad y sensibilidad de los puntos de corte hallados, todo ello expresado en porcentajes.

3- GRADACIÓN DE LA ATIPIA DE LOS NAA Y ChAT

3.1-SELECCIÓN DE MATERIAL

Un total de 90 nevos melanocíticos con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos (NAA) fueron incluidos en esta parte del estudio. Estos se dividieron en 30 NAA con atipia leve, 30 con atipia moderada y 30 con atipia severa. Todos los casos incluidos en esta parte del estudio también fueron estudiados en la parte anterior. Por problemas técnicos en algunos de los bloques se redujeron las muestras a 30 casos para cada categoría.

TABLA 4: Relación de casos incluidos en el estudio de la expresión de ChAT, edad y sexo de cada uno de ellos.

CASO	LESION	EDAD	SEXO
1	NAA-leve	62	V
2	NAA-leve	32	V
3	NAA-leve	24	M
4	NAA-leve	81	V
5	NAA-leve	31	M
6	NAA-leve	41	V
7	NAA-leve	38	M
8	NAA-leve	16	V
9	NAA-leve	33	M
10	NAA-leve	35	M
11	NAA-leve	72	V
12	NAA-leve	49	V
13	NAA-leve	39	M
14	NAA-leve	48	M
15	NAA-leve	41	M
16	NAA-leve	30	V
17	NAA-leve	26	M
18	NAA-leve	31	V
19	NAA-leve	33	M
20	NAA-leve	57	V
21	NAA-leve	31	V
22	NAA-leve	36	M
23	NAA-leve	60	V
24	NAA-leve	40	M
25	NAA-leve	36	V

26	NAA-leve	32	M
27	NAA-leve	59	M
28	NAA-leve	35	V
29	NAA-leve	73	M
30	NAA-leve	43	M
31	NAA-mod	26	M
32	NAA-mod	51	V
33	NAA-mod	50	M
34	NAA-mod	32	M
35	NAA-mod	59	V
36	NAA-mod	60	V
37	NAA-mod	37	V
38	NAA-mod	28	M
39	NAA-mod	44	M
40	NAA-mod	24	M
41	NAA-mod	44	V
42	NAA-mod	45	V
43	NAA-mod	22	M
44	NAA-mod	47	M
45	NAA-mod	49	M
46	NAA-mod	33	V
47	NAA-mod	29	V
48	NAA-mod	37	M
49	NAA-mod	48	V
50	NAA-mod	23	V
51	NAA-mod	43	M
52	NAA-mod	36	M
53	NAA-mod	26	V
54	NAA-mod	42	M
55	NAA-mod	32	M
56	NAA-mod	50	M
57	NAA-mod	57	V
58	NAA-mod	45	V
59	NAA-mod	78	V
60	NAA-mod	57	M
61	NAA-severa	41	M
62	NAA-severa	28	V
63	NAA-severa	29	M
64	NAA-severa	30	M
65	NAA-severa	32	V
66	NAA-severa	43	V
67	NAA-severa	26	M
68	NAA-severa	46	M
69	NAA-severa	43	M
70	NAA-severa	76	V
71	NAA-severa	30	M
72	NAA-severa	78	M
73	NAA-severa	51	V
74	NAA-severa	43	M
75	NAA-severa	34	V
76	NAA-severa	27	M
77	NAA-severa	35	V
78	NAA-severa	36	V
79	NAA-severa	71	M
80	NAA-severa	44	M
81	NAA-severa	28	M
82	NAA-severa	25	M

83	NAA-severa	48	V
84	NAA-severa	53	V
85	NAA-severa	23	M
86	NAA-severa	63	V
87	NAA-severa	55	M
88	NAA-severa	43	M
89	NAA-severa	65	V
90	NAA-severa	25	M

TABLA 5: Número de casos de cada grupo, media de edad, rango de edad y relación variones/mujeres en cada uno de ellos.

Lesiones	Nº Casos	Media (rango)	Varones / Mujeres
NAA -leve	30	42,1a (16-81)	14/16
NAA-moderado	30	41,8a (22-78)	14/16
NAA-severa	30	42,3a (23-78)	12/18

3.2- TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

Para cada caso se obtuvieron secciones de 5 micrometros de grosor de cada bloque de parafina de cada caso, utilizándose portas cargados con cargas positivas (“Probe-on Plus, Fischer Scientific Company, Pittsburg, PA, USA”), procediéndose a realizar la técnica de inmunohistoquímica por el método rápido de Reed y cols⁽¹²²⁾, mediante el principio de capilaridad y con los pasos que a continuación se describen:

1. *Desparafinación:*

A- **Poner** las preparaciones histológicas a 65°C durante 10 minutos.

B- Incubar durante 3 minutos a 65°C con DeWax (BioGenex, San Ramón, CA, USA).

C- Incubar durante 2 minutos a 65°C con DeWax.

D- Incubar durante 1 minuto a 65°C con DeWax.

2. Rehidratación:

A- Lavar con alcohol absoluto dos veces.

B- Lavar con alcohol al 95% dos veces.

C- Lavar con Universal Buffer dos veces.

3. Desenmascaramiento antigénico mediante digestión enzimática:

A- Incubar con pepsina (0,25% w/v, pH 2.0) a 45°C durante 5 minutos.

B- Lavar con agua destilada.

4. Agente bloqueante

A- Incubar con Acido acético glacial durante 10 minutos a temperatura ambiente.

B- Lavar con Universal Buffer

5. **Anticuerpo primario:** incubar con anticuerpo policlonal de conejo anti-ChAT (Chemicon, Temecula, CA, USA) a una concentración de 1:5000 a 4°C durante 2 horas.

6. Lavar con Universal Buffer.

7. **Anticuerpo secundario:** incubar con anticuerpo IgG de cabra anti-conejo unido a biotina (Vector laboratories Inc, Burlingame, CA,USA), a una concentración de 1:200 durante 7 minutos a 45°C.

8. **Lavar con Universal Buffer** durante 1 minuto tres veces.

9. **Sistema de detección:** reacción con fosfatasa-alcalina-estreptavidina (Boehriner Mannheim, Indianapolis, IN, USA), a una concentración de 1:500 durante 10 minutos a 45°C.
10. **Lavar con Universal Buffer** durante un minuto, tres veces.
11. **Cromógeno:** incubar con sustrato de fosfatasa alcalina (Vector Kit#1, Burlingame, CA, USA) durante 2 minutos bajo control microscopico.
12. **Parar** la reacción del cromógeno con agua destilada.
13. **Tinción de contraste:** teñir con Hematoxilina durante 10 minutos a temperatura ambiente.

3.3- MÉTODO DE EVALUACIÓN

En esta parte del estudio se valoraron los siguientes parámetros:

- a.- Porcentaje células melanocíticas positivas en la unión dermo-epidérmica según la siguiente escala:

- 1: 1-10%
- 2: 11-50%
- 3: 51%
- 4: 0%

- b.- Localización de las células melanocíticas positivas de la unión dermo-epidérmica:

L: positividad en la zona lateral de la lesión.

U: positividad distribuida de manera uniforme.

NV: no valorable

c.- Porcentaje de células melanocíticas dérmicas positivas:

1: 1-10%

2: 11-50%

3: 51%

4: 0%

d.- Localización de las células melanocíticas dérmicas positivas:

S: positividad en la dermis superficial.

P: positividad en la dermis profunda.

NV: no valorable

e.- Porcentaje de queratinocitos positivos:

1: 1-10%

2: 11-50%

3: 51%

4: 0%

f.- Localización de los queratinocitos positivos:

L: positividad en la zona lateral de la lesión.

U: positividad distribuida de forma uniforme.

NV: no valorable

3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos fueron tratados estadísticamente mediante la prueba de Chi-cuadrado para el contraste de la hipótesis de independencia entre dos variables categóricas.

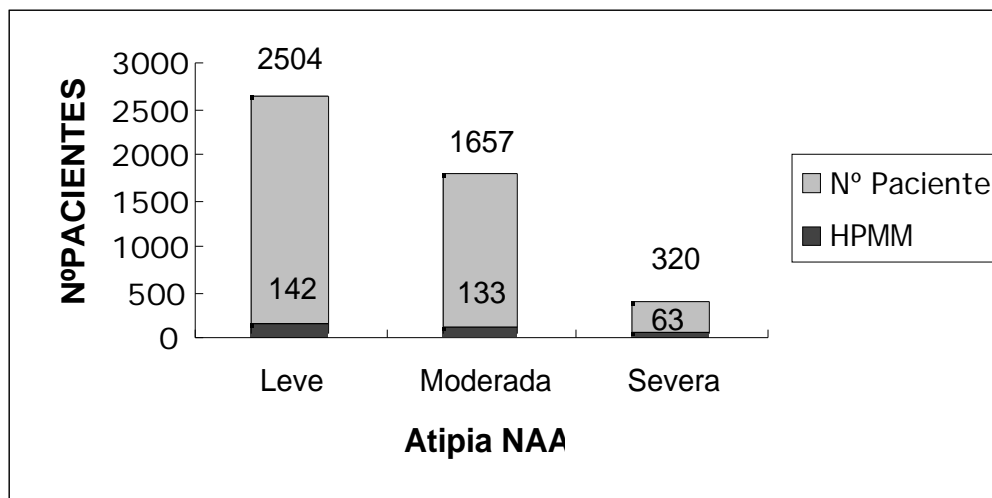
Se ha establecido el nivel de significación estadística en una $p < 0,05$.

III.- RESULTADOS

1.- CORRELACIÓN DEL GRADO DE ATIPIA DE LOS NAA CON HISTORIA PERSONAL DE MELANOMA.

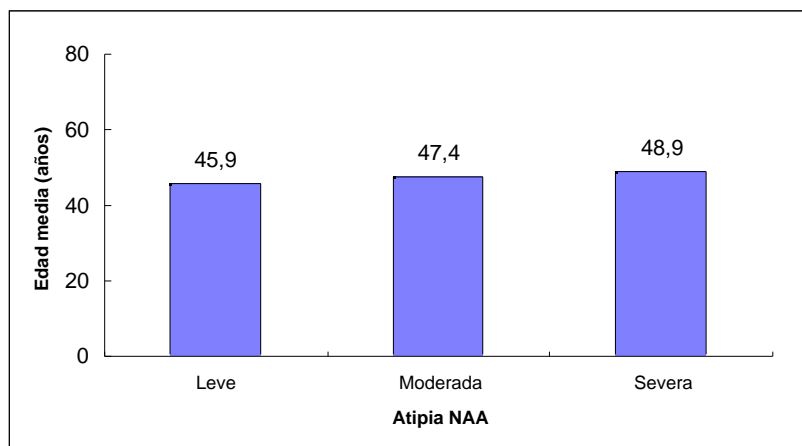
De los 4.481 pacientes con nevus melanocíticos con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos (NAA), se observó que el nevus con mayor atipia era de grado “leve” en 2.504 pacientes, “moderado” en 1.657 y “severo” en 320 pacientes. La revisión de los datos de la historia clínica, mostró la presencia de antecedentes de melanoma en un 5,7% (142 enfermos) de los pacientes cuyo NAA de mayor grado era un NAA-leve, en un 8,1% (133 enfermos) de los pacientes con NAA-moderado y en un 19,7% (63 enfermos) de los pacientes con NAA-severo, observándose diferencias estadísticamente significativas ($\chi^2 = 59,89$; $p < 0.001$). (Figura 1).

FIGURA 1: Pacientes con historia personal de melanoma



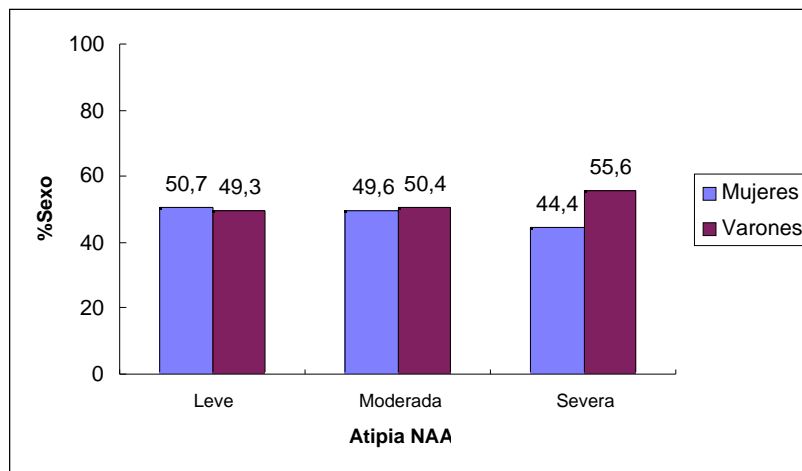
Los pacientes con historia personal de melanoma en los tres grupos fueron comparados con respecto a la edad y el sexo (Figura 2). Los pacientes con NAA-leve tenían una media de 45,9 años (rango 16-88 años), los de NAA-moderado tenían una media de 47,4 años (17-85 años) y en los de NAA severa la media de edad era de 48,9 años (21-88 años).

FIGURA 2: Edad media en los pacientes con historia personal de melanoma según la gradación de la atipia.



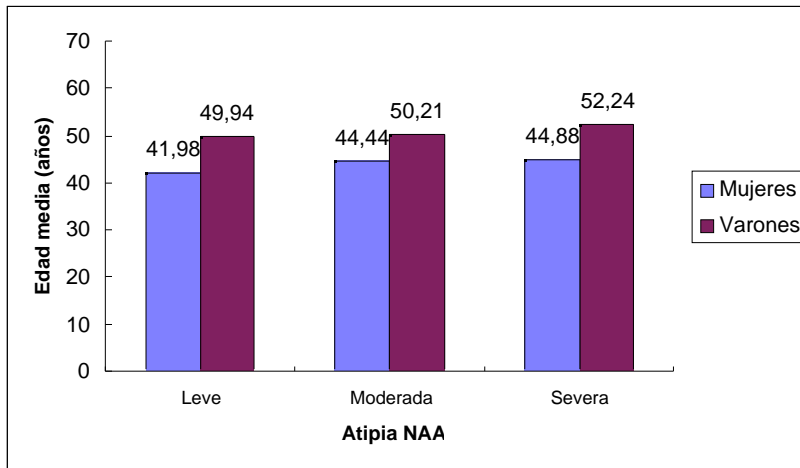
El análisis de los datos correspondientes al sexo puso de manifiesto que la ratio hombre/mujer era cercano al 1/1 para los pacientes con melanoma en cada grupo. Específicamente, el 50,7% de los pacientes con NAA-leve y historia personal de melanoma, el 49,6% de los pacientes con NAA-moderado y el 44,4% de los pacientes con NAA-severo eran mujeres (Figura 3).

FIGURA 3: Comparación del sexo en pacientes con historia personal de melanoma en cada uno de los tres grados de atipia.



Cuando los datos de edad media, en los pacientes con melanoma en cada grupo de NAA, eran divididos según las edades de los varones y las mujeres, se observó que en cada grupo la edad media de los hombres es mayor que la de las mujeres. Así, en los NAA-leve la edad media de los hombres era de 49,9 años y la de las mujeres era de 41,9 años, en NAA-moderado la edad media de los hombres era de 50,2 años y 44,4 años en las mujeres, y en el grupo de NAA-severo la edad media de los hombres era de 52,2 años y la de las mujeres de 44,8 años. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para el grupo de NAA-leve ($p < 0.0025$) y el de NAA-moderada ($p < 0.025$), pero no para el grupo de NAA-severo ($p < 0.07$). Asimismo se aprecia cierta tendencia, tanto para los varones como para las mujeres, a aumentar la edad media a medida que aumenta el grado de atipia. Sin embargo, dichas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 4).

FIGURA 4: Sexo y edad media en pacientes con historia personal de melanoma, en cada uno de los tres grupos.



El estudio de la asociación entre grado de atipia de los NAA e historia personal de melanoma dió como resultado una OR 4,08 (2,91-5,7) para los NAA-severo vs NAA-leve, una OR 2,81 (2-3,95) para los NAA-severo vs NAA-moderada y una OR 1,45 (1,13-1,87) para NAA-moderada vs NAA-leve (Tabla 6). Estos hallazgos significan que la probabilidad de que un paciente con NAA-severo tenga historia personal de melanoma es 4,08 veces superior que la de un paciente con NAA-leve, la probabilidad que un paciente con NAA-severo tenga historia personal de melanoma era 2,81 veces más alta que un paciente con NAA-moderado y la probabilidad de que un paciente con NAA-moderado tenga historia personal de melanoma es 1,45 veces superior que un paciente con NAA-leve. Por lo tanto, existe una tendencia a aumentar la probabilidad de tener historia personal de melanoma a medida que aumenta el grado de atipia.

Tabla 6: Análisis de la Odds Ratio para historia personal de melanoma según la atipia:

Atipia del NAA	Hist de M	Caso	Control	Odds Ratio	95%IC
Severa vs Leve	NH	257	2362		
	H	63	142	4,08	2,91-5,7
Severa vs Moderada	NH	257	1524		
	H	63	133	2,81	2-3,95
Moderada vs Leve	NH	1524	2362		
	H	133	142	1,45	1,13-1,87

Hist de M: historia de melanoma maligno.

NH: sin historia personal de melanoma maligno.

H: con historia personal de melanoma maligno.

95% IC: intervalo de confianza del 95%.

2.- GRADACIÓN DE LA ATIPIA DE LOS NAA Y Ki-67

La proporción de células melanocíticas HMB-45 positivas que también mostraban positividad para el Ki-67 eran claramente diferentes entre los nevus melanocíticos benignos, los nevus melanocíticos con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos, y el melanoma maligno in-situ (Tabla 8). El recuento de las células positivas para los dos anticuerpos en las células melanocíticas situadas en la unión dermo-epidérmica de los NMB, mostró que solo el 0,28% ($\pm 0,29$) de las células HMB-45 positivas, eran también positivas para el Ki-67. En el caso de los NAA, cuando estos eran estudiados como grupo, el 1,02% ($\pm 0,41$) de las células HMB-45 positivas, también lo fueron para el Ki-67. Así mismo, en el melanoma maligno “*in-situ*” los resultados fueron incluso mayores con un 2,69% ($\pm 0,93$) de las células HMB-45 que eran también Ki-67 positivas. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas para cada uno de los tres grupos ($p < 0,001$), a pesar de la superposición en la distribución de resultados entre los NAA y los melanomas malignos in-situ.

Cuando los NAA eran divididos en los tres grupos de atipia descritos previamente, el número de células Ki-67 positivas en las células HMB-45 positivas, era de 0,84% ($\pm 0,39$) para las lesiones con atipia leve, 0,99% ($\pm 0,35$) para las lesiones con atipia moderada y 1,23% ($\pm 0,41$) para las lesiones con atipia severa. El análisis estadístico de los resultados mostró diferencias estadísticamente significativas entre los nevus con atipia severa y el resto, es decir los NAA con atipia leve y moderada como grupo ($p < 0,0003$). No se objetivaron diferencias

estadísticamente significativas entre los nevus con atipia leve y los nevus con atipia moderada. (Tabla 7 y 8).

TABLA 7: Resultado del recuento de células Ki-67+ y HMB45+.

CASO	LESION	Ki-67*/HMB-45+	%
1	NMB	1/388	0,26
2	NMB	0/121	0
3	NMB	0/328	0
4	NMB	0/302	0
5	NMB	1/229	0,44
6	NMB	0/346	0
7	NMB	0/188	0
8	NMB	0/122	0
9	NMB	10/2.489	0,4
10	NMB	0/298	0
11	NMB	3/443	0,68
12	NMB	2/251	0,8
13	NMB	1/178	0,56
14	NMB	0/375	0
15	NMB	1/211	0,47
16	NMB	1/273	0,36
17	NMB	1/284	0,35
18	NMB	8/1.027	0,78
19	NAA-leve	4/488	0,82
20	NAA-leve	2/371	0,54
21	NAA-leve	3/362	0,83
22	NAA-leve	1/274	0,36
23	NAA-leve	1/562	0,18
24	NAA-leve	5/1.026	0,49
25	NAA-leve	3/218	1,34
26	NAA-leve	3/373	0,8
27	NAA-leve	5/404	1,24
28	NAA-leve	3/278	1,08
29	NAA-leve	10/1.057	0,95
30	NAA-leve	10/1.050	0,95
31	NAA-leve	8/565	1,42
32	NAA-leve	5/360	1,39
33	NAA-leve	4/193	2,07
34	NAA-leve	2/444	0,5
35	NAA-leve	5/592	0,84
36	NAA-leve	2/160	1,25
37	NAA-leve	10/1227	0,81
38	NAA-leve	0/116	0
39	NAA-leve	3/292	1,03
40	NAA-leve	3/466	0,64
41	NAA-leve	2/196	1,02
42	NAA-leve	3/251	1,19

43	NAA-leve	2/202	0,99
44	NAA-leve	1/146	0,68
45	NAA-leve	3/255	1,17
46	NAA-leve	3/380	0,79
47	NAA-leve	1/213	0,47
48	NAA-leve	3/308	0,97
49	NAA-leve	1/200	0,5
50	NAA-leve	1/151	0,66
51	NAA-leve	2/315	0,63
52	NAA-leve	1/222	0,45
53	NAA-leve	1/147	0,68
54	NAA-leve	2/329	0,61
55	NAA-mod	17/1.285	1,32
56	NAA-mod	10/1.320	0,76
57	NAA-mod	3/505	0,59
58	NAA-mod	2/278	0,72
59	NAA-mod	1/217	0,46
60	NAA-mod	2/291	0,69
61	NAA-mod	3/388	0,78
62	NAA-mod	15/810	1,86
63	NAA-mod	2/258	0,78
64	NAA-mod	14/910	1,54
65	NAA-mod	0/317	0
66	NAA-mod	1/150	0,67
67	NAA-mod	3/282	1,06
68	NAA-mod	6/408	1,47
69	NAA-mod	2/191	1,05
70	NAA-mod	1/193	0,52
71	NAA-mod	2/499	0,4
72	NAA-mod	2/191	1,05
73	NAA-mod	4/492	0,81
74	NAA-mod	4/313	1,28
75	NAA-mod	7/751	0,93
76	NAA-mod	4/232	1,73
77	NAA-mod	3/329	0,91
78	NAA-mod	6/558	1,07
79	NAA-mod	7/513	1,36
80	NAA-mod	5/575	0,87
81	NAA-mod	13/1.245	1,04
82	NAA-mod	10/937	1,07
83	NAA-mod	12/1082	1,11
84	NAA-mod	3/261	1,15
85	NAA-mod	4/516	0,78
86	NAA-mod	5/582	0,86
87	NAA-mod	16/1.091	1,47
88	NAA-mod	12/985	1,22
89	NAA-mod	11/831	1,32
90	NAA-mod	4/404	1
91	NAA-severa	9/1.065	0,85
92	NAA-severa	6/813	0,74
93	NAA-severa	8/406	1,98
94	NAA-severa	8/788	1,01
95	NAA-severa	4/266	1,5
96	NAA-severa	4/226	1,77
97	NAA-severa	3/210	1,43
98	NAA-severa	3/335	0,9
99	NAA-severa	3/240	1,25

100	NAA-severa	6/516	1,16
101	NAA-severa	7/409	1,71
102	NAA-severa	4/538	0,74
103	NAA-severa	11/798	1,38
104	NAA-severa	1/186	0,54
105	NAA-severa	3/160	1,88
106	NAA-severa	6/482	1,24
107	NAA-severa	5/322	1,55
108	NAA-severa	6/652	0,92
109	NAA-severa	2/260	0,77
110	NAA-severa	3/252	1,19
111	NAA-severa	4/485	0,82
112	NAA-severa	2/348	0,57
113	NAA-severa	4/224	1,78
114	NAA-severa	1/220	0,45
115	NAA-severa	8/602	1,33
116	NAA-severa	4/287	1,39
117	NAA-severa	2/199	1
118	NAA-severa	4/226	1,77
119	NAA-severa	5/327	1,53
120	NAA-severa	9/519	1,73
121	NAA-severa	2/235	0,85
122	NAA-severa	5/347	1,44
123	NAA-severa	3/327	0,91
124	NAA-severa	5/331	1,51
125	NAA-severa	4/293	1,37
126	NAA-severa	3/290	1,03
127	MM in-situ	4/152	2,63
128	MM in-situ	3/154	1,95
129	MM in-situ	6/302	1,99
130	MM in-situ	6/126	4,76
131	MM in-situ	4/175	2,28
132	MM in-situ	7/282	2,48
133	MM in-situ	3,0/62	4,76
134	MM in-situ	1,0/27	3,7
135	MM in-situ	16/631	2,53
136	MM in-situ	9/348	2,59
137	MM in-situ	6/368	1,63
138	MM in-situ	14/561	2,49
139	MM in-situ	8/522	1,53
140	MM in-situ	12/389	3,08
141	MM in-situ	6/353	1,7
142	MM in-situ	8/286	2,8
143	MM in-situ	13/403	3,22
144	MM in-situ	12/499	2,4

Ki-67*/HMB-45+: Células melanocíticas Ki-67 y HMB-45 positivas/Células melanocíticas HMB-45 positivas.

%. Porcentaje de células Ki-67 y HMB-45 positivas.

TABLA 8: Porcentaje de células Ki-67 y HMB-45 positivas.

LESION	Media (%)	Desviación estándar
NMB	0,28	0,29
NAA como grupo	1,02	0,41
NAA-leve	0,84	0,39
NAA-moderado	0,99	0,35
NAA-severo	1,23	0,41
MM in-situ	2,69	0,93

NMB: Nevus melanocítico benigno; **NAA:** nevus melanocítico con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos; **NAA-leve:** nevus melanocítico con alteración arquitectural y atipia leve de los melanocitos; **NAA-moderado:** nevus melanocítico con alteración arquitectura y atipia moderada de los melanocitos; **NAA-severo:** nevus melanocítico con alteración arquitectural y atipia severa de los melanocitos; **MM in-situ:** melanoma maligno in situ.

Asimismo, se buscaron puntos de corte óptimos que nos permitieran clasificar las lesiones según el porcentaje de células Ki-67 y HMB-45 positivas. En este sentido, se obtuvieron puntos de corte entre los grandes grupos, es decir, entre NMB, NAA y MM in-situ, y entre NMB y NAA-leve, y NAA-severa y MM in situ. Dado que el análisis estadístico aplicado obliga una distribución normal de la variable y por lo tanto a una transformación logarítmica de los valores, no se pueden incluir valores "0". En los casos en que el resultado del mismo fue este número, estos fueron excluidos. Consecuentemente, se excluyeron 8 NMB y 2 NAA.

Los puntos de corte óptimos obtenidos para distinguir los grandes grupos fueron de 0,68 entre NMB y NAA, y 1,56 entre NAA y MM in-situ. Mediante estos puntos de corte 7 (70%) de los 10 NMB, 76 (71,1%) de los 106 NAA y 17 (94,45) de los 18 MM in-situ fueron catalogados de acuerdo con la clasificación inicial (Tabla 9).

TABLA 9: Resultados de la aplicación de los puntos de corte entre NMB, NAA y MMis

Grupo actual	Grupo predecido utilizando los puntos de corte			
	NMB	NAA	MMis	Total
NMB	7 (70%)	3 (30%)	0 (0%)	10
NAA	20 (18,9%)	76 (71,1%)	10 (9,4%)	106
MM in-situ	0 (0%)	1 (5,6%)	17 (94,4%)	18

Puntos de corte 0,68 y 1,56.

NMB: 0,68; NAA: > 0,68 - 1,56; MM in-situ > 1,56

Utilizando el método de análisis discriminante se obtuvieron puntos de corte de 0,61 entre NMB y NAA-leve, y otro de 1,80 entre NAA-severa y MM in-situ. En este caso también fue necesario excluir los valores “0”, por lo tanto se excluyeron 8 NMB y 1 NAA-leve.

Respecto al punto de corte obtenido para diferenciar NMB y NAA-leve, 7 (70%) de los 10 NMB y 26 (74,3%) de los 35 NAA-leve fueron clasificados de acuerdo con la clasificación inicial (Tabla 10).

TABLA 10: Resultados obtenidos aplicando el punto de corte entre NMB y NAA-
leve

Grupo actual	Grupo predecido utilizando el punto de corte		
	NMB	NAA-leve	Total
NMB	7 (70%)	3 (30%)	10
NAA-leve	9 (25,7%)	26 (74,3)	35

Punto de corte: 0,61. NMB \leq 0,61; NAA-leve $>$ 0,61

Para diferenciar entre NAA-severa y MM in-situ se obtuvo un punto de corte de 1,80, que permitió clasificar 34 (94,4%) de los 36 NAA-severa y 15 (83,3%) de los 18 de los MM in-situ de acuerdo con el diagnóstico inicial emitido (Tabla 11).

TABLA 11: Resultados obtenidos aplicando el punto de corte entre NAA-severa y
MM in-situ.

Grupo actual	Grupo predecido utilizando el punto de corte		
	NAA-severa	MMis	Total
NAA-severa	34 (94,4%)	2 (5,6%)	36
MM in-situ	3 (16,7%)	15 (83,3%)	18

Punto de corte: 1,80. NAA-severa \leq 1,80 MM in-situ $>$ 1,80

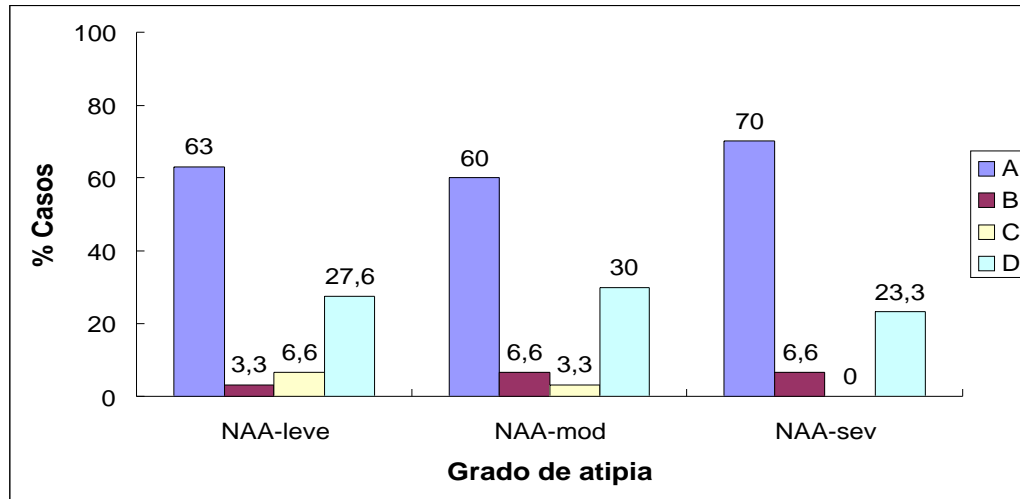
Si analizamos la sensibilidad y especificidad del resultado obtenido, obtenemos una sensibilidad del 74,3% y una especificidad del 70% respecto al punto de corte de 0,61 entre NMB y NAA-leve y una sensibilidad del 83,3% y una especificidad del 94,4% respecto al punto de corte de 1.80 entre NAA-severa y MM in-situ.

3.-GRADACIÓN DE LA ATIPIA DE LOS NAA Y ChAT

3.1- Expresión de ChAT en los melanocitos

El estudio de los resultados de los diferentes parámetros analizados en nuestra muestra, respecto al porcentaje de células melanocíticas positivas en la unión dermo-epidérmica, que en un 73,3 % (22 casos) de NAA-leve, un 70% (21 casos) de NAA-moderada y un 76,6% (23 casos) de NAA-severa mostraron expresión para ChAT. Si desglosamos los resultados según el porcentaje células positivas (Figura 5), vemos que en un 63,3% (19 casos) de NAA-leve, 60% (18 casos) de NAA-moderada y 70% (21 casos) de NAA-severa solo entre un 1-10% de las células fueron positivas, mientras que en el 3,3% (1 caso) de NAA-leve, un 19% (3 casos) de NAA-moderado y 6,6% (2 casos) de NAA-severo lo fueron entre el 11-50% y, en un 6,6% (2 casos) de NAA-leve y un 3,3% (1 caso) de NAA-moderado se observó positividad en más de un 50% de las células que formaban la lesión en la unión dermo-epidérmica. En el resto de los casos, en el 27,6% (8 casos) de NAA-leve, el 30% (9 casos) de NAA-moderado y en el 23,3% (7 casos) de NAA-severo, no se detectó expresión para el anticuerpo estudiado (figura 5).

FIGURA 5 : Porcentaje de casos para cada una de las cuatro categorías analizadas en los melanocitos de la unión dermo-epidérmica en relación con el porcentaje de células positivas.



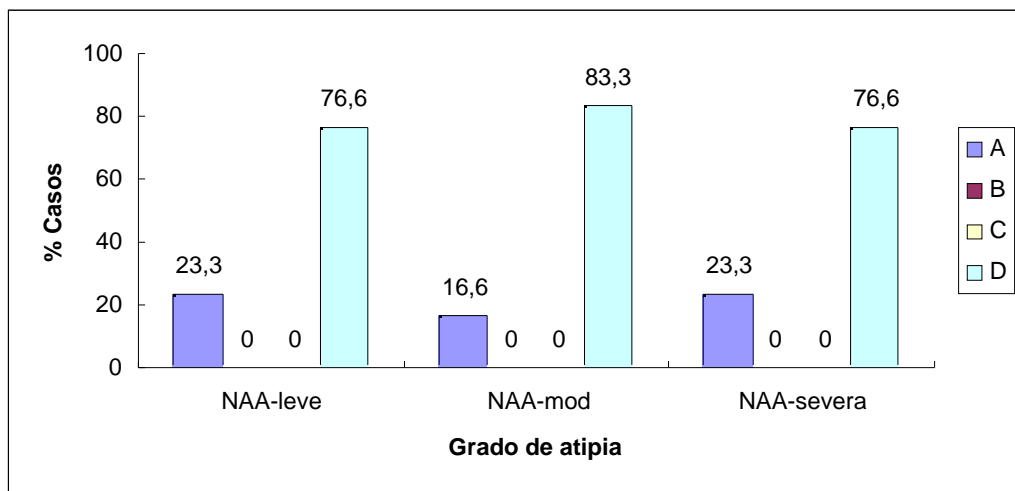
A: 1-10% de melanocitos positivos / B: 11-50% de melanocitos positivos/ C: >50% de melanocitos positivos / D: 0% de melanocitos positivos.

El estudio de la localización de las células melanocíticas positivas puso en evidencia que estas estaban localizadas predominantemente en la parte periférica de la lesión, respetando la zona media de la misma. En este sentido, un 72,7% de los casos positivos de los NAA-leve, un 66,6% de los NAA-moderado y un 69,5% de los NAA-severo presentaban expresión en los melanocitos situados en la periferia de la lesión.

En el componente dérmico de las lesiones melanocíticas no se observó expresión del anticuerpo en la mayoría de los nevus (figura 6). Específicamente, en el 76,6% (23 casos) de los NAA-leve, el 83,3% (25 casos) de los NAA-moderado y el 76,6% (23 casos) de los NAA-severo no se detectó positividad. En los casos en los que detectó expresión del anticuerpo, ésta era menor al 10% de las células y

estaban situadas en la parte superficial de la lesión en los tres grupos de atipia, excepto en un caso de NAA-moderado, en el que las células con positividad para el ChAT estaban en la parte más profunda del nevus.

FIGURA 6 : Proporción de casos en cada una de las categorías en que se agruparon en función de la proporción de expresión de las células melanocíticas dérmicas, en cada uno de los tres grados de atipia.



A: 1-10% de melanocitos positivos / B: 11-50% de melanocitos positivos / C: >50% de melanocitos positivos / D: 0% de melanocitos positivos.

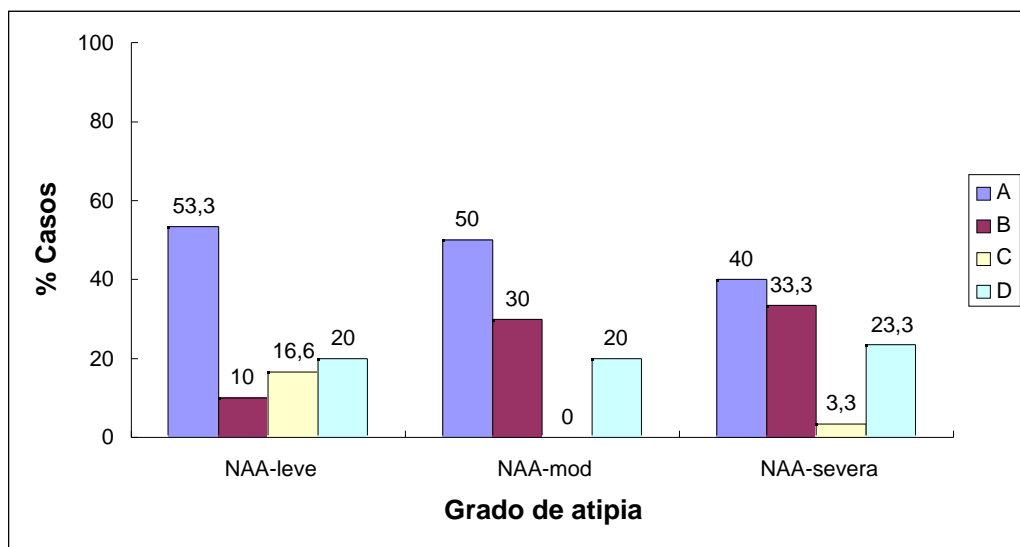
Ninguno de los resultados anteriores presentará diferencias estadísticamente significativas.

3.2- Expresión de ChAT en los queratinocitos

Se observó positividad para ChAT en los queratinocitos en más de la mitad de los casos incluidos en los tres grupos, es decir, en un 80% de los NAA-leve, en un 80% de los NAA-moderado y en un 77% de los casos con

NAA-severo (Figura 7). Asimismo, en cada uno de los grupos se observó que en la mayoría de los casos positivos, lo expresaban menos de un 10% de los queratinocitos. Además, se constató que en más de la mitad de los casos positivos de los NAA-leve (66,6%) y NAA-severo (69,5%), los queratinocitos que expresaban el anticuerpo, estaban distribuidos de manera uniforme en la epidermis que recubría la lesión. En la mitad de los casos positivos de los NAA-moderado y en el resto de casos positivos para los otros dos grupos, los queratinocitos con expresión citoplasmática de ChAT se localizaban en la epidermis suprayacente a la parte periférica de la lesión.

FIGURA 7 : Proporción de casos en cada una de las cuatro categorías en que se agruparon en función de la proporción de queratinocitos positivos en cada uno de los tres grupos.



A: 1-10% de queratinocitos positivos / **B:** 11-50% de queratinocitos positivos/ **C:** >50% de queratinocitos positivos / **D:** 0% de queratinocitos positivos.

En ninguno de los datos observados, se constataron diferencias estadísticamente significativas.

TABLA 12: Relación de los resultados de ChAT.

CASO	LESION	U. D.E %	U.D.E. DISTR	DERMIS %	DERMIS DISTR	QUER %	QUER DISTR
1	NAA-leve	3	U	4	NV	3	U
2	NAA-leve	1	L	4	NV	3	U
3	NAA-leve	4	NV	4	NV	4	NV
4	NAA-leve	1	L	4	NV	4	NV
5	NAA-leve	1	U	4	NV	1	U
6	NAA-leve	4	NV	4	NV	1	U
7	NAA-leve	2	L	4	NV	2	U
8	NAA-leve	4	NV	4	NV	1	U
9	NAA-leve	4	NV	4	NV	4	NV
10	NAA-leve	1	U	4	NV	1	L
11	NAA-leve	1	L	4	NV	4	NV
12	NAA-leve	1	L	1	S	1	U
13	NAA-leve	1	L	4	NV	1	U
14	NAA-leve	1	U	4	NV	3	U
15	NAA-leve	3	L	4	NV	2	L
16	NAA-leve	1	L	4	NV	1	L
17	NAA-leve	1	L	1	S	1	U
18	NAA-leve	1	L	1	S	1	L
19	NAA-leve	1	U	4	NV	3	U
20	NAA-leve	4	NV	4	NV	1	U
21	NAA-leve	1	L	4	NV	2	U
22	NAA-leve	4	NV	4	NV	1	L
23	NAA-leve	1	L	1	S	1	L
24	NAA-leve	4	NV	4	NV	4	NV
25	NAA-leve	1	L	4	NV	1	U
26	NAA-leve	4	NV	1	S	1	U
27	NAA-leve	1	L	1	S	3	U
28	NAA-leve	1	L	1	S	1	L
29	NAA-leve	1	U	4	NV	4	NV
30	NAA-leve	1	L	4	NV	1	L
31	NAA-mod	4	NV	4	NV	2	U
32	NAA-mod	1	L	4	NV	4	NV
33	NAA-mod	1	L	4	NV	1	U
34	NAA-mod	1	U	4	NV	1	L
35	NAA-mod	4	NV	4	NV	4	NV
36	NAA-mod	2	U	4	NV	2	U
37	NAA-mod	4	NV	4	NV	4	NV

38	NAA-mod	4	NV	4	NV	1	U
39	NAA-mod	1	L	4	NV	2	U
40	NAA-mod	1	L	4	NV	1	U
41	NAA-mod	1	U	1	S	1	U
42	NAA-mod	1	L	4	NV	1	L
43	NAA-mod	1	L	4	NV	1	L
44	NAA-mod	4	NV	4	NV	1	L
45	NAA-mod	1	L	4	NV	1	L
46	NAA-mod	1	L	4	NV	2	U
47	NAA-mod	2	L	1	S	2	L
48	NAA-mod	1	L	4	NV	1	L
49	NAA-mod	1	L	4	NV	1	L
50	NAA-mod	4	NV	4	NV	4	NV
51	NAA-mod	4	NV	4	NV	4	NV
52	NAA-mod	1	U	4	NV	1	L
53	NAA-mod	1	U	1	L	4	NV
54	NAA-mod	4	NV	4	NV	1	L
55	NAA-mod	4	NV	4	NV	2	U
56	NAA-mod	1	L	1	S	2	U
57	NAA-mod	1	L	4	NV	2	L
58	NAA-mod	1	L	4	NV	1	L
59	NAA-mod	3	U	1	S	2	U
60	NAA-mod	1	U	4	NV	1	U
61	NAA-sev	1	L	4	NV	2	U
62	NAA-sev	1	L	1	S	1	U
63	NAA-sev	1	L	4	NV	1	L
64	NAA-sev	1	U	1	S	4	NV
65	NAA-sev	1	L	1	S	1	U
66	NAA-sev	1	L	4	NV	2	U
67	NAA-sev	1	L	4	NV	4	NV
68	NAA-sev	4	NV	4	NV	4	NV
69	NAA-sev	1	L	4	NV	1	L
70	NAA-sev	1	U	4	NV	4	NV
71	NAA-sev	1	L	1	S	2	L
72	NAA-sev	1	U	4	NV	4	NV
73	NAA-sev	4	NV	4	NV	1	L
74	NAA-sev	1	L	4	NV	3	U
75	NAA-sev	2	U	4	NV	1	U
76	NAA-sev	1	L	4	NV	2	U
77	NAA-sev	1	L	4	NV	2	U
78	NAA-sev	1	U	1	S	2	U
79	NAA-sev	4	NV	4	NV	2	U
80	NAA-sev	1	L	4	NV	1	L
81	NAA-sev	4	NV	4	NV	2	U

82	NAA-sev	1	U	4	NV	1	U
83	NAA-sev	4	NV	4	NV	1	U
84	NAA-sev	1	L	4	NV	1	U
85	NAA-sev	4	NV	4	NV	4	NV
86	NAA-sev	4	NV	4	NV	4	NV
87	NAA-sev	1	L	4	NV	1	L
88	NAA-sev	2	U	1	S	2	U
89	NAA-sev	1	L	1	S	2	U
90	NAA-sev	1	L	4	NV	1	L

U.D.E %: Porcentaje de células melanocíticas positivas en la unión dermo-epidérmica.

U.D.E DISTR: localización de las células melanocíticas positivas de la unión dermo-epidérmica.

DERMIS %: Porcentaje de células melanocíticas dérmicas positivas.

DERMIS DISTR: localización de las células melanocíticas dérmicas positivas.

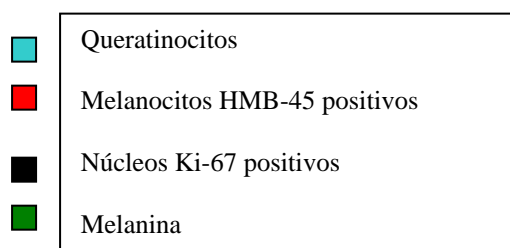
QUER %: Porcentaje de queratinocitos positivos.

QUER DISTR: Localización de los queratinocitos positivos.

4.- ICONOGRAFÍA

FIGURA 8 : Esquema comparativo del resultado del estudio inmunohistoquímico mediante doble marcaje para el anticuerpo anti-Ki-67 y para el HMB-45 (A) y sin doble marcaje para el anticuerpo anti-Ki67 solo (B).

A: Estudio inmunohistoquímico para anticuerpo anti-Ki-67 con doble marcaje con anticuerpo HMB-45.



B: Estudio inmunohistoquímico para anticuerpo anti Ki-67 sin doble marcaje.

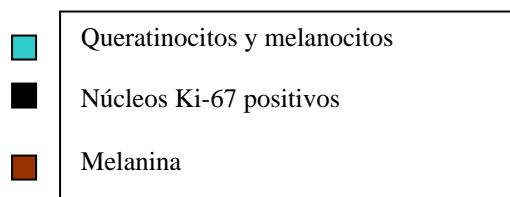
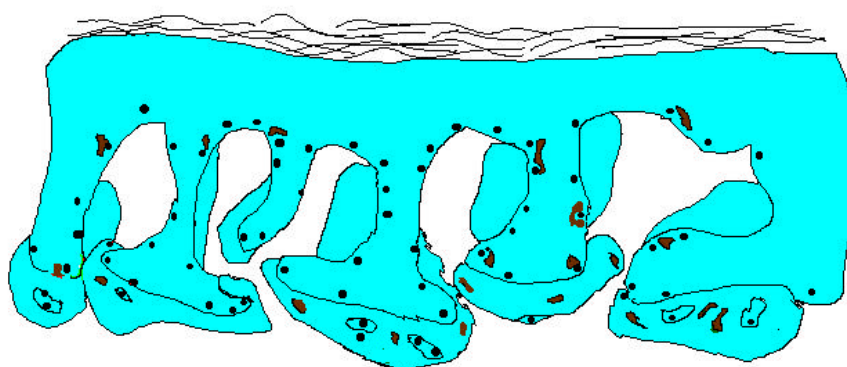


FIGURA 9: Paciente con varios nevus atípicos en la espalda.

FIGURA 10: Paciente con tres nevus atípicos en hipocondrio izquierdo.

FIGURA 11: NAA-leve (H&E x200)

FIGURA 12: NAA-moderada (H&E x220)

FIGURA13: NAA-severa (H&E x202)

FIGURA 14: NAA-severa (H&E x202)

FIGURA 15.- NAA-leve: estudio inmunohistoquímico para Ki-67 (positividad nuclear marrón) y HMB-45 (positividad citoplasmática roja, melanocitos) (x 120).

FIGURA 16.- NAA-leve: estudio inmunohistoquímico para Ki-67 y HMB-45 (x 420).

FIGURA 17.- NAA-moderada: estudio inmunohistoquímico para Ki-67 y HMB-45 (x 420).

FIGURA 18.- NAA-severa: estudio inmunohistoquímico para Ki-67 y HMB-45 (x 420).

FIGURA 19.- Melanoma maligno *in-situ*: estudio inmunohistoquímico para Ki-67 y HMB-45 (x 215,5).

FIGURA 20.- Melanoma maligno *in-situ*: estudio inmunohistoquímico para Ki-67 y HMB-45 (x 415).

FIGURA 21.- NAA-leve: estudio inmunohistoquímico para ChAT con positividad citoplasmática uniforme en los queratinocitos (x 200).

FIGURA 22.- NAA-leve: estudio inmunohistoquímico para ChAT con positividad citoplasmática en los melanocitos y en los queratinocitos de la zona lateral de la lesión (x 250).

FIGURA 23.- NAA-leve: estudio inmunohistoquímico para ChAT con positividad citoplasmática en los melanocitos de la unión dermo-epidérmica (x250).

FIGURA 24.- NAA-leve: estudio inmunohistoquímico para ChAT con positividad citoplasmática focal en melanocitos dérmicos (x250).

IV.- DISCUSIÓN

1.- CORRELACIÓN DEL GRADO DE ATIPIA DE LOS NAA CON HISTORIA PERSONAL DE MELANOMA.

La gradación histológica de las lesiones pigmentadas cutáneas ha sido un intento, necesariamente limitado por una cierta subjetividad, de relacionar el grado de atipia con el riesgo individual de desarrollar melanoma maligno. Existen muchos ejemplos en la literatura acerca de la gradación de todo tipo de lesiones histológicas en múltiples localizaciones como, por ejemplo, la gradación de las lesiones epiteliales en el cérvix uterino (CIN o neoplasia intraepitelial cervical) y su relación con el riesgo de carcinoma escamoso de cérvix⁽¹²⁴⁾, las displasias en la mucosa gástrica en relación con el riesgo de adenocarcinoma de estómago⁽¹²⁵⁾, los grados de Broder del carcinoma escamoso⁽¹²⁶⁾, los grados de Führman para determinar el grado nuclear del carcinoma de células renales⁽¹²⁷⁾ o los grados de Bloom y Richardson para el carcinoma ductal infiltrante de mama⁽¹²⁸⁾, entre otros. En el campo de la dermatopatología, existen dos métodos de gradación de los melanomas. Existen los niveles de Clark⁽¹²⁹⁾ para la estimación cualitativa de los niveles anatómicos de invasión de los melanomas, sujetos a cierta variabilidad subjetiva, y el índice de Breslow⁽¹³⁰⁾ que se basa en un método cuantitativo. La evaluación de los grados de atipia en los nevus ha sido motivo de controversias, porque existen muchas apariencias morfológicas distintas y por la presencia de atipia nuclear en algunas lesiones que, en la mayoría de los casos, tienen un curso clínico relativamente benigno. Como ejemplos de ello tenemos los nevus de Spitz, los nevus “viejos” o evolucionados, el nevus azul celular y los nevus congénitos con focos proliferativos en recién nacidos⁽¹³¹⁾.

Centrándonos en los NAA, en su descripción inicial no se estableció un método de gradación, pero estudios posteriores remarcaron la existencia de diferentes características tanto arquitecturales como citológicas, que presentan una correlación entre ellas⁽¹³²⁻¹³⁴⁾, observándose un espectro, desde los NAA con cambios mínimos para su clasificación, hasta los NAA con múltiples criterios histológicos y un grupo que estaría en una franja intermedia. Esta variabilidad podría explicar los diferentes resultados obtenidos en el estudio de la correlación clínico-patológica de los NAA, ya que los dermatólogos solo pueden evaluar las características macroscópicas de los nevus, pero no las características citológicas⁽¹³⁴⁾. Dada la relación del NAA con el riesgo de desarrollar melanoma, sería lógico pensar que los NAA con mayor grado de severidad deberían tener un riesgo mayor a los de menor grado. Aunque se ha identificado NAA residuales en melanomas, no se ha evaluado el grado de atipia de los mismos. Un melanoma que se origina en un nevus tiende a destruirlo, por lo que para identificar nevus residual en un melanoma, el diagnóstico debe realizarse en las fases más iniciales del mismo, para poder evaluar mejor sus características. En la mayoría de las ocasiones en las que puede identificarse nevus residual, solo quedan pequeños remanentes adyacentes al melanoma y, por su tamaño, se hace difícil tanto evaluar donde acaba el melanoma y donde empieza el nevus, como valorar el grado de atipia⁽⁷⁶⁻⁸²⁾. Por todo ello, en el presente estudio hemos intentado relacionar el grado de atipia de los NAA con la presencia o no de historia personal de melanoma, como medida de asociación entre los tres grados de atipia del NAA y el riesgo de melanoma. Previamente, dos estudios realizados por Bergman y cols⁽¹³⁵⁾ y Black y cols⁽⁷⁹⁾, habían demostrado que, en pacientes con melanoma, la atipia de los NAA era mayor que en los pacientes sin melanoma. No obstante, Ahmed y cols⁽⁵³⁾, posteriormente, no encontraron

ninguna relación a este respecto, quizás por los criterios utilizados. Un factor a tener en cuenta en el presente estudio es el sistema de gradación de los NAA. En este estudio hemos utilizado un sistema de gradación de forma permanente y continuada por el mismo director del departamento durante los años incluidos en el estudio así como anterior y posteriormente al mismo. En el análisis de los resultados iniciales obtenidos, observamos que, a mayor grado de atipia, mayor es el número de pacientes con historia de melanoma, aunque la diferencia en el porcentaje entre los pacientes con NAA-leve como NAA de mayor grado de atipia y los pacientes con NAA-moderado no es muy acusada (5,7% vs 8,1%), aunque sí lo es entre estos dos grupos y el de NAA-severa. Estos resultados están en concordancia con el cálculo de la Odds Ratio, según la cual los pacientes con NAA-severo tendrían un riesgo 4,08 superior de padecer melanoma que los pacientes con NAA-leve, los pacientes con NAA-severo tendrían un riesgo 2,81 veces superior que los NAA-moderado y los pacientes con NAA-moderado tendrían un riesgo 1,45 veces superior a los NAA-leve. Este hecho pondría de manifiesto la importancia de la gradación de los nevos con alteración arquitectural en cada caso para poder determinar con mayor precisión el riesgo individual de desarrollar melanoma maligno.

En cuanto a los datos de edad y sexo para cada una de las categorías de grados de atipia en los pacientes con melanoma, se observa una tendencia a aumentar la edad media de los pacientes a medida que aumenta el grado de atipia, tanto si se separa cada uno de los grupos según el sexo o no. La ausencia de resultados estadísticamente significativos con respecto al dato anterior podría explicarse por la gran dispersión de edades que existía en cada uno de los grupos. Se ha objetivado, en estudios de series de pacientes con NAA, que a pesar de que estos pacientes presentan lesiones “de novo”

durante toda su vida; a medida que aumenta la edad del paciente, disminuye el número de nevus atípicos^(88,89). No obstante, también se ha visto que, a igual grupo de edad, mayor es el número de nevus, atípicos o no, en las zonas expuestas⁽¹³⁶⁻¹³⁷⁾. Estos datos, junto con la tendencia observada, apoyarían, tal como propone Clark y cols⁽¹³⁸⁾, que otros factores tanto genéticos como ambientales, en este caso ambientales como la exposición solar, podrían ser un factor sobreañadido en la evolución de los NAA como precursor obligado del desarrollo de melanoma.

2.- GRADACIÓN DE LA ATIPIA DE LOS NAA Y Ki-67

Los NAA han estado en el centro de la controversia desde su descripción inicial. Numerosos autores han intentado buscar criterios histológicos reproducibles para su diagnóstico como entidad propia, y también para su clasificación según el grado de atipia. La búsqueda de otro tipo de criterios diagnósticos, además de la morfología, que sean más objetivos y cuantificables para las lesiones melanocíticas, se ha intentado mediante la utilización de múltiples técnicas como la morfometría, la inmunohistoquímica, estudios ultraestructurales, estudio del DNA, etc. Existen muchos trabajos en la literatura que estudian los NAA. En la mayoría de ellos, se han estudiado de manera global, sin tener en cuenta el grado de atipia, y comparándolos con otras lesiones melanocíticas, tanto benignas como malignas, para establecerlos como entidad, precursores de melanoma maligno, separada de los demás nevus y de los melanomas.

En este sentido, la microscopía electrónica ha demostrado la presencia de un mayor número de melanosomas anormales en los NAA que en los otros nevus y menor que en los melanomas, diferencias que fueron estadísticamente significativas a pesar del escaso número de casos incluidos en los estudios^(139,140,141). Así mismo, desde un punto de vista morfométrico, se han estudiado diferentes parámetros observándose diferencias entre NAA, NMB y Melanoma maligno, con respecto a la desviación estándar del área nuclear^(142,143,144), aunque los resultados fueron más parecidos a los NMB para Fleming et al⁽¹⁴²⁾, mientras que para Schmiegelow et al⁽¹⁴³⁾ eran más próximos al melanoma.

El estudio del ADN ha puesto de manifiesto una amplia dispersión de los resultados. Las diferentes series de casos de la literatura muestran que se ha encontrado

aneuploidia en un 0%- 30% de los NAA, en un 0-70% de los NMB y en un 25- 100% de los melanomas^(135,142-157). La gran dispersión de resultados se ha atribuido al uso de diferentes métodos técnicos para su evaluación. Según varios autores las causas deben buscarse en la citometría de flujo, por la infravaloración del porcentaje de núcleos que contiene su ADN anormal y por la dificultad de su estudio en tumores sólidos^(142,157).

Desde un punto de vista inmunohistoquímico se han estudiado múltiples anticuerpos: marcadores de melanosomas, receptores hormonales, factores de crecimiento, marcadores relacionados con la apoptosis, factores de la matriz extracelular, citoquinas, marcadores linfocitarios para tipificar la población linfocitaria acompañante, etc. Los resultados en algunos casos han sido estadísticamente diferentes para los NAA con respecto a otros grupos de lesiones melanocíticas, mientras que en otras no se han observado diferencias con respecto a los NMB o a los melanomas, o bien los resultados han sido contradictorios.⁽¹⁵⁸⁻¹⁸¹⁾

El índice de proliferación puede estudiarse mediante diversos métodos, como el recuento de mitosis, métodos histoquímicos como los AgNOR, la citometría de flujo, la detección de incorporación de análogos de la timidina, estudios inmunohistoquímicos que detectan la expresión de antígenos nucleares humanos asociados a la proliferación celular como el Ki-67, nuestro caso, o el PCNA, las ciclinas y las polimerasas. Su expresión ha sido ampliamente estudiada en numerosas patologías, especialmente el Ki-67, observándose una asociación entre el grado de proliferación y el grado de malignidad en varias de ellas^(97,182).

Se han obtenidos resultados parecidos utilizando los diferentes métodos antes mencionados. Respecto a los AgNOR, se han observado diferencias significativas entre los nevus en general y los melanomas malignos a pesar de la importante superposición

de resultados observada entre los dos grupos, en las diferentes series estudiadas⁽¹⁸³⁻¹⁸⁷⁾, aunque esta parece ser menor si se estudia la ratio AgNOR/ area nuclear según Gonzalez y cols⁽¹⁸⁶⁾. Cuando se han comparado los resultados de los diferentes grupos de nevus, en un gran número de trabajos no se han podido demostrar diferencias significativas entre los NAA y los NMB, quizás debido al pequeño número de casos de los dos tipos de nevus incluidos en la mayoría de ellos. En cambio Fogt y cols⁽¹⁸⁷⁾ si demostraron diferencias significativas entre los NMB y los NAA, observando una progresión ascendente respecto al recuento de AgNOR desde los NMB, los NAA hasta los melanomas. Así mismo, Howat y cols⁽¹⁸⁴⁾ mencionan que la morfología de los AgNOR en los nevus es regular, mientras que en los melanomas es irregular y abigarrada.

La citometría de flujo también puede detectar las células que están en alguna de las fases de proliferación (G1, S, G2, M). Se han estudiado nevus benignos y melanomas, tanto primarios como metastásicos, y se han observado diferencias significativas entre estos grupos. No obstante, en todos estos trabajos se incluyen pocos NAA, por lo que a pesar de observar que su expresión es ligeramente superior a los NMB, las diferencias observadas no son estadísticamente significativas.⁽¹⁴⁷⁾

Mediante técnicas inmunohistoquímicas pueden estudiarse diferentes marcadores de proliferación. Los más estudiados han sido el PCNA y el Ki-67. Respecto al primero de ellos, el PCNA, en los trabajos realizados en lesiones melanocíticas se ha observado una progresión ascendente con respecto a la proporción de células positivas en NMB, NAA y melanomas.^(144,147,188,189)

El índice de proliferación también se ha estudiado a través del estudio de la expresión del Ki-67. Su estudio en lesiones melanocíticas se ha realizado utilizando

como método de cuantificación tanto el recuento directo de un número determinado de células con expresión nuclear para dicho anticuerpo como mediante sistemas informatizados de análisis de imagen⁽¹⁹⁰⁻¹⁹⁸⁾. En ambos casos, pero de forma especialmente significativa en el segundo de ellos, su análisis se ha realizado preferentemente en el componente dérmico de las lesiones a estudio, debido a las dificultades que entraña distinguir, a nivel de la unión dermo-epidérmica, los melanocitos de los queratinocitos positivos, especialmente en aquellas lesiones en las que los melanocitos forman pequeñas tecas rodeadas por queratinocitos basales con positividad para dicho marcador, hecho especialmente significativo en los NAA por la distorsión de las crestas epidérmicas que presentan. Así mismo, cabe destacar como dificultad sobreañadida la presencia de melanina⁽¹⁹²⁾. Para evitar estos problemas, en nuestro estudio, se ha realizado un estudio inmunohistoquímico con doble marcaje mediante Ki-67 (utilizando como cromógeno diaminobenzidina) y HMB-45, que se expresa a nivel citoplasmático en los melanocitos, (utilizando como método de detección fosfatasa alcalina). Como resultado, los melanocitos de la unión dermo-epidérmica muestran expresión citoplasmática de color rojo para el HMB-45 y positividad nuclear marrón en las células positivas para el Ki-67, tanto en los queratinocitos como en los melanocitos. Así mismo, para solventar el problema de la melanina todos los casos fueron contrastados mediante una variante de la técnica de Azure B⁽¹⁹⁹⁾, es decir, mediante una solución de Giemsa que tiñe la melanina de color verde y con posterior tinción suave con Hematoxilina. Estas estrategias técnicas nos permitieron observar que la expresión de Ki-67 en la unión dermo-epidérmica se centra básicamente en los queratinocitos basales y que algunas de las tecas de células aparentemente melanocíticas en los NAA están formadas en realidad por un gran

número de queratinocitos, tanto a su alrededor como en el seno de las tecas, dada la distorsión y complejidad arquitectural de las crestas epidérmicas. De no utilizar la técnica del doble marcaje, este hecho podría haber influido de forma plausible en el resultado, al aumentar de forma importante el porcentaje de células positivas, y por lo tanto, podría haber condicionado el resultado final.

Un factor distintivo en nuestro caso es que el estudio del índice de proliferación se ha realizado en la unión dermo-epidérmica (UDE), mientras que en los estudios precedentes se ha estudiado tanto en la dermis como en la unión dermo-epidérmica, a pesar de las limitaciones antes mencionadas. Dado que, en nuestro caso, el objetivo era el estudio del índice de proliferación en los NAA en relación con los tres grados de atipia, que la mayoría de las características morfológicas que se utilizan para el diagnóstico y gradación de los NAA se localizan en la unión dermo-epidérmica y que uno de los puntos clave de los NAA es su diagnóstico diferencial con el melanoma *in situ*, limitamos el estudio a este nivel.

Un resultado a destacar es el bajo índice de proliferación observado en todas las lesiones névicas incluidas en el estudio. Este resultado está en consonancia con la literatura, en la que la expresión de marcadores de proliferación, tanto en nevus como en melanomas primarios con diferentes grados de invasión (índice de Breslow) y de metastásis, es baja si se compara con otras patologías del organismo. Según Smolle y cols⁽¹⁹⁰⁾, el índice de proliferación no aumenta de forma importante por debajo de los 2,00 mm de invasión, resultado que estaría en concordancia con la lenta progresión clínica de los melanomas incipientes. El bajo índice de proliferación de los melanocitos de la unión dermo-epidérmica contrasta con el gran número de células positivas a dicho nivel. Consecuentemente, la mayoría corresponden a queratinocitos basales o

parabasales que, al tener un mayor índice de proliferación, serían más responsables que los melanocitos de la distorsión de las crestas epidérmicas en los NAA.

A pesar de los bajos porcentajes de Ki-67 obtenidos y de la superposición de resultados, que está en consonancia con los resultados previos tanto con el Ki-67 como mediante otros marcadores como el PCNA^(144,147,188,189) o el estudio de AgNOR⁽¹⁸³⁻¹⁸⁷⁾, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los NMB, los NAA como grupo y los melanomas malignos in-situ. Estos resultados están en la misma línea que los obtenidos por Korabiowska y cols⁽¹⁹⁸⁾, y contrastan con los recogidos de forma mayoritaria en la literatura anterior, en los que se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los nevus como grupo y los melanomas, si bien en la mayoría de ellos no encuentran diferencias significativas entre los NMB y NAA, a pesar de que en todos ellos los índices obtenidos en los NAA eran ligeramente superiores a los NMB⁽¹⁹⁰⁻¹⁹⁸⁾. La causa debería atribuirse quizás al escaso número de casos incluidos en los estudios o al grado de atipia de los mismos que en la mayoría de no se especifica.

Los resultados que se obtengan en un estudio de estas características para ser útiles para el diagnóstico de rutina, deben mostrar muy poco solapamiento, ya que el día a día se basa en casos aislados y no en un grupo de casos. En este sentido, los bajos porcentajes obtenidos para los nevus contrastan con los más altos obtenidos en los 18 casos de melanoma maligno in situ. Si analizamos los resultados obtenidos, el valor que está por encima de la desviación estándar de la media para los NAA-severo es 1,64% y el valor que está por debajo de la desviación estándar de la media para MM “*in-situ*” es 1,76%., indicando probablemente, que existe un ligero solapamiento en las distribuciones. Un punto de corte de 1,75% para la distinción incluiría solo un NAA con

atipia leve y 5 NAA con atipia severa. El punto de corte de 1,80 obtenido mediante el estudio estadístico incluiría un NAA con atipia leve, uno con atipia moderada y dos con atipia severa (1% de falsos positivos y un 99% de falsos negativos) y detectaría 15 de 18 MM *in situ* (83,3% de positivos verdaderos y 16,7% de falsos negativos). Un punto de corte de 2.0% incluiría un NAA con atípia leve, ninguno con atipia moderada y ninguno con atipia severa, aunque una lesión está bastante cerca de 1,98% (0,9% de falsos positivos y un 99,1% de falsos negativos). Este punto de corte respecto a los MM *in-situ*, detectaría 13 de 18 (72% positivos verdaderos y 28% de falsos negativos). El presente estudio sugiere que este acercamiento puede ser útil. De todas formas, existen algunos problemas, como la dificultad técnica de doble marcaje y el recuento de las células, por lo que debería buscarse un método más sencillo.

Los resultados obtenidos en los NAA respecto a los tres grados de atípia, muestran una tendencia a aumentar el índice de Ki-67 a medida que aumenta la atipia. Destaca, no obstante, una superposición que es más acusada entre los NAA con atipia leve y moderada. En esta línea, solo demostramos diferencias estadísticamente significativas entre los NAA con atipia severa y los NAA con atipia leve y moderada como grupo. No se demostraron diferencias estadísticamente significativas entre los NAA con atipia leve y moderada. Estos resultados son similares a los obtenidos por el grupo de Barnhill ⁽²⁰⁰⁾ en uno de los pocos trabajos de la literatura en los que los NAA se estudian según sus tres grados de atipia, en el cual demostró diferencias significativas entre los NAA con atipia severa y los melanomas, así como entre los NAA con atipia severa y el resto de los nevus, respecto al estudio del area nuclear y la desviación estándar del area nuclear. En base a estos resultados, el grupo de Barnhill⁽²⁰⁰⁾ propone gradar los NAA en dos categorías: alto y bajo grado, como ya sugirió Smoller y cols

⁽¹⁶²⁾ previamente. En este sentido, el mismo grupo de Barnhill observó posteriormente la presencia de aneuploidia en un 1% de los NAA-leve y NAA moderada, y en un 50% de los NAA-severa⁽²⁰¹⁾. No obstante, Bergman y cols.⁽¹³⁵⁾ en un estudio de ploidía del DNA observaron histogramas de DNA anormales en un 31% de NAA con atipia leve, en un 68 % de NAA con atipia moderada y en un 88% de los NAA con atipia severa . Estos resultados apoyarían la presencia de un amplio espectro de NAA, desde los que tienen cambios mínimos hasta los que presentan cambios morfológicos similares a los melanomas y por lo tanto, su clasificación en dos o tres grupos reflejaría este aspecto. La demostración del Ki-67 como factor pronóstico independiente en los melanomas quizás apoyaría que, a igual grado de atipia de un NAA, la presencia de un índice de proliferación mucho mayor a la media reflejaría una mayor probabilidad para dicha lesión de evolucionar hacia un grado mayor de atipia o hacia melanoma.

3.- GRADACIÓN DE LA ATIPIA DE LOS NAA Y ChAT.

El sistema muscarínico colinérgico que se encuentra en células neuronales también se ha descrito en células no neuronales. Durante la embriogénesis se ha demostrado la aparición de actividad colinesterasa, acetil-colina transferasa y receptores muscarínicos en células neuronales y no neuronales durante la fase de morfogénesis, actividad que desaparece cuando el proceso de formación de órganos ha finalizado ^(117,202-207). Concretamente, se han descrito receptores muscarínicos en las células primordiales del embrión de pollo cuando estas migran desde la cresta germinal hasta el esbozo gonadal y en células de la cresta neural cuando estas migran, hecho que relaciona el sistema muscarínico colinérgico con el movimiento ^(118,208). Así mismo, se han descrito receptores muscarínicos en varias patologías tumorales cerebrales como astrocitomas y neuroblastomas ⁽²⁰⁹⁾ y en el carcinoma de célula pequeña de pulmón, este último en relación con la regulación de la E-cadherina ⁽²¹⁰⁾. En carcinomas de mama, colon y ovario, se ha demostrado la presencia de actividad colinesterasa, que era especialmente intensa en las áreas infiltrativas ^(119,120,211).

La presencia de receptores muscarínicos en las células de la cresta neural, de las cuales proceden los melanocitos, impulsó la teoría que las lesiones melanocíticas malignas podrían “recuperar” la actividad colinérgica que presentaban durante la embriogénesis, dato que estaría en relación con el proceso de infiltración y metástasis. En este sentido Lammberding-Köppel y cols demostraron la presencia de receptores muscarínicos tanto en lesiones melanocíticas benignas (nevus) como en melanomas malignos, pero no en los melanocitos “normales” de la piel ⁽¹²⁰⁾. En esta misma

dirección el estudio de receptores muscarínicos *in vitro* en dos líneas celulares de melanoma como son la SK-Mel-28 y la A2058, ha confirmado su presencia y su acción farmacológica como los receptores muscarínicos tipo m3 y m5 respectivamente^(212,213). Consecuentemente, las células melanocíticas procedentes de la cresta neural expresarían el sistema muscarínico durante la fase de migración, para perder posteriormente dicha capacidad una vez los melanocitos hubieran asentado en la piel, y la recuperarían posteriormente como factor coadyuvante de la migración cuando los melanocitos proliferan para dar lugar a lesiones melanocíticas. Lammerding-Köppel y cols observaron que la expresión de receptores muscarínicos en los melanomas malignos era más intensa que en los nevus, destacando así mismo la distribución de la expresión de los mismos, que era más intensa en la periferia de la lesión que en el centro⁽¹²⁰⁾. Por otra parte, en los nevus, tanto en los 3 NAA como en los 4 NMB incluidos en su estudio observaron expresión en el componente juntural y dérmico para receptores muscarínicos⁽¹²⁰⁾, a diferencia de los resultados obtenidos en nuestra serie de casos en los que observamos expresión para ChAT preferentemente en el componente juntural de la periferia de las lesiones. Estas diferencias podrían deberse a que en el trabajo de Lammerding-Köppel utilizaron la técnica de inmunofluorescencia que es más sensible que la inmunohistoquímica cuando la expresión es débil y escasa, al escaso número de nevus incluidos en su estudio o a las diferentes partes estudiadas del sistema muscarínico. En el caso de esta última posibilidad, quizás los diferentes componentes no se expresan todos en una misma célula sino en diferentes células melanocíticas. Se ha sugerido que los NAA “crecerían” desde el centro de la lesión hacia la periferia a nivel juntural. Por lo tanto, quizás las células de la periferia producirían la acetilcolina

que posteriormente actuaría en los receptores de las otras células melanocíticas induciendo su movimiento.

Otro hallazgo a destacar en este apartado es la presencia de expresión de ChAT en los queratinocitos, que en un 50% aproximado de los casos estaba situada sobre la periferia de la lesión y en el resto estaba distribuida de manera uniforme por todo el nevus. Este resultado no es del todo inesperado, dado que previamente se habían demostrado los tres componentes del sistema muscarínico en los queratinocitos durante su maduración⁽²¹⁴⁾. En cambio, si resulta un hallazgo novedoso la distribución de dicha expresión.

V.- CONCLUSIONES

- 1.- La gradación de la atipia citológica en los nevos con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos se correlaciona con el riesgo de presentar historia de melanoma.
- 2.- Los pacientes con nevos con alteración arquitectural y atipia severa de los melanocitos tienen un riesgo 4,08 veces superior de presentar historia de melanoma que los pacientes con nevos con alteración arquitectural y atipia leve de los melanocitos.
- 3.- Los pacientes con nevos con alteración arquitectural y atipia severa de los melanocitos tienen un riesgo 2,81 veces superior de presentar historia de melanoma que los pacientes con nevos con alteración arquitectural y atipia moderada de los melanocitos.
- 4.- Los pacientes con nevos con alteración arquitectural y atipia moderada de los melanocitos tienen un riesgo 1,45 veces superior de presentar historia de melanoma que los pacientes con nevos con alteración arquitectural y atipia leve de los melanocitos.
- 5.- El estudio del índice de proliferación valorado mediante el anticuerpo anti-Ki67 ha mostrado un bajo índice de proliferación en todas las lesiones melanocíticas estudiadas.

- 6.- El estudio del índice de proliferación mediante el anticuerpo anti-Ki67 permite distinguir los nevos con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos de los nevos melanocíticos benignos y de los melanomas malignos *in-situ*.
- 7.- En los nevos con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos, el anticuerpo anti-Ki-67 ha sido de ayuda para diferenciar entre los nevos con alteración arquitectural y atipia severa de los melanocitos del resto de nevos con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos, con menor grado de atipia.
- 8.- La utilización de la técnica de inmunohistoquímica con doble marcaje con HMB-45 y Ki-67, ha puesto de manifiesto la gran distorsión de las crestas epidérmicas en los nevos con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos, y ha permitido distinguir claramente entre los melanocitos y los queratinocitos de la unión dermo-epidérmica.
- 9.- La tinción de contraste con el método rápido de Giemsa es útil para diferenciar la melanina y poder así usar diferentes cromógenos.
- 10.- El estudio del marcador de migración Acetil-Colina-Transferasa (ChAT) no ha permitido diferenciar los nevos con alteración arquitectural y atipia de los melanocitos, con diferentes grados de atipia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ries LA, Hankey BF, Miller BA, y cols. Cancer statistics review 1973-1988. Bethesda, Md: National Cancer Institute. Surveillance Epidemiology and End Results (SEER) data base. NIH publication 1991, N° 91-2789.
2. Rigel DS, Kopf AW, Friedman RJ. The rate of malignant melanoma in the US: Are we making an impact?. J Am Acad Dermatol 1987; 17: 1050.
3. MacKie R, Freudenberger T, Aichinson TC. Personal risk-factor chart for cutaneous melanoma. Lancet 1989; 2: 487.
4. Titus-Ernstoff L, Duray PH, Ernstoff MS y cols. Displastic nevi in association with multiple primary melanoma. Displastic nevi in association with multiple primary melanoma. Cancer Res 1988; 48: 1016.
5. Holly EA, Kelly JW, Shpall SN y cols. Number of melanocytic nevi as a major risk for malignant melanoma. J Am Acad Dermatol 1987; 17: 459.
6. Rigel DS, Rivers JK, Kopf AW y cols. Dysplastic nevi. Markers for increased risk for melanoma. Cancer 1989; 63: 386.
7. Marghoob AA, Kopf AW, Rigel DS, y cols. Risk of cutaneous malignant melanoma in patients with "classic" atypical-mole syndrome. Arch Dermatol 1994; 130: 993.

8. Kang S, Barnhill RL, Mihm MC, y cols. Multiple primary cutaneous melanomas. *Cancer* 1992; 70: 1911.
9. Slingluff CL, Dodge RK, Stanley WE, y cols. The annual risk of melanoma progression. *Cancer* 1992; 70: 1917.
10. Sober AJ, Burstein JM. Precursors to skin cancer. *Cancer* 1995; 75: 645.
11. Swerdlow AJ, Green A. Melanocytic naevi and melanoma: and epidemiological perspective. *Br J Dermatol* 1987; 117: 137.
12. Rhodes AR, Weinstock MA, Fitzpatrick TB, y cols. Risk of factors for cutaneous melanoma. *JAMA* 1987; 258: 3146.
13. Clark WH Jr, Reimer RR, Greene MH, y cols. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions: The B-K mole syndrome. *Arch Dermatol* 1978; 114: 732.
14. Lynch HT, Fritchot BC, Lynch JF. Familial multiple mole-melanoma syndrome. *J Med Genet* 1978; 15: 352.
15. Elder DE, Goldman LI, Goldman SC, y cols. Dysplastic nevus syndrome: a phenotypic association of sporadic cutaneous melanoma. *Cancer* 1980; 46: 1787.

16. Norris W. A case of fungoid disease. *Edinb Med Surg J* 1820; 16: 562.
17. Cawley EP. Genetic aspects of malignant melanoma. *AMA Arch Dermatol* 1952; 65: 440.
18. Ackerman AB, Mihara I. Dysplasia, dysplastic melanocytes, dysplastic nevi, the dysplastic nevus syndrome, and the relation between dysplastic nevi and malignant melanoma. *Hum Pathol* 1985; 16: 87.
19. Fusaro RM. Acquired Nonfamilial melanoma: an inappropriate conclusion. *Arch Dermatol* 1987; 123: 1595.
20. Ackerman AB. What naevus is dysplastic, a syndrome and the commonest precursor of malignant melanoma? A riddle and an answer. *Histopathology* 1988; 13: 241.
21. Lambert WC, Crutcher WA. Diagnostic approaches to pigmented lesions. *J Cutan Pathol* 1989; 16: 177.
22. Jones EW, Cerio R, Smith NP. Dysplastic nevi. *Histopathology* 1989; 15: 103.
23. Sagebiel RW. The dysplastic melanocytic nevus. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 496.

24. Cook MG, Fallowfield ME. Dysplastic naevi- an alternative view. *Histopathology* 1990; 16: 29.
25. Ackerman AB, Magana-Garcia M. Naming acquired melanocytic nevi. Unna's, Miescher's, Spitz's, Clark's. *Am J Dermatopathol* 1990; 1 (2): 193.
26. Murphy GF. Dysplastic melanocytic nevi. *Arch Dermatol* 1990; 126: 519.
27. Roth ME, Grant-Kels JM, Ackerman AB, y cols. The histopathology of dysplastic nevi. Continued controversy. *Am J Dermatopathol* 1991; 13: 38.
28. Shapiro PE. Making sense of the dysplastic nevus controversy. A unifying perspective. *Am J Dermatopathol* 1992; 14: 350.
29. Cochran AJ. The role of the histopathologist in the diagnosis of dysplastic nevi. *Histopathology* 1994; 24: 589.
30. Weinstock MA. Dysplastic nevi revisited. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 807.
31. Blessing K. Benign atypical naevi: diagnostic difficulties and continued controversy. *Histopathology* 1999; 34: 189.
32. Ackerman AB. Mythology and numerology in the sphere of melanoma. *Cancer* 2000; 88: 491.

33. Mehregan AH. Dysplastic nevi: a histopathological investigation. *J Cutan Pathol* 1988; 15: 276.
34. Steijlen PM, Bergman W, Hermans J, y cols. The efficacy of histopathological criteria required for diagnosing dysplastic nevi. *Histopathology* 1988; 12: 289.
35. Rivers JK, Cockerell CJ, McBride A, y cols. Quantification of histologic features of dysplastic nevi. *Am J Dermatopathol* 1990; 12: 42.
36. Urso C, Giannini A, Bartolini M, y cols. Histological analysis of intraepidermal proliferations of atypical melanocytes. *Am J Dermatopathol* 1990; 12: 150.
37. Klein LJ, Barr RJ. Histologic atypia in clinically benign nevi. A prospective study. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 275.
38. Barnhill RL, Roush GC. Histopathologic spectrum of clinically atypical melanocytic nevi. *Arch Dermatol* 1990; 126: 1315.
39. Piepkorn M. A hypothesis incorporating the histologic characteristics of dyplastic nevi into the normal biological development of melanocytic nevi. *Arch Dermatol* 1990; 126: 514.

40. Murphy GF, Mihm MC. Recognition and evaluation of cytological dysplasia in acquired melanocytic nevi. *Hum Pathol* 1999; 30: 506.
41. Clemente C, Cochran AF, Elder DE, y cols. Histopathologic diagnosis of dysplastic nevi: concordance among pathologists convened by the world health organization melanoma programme. *Hum Pathol* 1991; 22: 313.
42. Smoller BR, Egbert BM. Dysplastic nevi can be diagnosed and graded reproducibly: a longitudinal study. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 399.
43. Duncan LM, Berwick M, Bruijn JA, y cols. Histopathologic recognition and grading of dysplastic melanocytic nevi: an interobserver agreement study. *J Invest Dermatol* 1993; 100: 318S.
44. Piepkorn MW, Barnhill RL, Cannon-Albright, y cols. A multiobserver, population-based analysis of histologic dysplasia in melanocytic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1994; 30: 707.
45. Hastrup N, Clemmensen OJ, Spaun E, y cols. Dysplastic nevus: histological criteria and their interobserver reproducibility. *Histopathology* 1994; 24: 503.
46. Weinstock MA, Barnhill RL, Rhodes AR. Reliability of the histopathologic diagnosis of melanocytic dysplasia. *Arch Dermatol* 1997; 133: 953.

47. Roush GC, Barnhill RL, Duray PH. Diagnosis of the dysplastic nevus syndrome in different populations. *J Am Acad Dermatol* 1986; 14: 419.
48. Kelly JW, Crutcher WA, Sagebiel RW. Clinical diagnosis of dysplastic melanocytic nevi. A clinicopathologic correlation. *J Am Acad Dermatol* 1986; 14: 1044.
49. Rhodes AR, Weinstock MA, Fitzpatrick TB, y cols. Risk factors for cutaneous melanoma. A practical method of recognizing predisposed individuals. *J Am Med Assoc* 1987; 258: 3146.
50. Barnhill RL, Hurwitz S, Duray PH, y cols. The dysplastic nevus: recognition and management. *Plast Reconstr Surg* 1988; 81: 230.
51. Piepkorn M, Meyer LJ, Goldgar D, y cols. The dysplastic melanocytic nevus: a prevalent lesion that correlates poorly with clinical phenotype. *J Am Acad Dermatol* 1989; 20: 407.
52. Black WC, Hunt WC. Histologic correlations with the clinical diagnosis of dysplastic nevus. *Am J Surg Pathol* 1990; 14: 44.
53. Ahmed I, Piepkorn MW, Rabkin MS, y cols. Histopathologic characteristics of dysplastic nevi. Limited association of conventional histologic criteria with melanoma risk group. *J Am Acad Dermatol* 1990; 22: 727.

54. Barnhill RL, Roush GC, Ernstoff MS, y cols. Interclinician agreement on the recognition of selected gross morphologic features of pigmented lesions. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26: 185.
55. Roush GC, Dubin N, Barnhill RL. Prediction of histologic melanocytic dysplasia from clinical observation. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29: 555.
56. National Institutes of Health Consensus Conference: Precursors to malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1984; 251: 1864.
57. NIH Consensus Development Conference: diagnosis and treatment of early melanoma. *JAMA* 1992; 268: 1314.
58. Sagebiel RW, Banda PW, Schneider JS, y cols. Age distribution and histologic patterns of dysplastic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1985; 13: 975.
59. Tong AFK, Murphy GF, Mihm MC Jr. Dysplastic nevus. A formal histogenetic precursor of malignant melanoma. En: Mihm MC, Murphy GF, Kaufman N, eds *Pathobiology and recognition of malignant melanoma*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1988: 10.
60. Rhodes AR, Sober AJ, Mihm MC, y cols. Possible risk factors for primary cutaneous malignant melanoma. *Clin Res* 1980; 28: 252A.

61. Kraemer KH, Greene MH, Tarone RE, y cols. Dysplastic naevi and cutaneous melanoma risk. *Lancet* 1983; 2: 1076.
62. Crutcher WA, Sagebiel RW. Prevalence of dysplastic naevi in a community practice (Letter). *Lancet* 1984; 1: 729.
63. McCarthy WH, Coates AS. The dysplastic naevus syndrome: identifying the at-risk patient. *Pat Manag* 1985; 14: 43.
64. Nordlund JJ, Kirkwood J, Forget BM, y cols. Demographic study of clinically atypical (dysplastic) nevi in patients with melanoma and comparison subjects. *Canc Res* 1985; 45: 1855.
65. Grob JJ, Andrac L, Romano MH, y cols. Dysplastic naevus in non-familial melanoma. A clinico-pathological study of 101 cases. *Br J Dermatol* 1988; 118: 745.
66. Cooke KR, Spears GFS, Elder DE, y cols. Dysplastic naevi in a population-based survey. *Cancer* 1989; 63: 1240.
67. Augustsson A, Stierner U, Suukürila M, y cols. Prevalence of common and dysplastic naevi in a swedish population. *Br J Dermatol* 1991; 124: 152.

68. Swerdlow AJ, English J, MacKie RM, y cols. Benign melanocytic nevi as a major risk for malignant melanoma. *Br J Med* 1986; 292: 1555.
69. Roush CG, Nordlund JJ, Forget B, y cols. Independence of dysplastic nevi from total nevi in determining risk for nonfamilial melanoma. *Prev Med* 1988; 17: 273.
70. Garbe C, Kruger S, Stadler R, y cols. Markers and relative risk in a German population for developing malignant melanoma. *Int J Dermatol* 1989; 28: 517.
71. Grob JJ, Gouvernet J, Aymar D, y cols. Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma. *Cancer* 1990; 66: 387.
72. Halpern AC, Guerry D IV, Elder DE, y cols. Dysplastic nevi as a risk markers of sporadic (nonfamilial) melanoma: a case-control study. *Arch Dermatol* 1991; 127: 995.
73. Garbe C, Buttner P, Weiss J, y cols. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the central malignant melanoma registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* 1994; 102: 695.

74. Bataille V, Bishop JA, Sasieni P, y cols. Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of nevus: a case-control study. *Br J Cancer* 1996; 73: 1605.
75. Tucker MA, Halpern A, Holly EA, y cols. Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA* 1997; 277: 1439.
76. Elder DE, Greene MH, Bondi EE, y cols. Acquired melanocytic nevi and melanoma: the dysplastic nevus syndrome. En: Ackerman AB, ed. *Pathology of malignant melanoma*. New York. Masson 1981; 185.
77. Cook MG, Robertson I. Melanocytic dysplasia and melanoma. *Histopathology* 1985; 9: 647.
78. Maize JC, Ackerman AB. The dysplastic nevus and the dysplastic nevus syndrome. En: Maize JC; Ackerman AB, eds. *Pigmented lesions of the skin*. Philadelphia: Lea & Febiger 1987: 257.
79. Black WC. Residual dysplastic and other nevi in superficial spreading melanoma: clinical correlation and association with sun damage. *Cancer* 1988; 62: 163.

80. Marks R, Dorevitch AP, Mason G. Do all melanomas come from moles? A study of the histological association between melanocytic nevi and melanoma. *Australas J Dermatol* 1990; 31: 77.
81. Hastrup N, Osterlind A, Drzewiecki KT, y cols. The presence of dysplastic nevus remnants in malignant melanomas: a population based study of 551 malignant melanomas. *Am J Dermatopathol* 1991; 13: 378.
82. Skender-Kalnenas, English DR, y cols. Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma? *J Am Acad Dermatol* 1995; 33: 1000.
83. Slue W, Kopf AW, Rivers JK. Total-body photographs of dysplastic nevi. *Arch Dermatol* 1988; 124: 1239.
84. Rapini RP. Photographs for Clarks's "dysplastic" nevi? *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 1130.
85. Kopf AW, Rivers JK, Slue W, y cols. Photographs are useful for detection of malignant melanomas in patients who have dysplastic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1988; 19: 1132.
86. Zemtsov A, Camisa C. Is photography necessary for following up patients with dysplastic nevi? *Arch Dermatol* 1989; 125: 563.

87. Schosser R, Michaels KV, Giannola S. Total body photographs of dysplastic nevi. *Arch Dermatol* 1989; 125: 566.
88. Barnes LM, Nordlund JJ. The natural history of dysplastic nevi. A case history illustrating their evolution. *Arch Dermatol* 1987; 123: 1059.
89. Halpern AC, Guerry IV DP, Elder DE, y cols. Natural history of dysplastic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1993; 29: 51.
90. Slade J, Marghoob AA, Salopek TG, y cols. Atypical mole syndrome: risk factor for cutaneous malignant melanoma and implications for management. *J Am Acad Dermatol* 1995;32: 479.
91. Rampen FH, Van Huystee BE, Kiemeney LA. Melanoma/ skin cancer screening clinics: experiences in the Netherlands. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25: 776.
92. Geller AC, Halpern AC, Sun TS, y cols. Participant satisfaction and value in American Academy of Dermatology and American Cancer Society Skin cancer screening programs in Massachusetts. *J Am Acad Dermatol* 1999; 40: 563.
93. Gerdes J, Schwab LJ, Lemke H y cols. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 1983; 31: 13.

94. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, y cols. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984; 133: 1710.
95. Gerdes J, Li L, Schlueter C, y cols. Immunohistochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol* 1991; 138: 867.
96. Duchrow M, Schulter C, Key G, y cols. Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *Arch Immunol Ther Exp* 1995; 43: 117.
97. Elias JM. Cell proliferation indexes: a biomarker in solid tumors. *Biotech Histochem* 1997; 72: 78.
98. Wilkinson EJ, Hendricks JB. Role of the pathologist in biomarker studies. *J Cell Biochem Suppl* 1995; 23: 10.
99. Fakan S, Hernandez-Verdun D. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. *Biol Cell* 1986; 56: 189.
100. Bravo R, Frank R, Blundell PA, y cols. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* 1987; 326: 515.

101. Dolbeare F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine. Part II: Oncology, chemotherapy and carcinogenesis. *Histochem J* 1995; 27(12): 923.
102. Dorr W, Arui J, Beisker W, y cols. Cell kinetic studies in mouse tongue mucosa by autoradiographic, immunohistochemical and flow cytometric studies. *Cell Prolif* 1994; 27(6): 321.
103. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology* 1990; 17: 489.
104. Brinck U, Stachura J, Rudzki Z, y cols. Prognostic relevance of Ki-67 antigen and c-myc oncoprotein in malignant fibrous histiocytoma. *Anticancer Res* 1995; 15: 1915.
105. Mirecka J, Korabiowska M, Schauer A. Correlation between the occurrence of Ki-67 antigen and clinical parameters in human breast carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 1993; 31: 83.
106. Vogt T, Zipperer KH, Vogt A, y cols. p 53 protein and Ki-67 antigen expression are both reliable biomarkers of prognosis in thick stage I nodular melanomas of the skin. *Histopathology* 1997; 30: 57.

107. Henrique R, Azevedo R, Bento MJ y cols. Prognostic value of Ki-67 expression in localized cutaneous malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 991.
108. Boni R, Dogough A, Burg G, y cols. MIB-1 immunoreactivity correlates with metastatic dissemination in primary thick cutaneous melanomas. *J Am Acad Dermatol* 1996; 35: 416.
109. Reddy VB; Gattuso P, Aranha G y cols. Cell proliferation markers in predicting metastases in malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1995; 22: 248.
110. Kanter- Lewensohn L, Hedblad MA, Weijde J, y cols. Immunohistochemical markers for distinguishing Spitz nevi from malignant melanomas. *Mod Pathol* 1997; 10 : 917.
111. McNutt NS, Urmacher C, Hakimian J, y cols. Nevoid malignant melanoma: morphologic patterns and immunohistochemical reactivity. *J Cutan Pathol* 1995; 22: 502.
112. Wick MR, Swanson PE, Rocamora A. Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45: an immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. *J Cutan Pathol* 1988; 15: 201.

113. Tsao H, Sober AJ, Barnhill RL. Desmoplastic neurotropic melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 1997; 16: 131.
114. Skelton HG III, Smith KJ, Barret TL y cols. HMB-45 staining in benign and malignant melanocytic lesions: a reflection of cellular activation. *Am J Dermatopathol* 1991; 13: 543.
115. Smoller BR. Immunohistochemistry in the diagnosis of melanocytic neoplasms (State of the art reviews). *Pathology* 1994; 2: 371.
116. Wood WS, Tron VA. Analysis of HMB-45 immunoreactivity in common and cellular blue nevi. *J Cutan Pathol* 1991; 18: 261.
117. Layer PG, Willbold E. Novel functions of cholinesterases in development, physiology and disease. *Prog Histochem Cytochem* 1995; 29:1.
118. Lammerding-Köppel M, Drews U. Neural crest cells exhibit a muscarinic cholinergic system during migration. *Ann Anat* 1993; 175 (suppl.): 19.
119. Soreq H, Lapidot-Lifson Y, Zakut H. A role of cholinesterases in tumorigenesis? *Cancer Cells* 1991; 3: 511.

120. Lammerding-Köppel M, Noda S, Blum G y cols. Immunohistochemical localization of muscarinic acetylcholine receptors in primary and metastatic malignant melanomas. *J Cutan Pathol* 1997; 25: 137.
121. Rhodes AR, Mihm MC Jr, Weinstock MA. Dysplastic nevi: a reproducible histologic definition emphasizing cellular morphology. *Mod Pathol* 1989; 2: 306.
122. Reed JA, Manahan LJ, Park LS. Complete one-hour immunohistochemistry based on capillary action. *Biotechniques* 1992; 13(3): 434.
123. Robert C, Vermont J, Bosson JL. Formulas for threshold computations. *Comput Biomed Res* 1991; 24: 514.
124. Christopherson WM. Dysplasia, carcinoma in situ, and microinvasive carcinoma of the uterine cervix. *Hum Pathol* 1977; 8: 489.
125. Ming SC, Bajtai A, Correa N y cols. Gastric dysplasia. Significance and pathologic criteria. *Cancer* 1984; 54: 1794.
126. Broder AC. The microscopic grading of cancer. *Surg Clin North Am* 1941; 21: 947.

127. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1982; 6: 655.
128. Bloom HJG, Richardson WW, Harris ED. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* 1957; 2: 213.
129. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, et cols. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; 29:705.
130. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of malignant melanoma. *Ann Surg* 1970; 172: 902.
131. Elder D, Elenitsas R. Benign and pigmented lesions and malignant melanoma. En: Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson B eds. *Histopathology of the skin*. Philadelphia: Lippincott- Raven, 1997: 625.
132. Barnhill RL, Roush GC, Duray PH. Correlation of histological features and cytoplasmic features with nuclear atypia in atypical (dysplastic) nevi. *Hum Pathol* 1990; 21: 50.
133. Barnhill RL. *Pathology of melanocytic nevi and malignant melanoma*. Stoneham, MA. Butterworth-Heinemann, 1995.

134. Shea CR, Vollmer RT, Prieto VG. Correlating architectural disorder and cytologic atypia in Clark (dysplastic) melanocytic nevi. *Hum Pathol* 1999; 30: 500.
135. Bergman W, Ruiters DJ, Scheffer E, y cols. Melanocytic atypia in dysplastic nevi. Immunohistochemical and cytophotometrical analysis. *Cancer* 1988; 61: 1660
136. Kopf AW, Gold RS, Rogers GS, y cols. Relationship of lumbosacral nevocytic nevi to sun exposure in dysplastic nevus syndrome. *Arch Dermatol* 1986; 122:1003.
137. Abadir MC, Marghoob AA, Slade JS, y cols. Case-control study of melanocytic nevi on the buttocks in atypical mole syndrome: role of solar radiation in the pathogenesis of atypical moles. *J Am Acad Dermatol* 1995; 33: 31.
138. Clark WH Jr, Tucker. Problems with lesions related to the development of malignant melanoma: common nevi, dysplastic nevi, malignant melanoma in situ, and radial growth phase malignant melanoma. *Hum Pathol* 1998; 29: 8.
139. Takahashi H, Horikoshi T, Jimbow K. Fine structural characterization of melanosomes in dysplastic nevi. *Cancer* 1985; 56: 11.

140. Rhodes AR, Seki Y, Fitzpatrick TB, y cols. Melanosomal alterations in dysplastic melanocytic nevi. A quantitative, ultrastructural investigation. *Cancer* 1988; 61: 358.
141. Vicente V, Martinez F, Carrascosa C, y cols. Abnormal melanosomes: ultrastructural markers of melanocytic atypia. *Ultrastruc Pathol* 1995; 19:119.
142. Fleming MG, Wied GL, Dytch HE. Image analysis cytometry of dysplastic nevi. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 287.
143. Schmiegelow P, Schroiff R, Breitbart E, y cols. Malignant melanoma- its precursors and topography of proliferation. *Virchows Arch* 1986; 409: 47.
144. Björnhagen V, Bonfoco E, Mansson E, y cols. Morphometric, DNA, and proliferating cell nuclear antigen measurements in benign melanocytic lesions and cutaneous malignant melanoma. *Am J Dermatopahtol* 1994; 16 (6): 615.
145. Newton JA, Camplejohn RS, McGibbon DH. The flow cytometry of melanocytic skin lesions. *J Invest Dermatol* 1988; 91: 380A.
146. Jacobsen AB; Thorud E, Fossa SD, y cols. DNA flow cytometry in metastases and a recurrency of malignant melanomas. A comparison of results of fresh an paraffin embedded material. *Virchows Arch* 1988; 54: 273.

147. Slater DS, Cook MG, Fisher C; y cols. A comparative study of proliferation indices and ploidy in dysplastic nevi and malignant melanomas using flow cytometry. *Histopathology* 1991; 19: 337.
148. Winokur TS, Palazzo JP, Johnson WC y cols. Evaluation of DNA ploidy in dysplastic and Spitz nevi by flow cytometry. *J Cutan Pathol* 1990; 17: 342.
149. Sondergaard K, Larse JK, Moller U y cols. DNA ploidy characteristics of human malignant melanoma analyzed by flow cytometry and compared with histology and clinical course. *Virchows Arch* 1983; 42: 43.
150. Stenzinger W, Suter L, Schumann J. DNA aneuploidy in congenital melanocytic nevi: suggestive evidence for premalignant changes. *J Invest Dermatol* 1984; 82: 569.
151. Buchner T, Hiddemann, Wormann B, y cols. Differential pattern of DNA-aneuploidy in human malignancies. *Pathol Res Pract* 1985; 179: 310.
152. Ohnishi K, Ishikawa H. Flow cytometry DNA analysis of primary cutaneous malignant melanoma. *Acta Dermatol Venereol (Stokh)* 1991; 71: 525.

153. Lindholm C, Bjelkenfrantz K, Hofer PA. DNA-cytophotometry of benign compound and intradermal naevi, Spitz epithelioid naevi and malignant melanomas. *Virchows Arch* 1987; 53: 257.
154. Chi HI, Ishibashi Y, Shima A, y cols. Use of DAPI cytofluorometric análisis of cellular DNA content to differentiate Spitz nevus from malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 154.
155. Fleming MG, Swan LS, Heenan PJ. Seasonal variation in the proliferation fraction of Australian common nevi. *Am J Dermatopathol* 1991; 13: 463.
156. Korabiowska M, Brinck U, Brinkmann U y cols. Prognostic significance of newly defined ploidy related parameters in melanoma. *Anticancer Res* 2000; 20: 1685.
157. Coon JS, Landay AL, Weinstein RS. Advances in flow cytometry for diagnostic pathology. *Lab Invest* 1987; 57: 453.
158. Lehmann JM, Holzmann B, Eckhard W, y cols. Discrimination between a benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. *Cancer Res* 1987; 47: 841.

159. Maeda K, Maeda K, Kowichi J, y cols. Positive reactivity of dysplastic melanocytes with a monoconal antibody against melanoma melanosomes, MoAb HMSA-2. *J Invest Dermatol* 1988; 91: 247.
160. Thomson TM, Real XR, Murakami S, y cols. Differentiation antigens of melanocytes and melanoma: analysis of melanosome and cell surface markers of human pigmented cells with monoclonal antibodies. *J Invest Dermatol* 1988; 90: 459.
161. Thomson W, MacKie R. Comparison of five antimelanoma antibodies for identification of melanocytic cells on tissue sections in routine dermatopathology. *J Am Acad Dermatol* 1989; 21: 1280.
162. Smoller BR, McNutt NS, Hsu A. HMB-45 staining of dysplastic nevi. Support for a spectrum progression toward melanoma. *Am J Surg Pathol* 1989; 13 (8): 680.
163. Palazzo J, Duray PH. Typical, dysplastic, congenital and Spitz nevi: a comparative immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1989; 20: 341.
164. Cho KH, Hashimoto K, Tniguchi Y, y cols. Immunohistochemical study of melanocytic nevus and malignant melanoma with monoclonal antibodies against S-100 subunits. *Cancer* 1990; 66: 765.

165. Ahmed I, Piepkorn M, Goldgar DE, y cols. HMB-45 staining of dysplastic melanocytic nevi in melanoma risk groups. *J Cutan Pathol* 1991; 18: 257.
166. Ellis DL, Wheeland RG, Solomon H. Estrogen and progesterone receptors in melanocytic lesions. *Arch Dermatol* 1985; 121: 1282.
167. Lecavalier MA, Gaid N. Absence of estrogen receptors in dysplastic nevi and malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 1990; 23: 242.
168. Ellis DL, King LL E, Nanney LB. Increased epidermal growth factor receptors in melanocytic lesions. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 539.
169. Nannney LB, Coffey RJ. Ellis DL. Expression and distribution of transforming growth factor- within melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 707.
170. Morales- Ducret CRJ, Van de Rijn M, Smoller BR. bcl-2 expression in melanocytic nevi. *Ach Dermatol* 1995; 131: 915.
171. Cerroni L, Soyer P, Kerl H. bcl-2 protein expression in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic nevi. *Am J Dermatopathol* 1995; 17: 7.
172. Maeda A, Aragane Y, Tezuka T. Expression of CD95 ligand in melanocytic lesions as a diagnostic marker. *Br J Dermatol* 1998; 139: 198.

173. Tuominen H, Kallioinen M. Increased tenascin expression in melanocytic tumors. *J Cutan Pathol* 1994; 31: 424.
174. Van Duinen CM, Fleuren GJ, Bruijn JA. The extracellular matrix in pigmented skin lesions: an immunohistochemical study. *Histopathology* 1994; 24: 33.
175. Podhajcer OL, Bover L, Bravo AI y cols. Expression of Cathepsin D in primary and metastatic human melanoma and dysplastic nevi. *J Invest Dermatol* 1995; 104: 340.
176. Leigh CJ, Palechek PL, Knutson JF, y cols. CD44 expression in benign and malignant nevocellular lesions. *Hum Pathol* 1996; 27: 1288.
177. Schaidt H, Soyer P, Heider KH, y cols. CD44 and variants in melanocytic skin neoplasms. *J Cutan Pathol* 1998; 25: 199.
178. Smoller BR, Krueger J. Detection of cytokine-induced protein -immune protein-10 (-IP 10) in atypical melanocytic proliferations. *J Am Acad Dermatol* 1991; 25: 627.
179. Van Duinen CM, Van den Broek L, Vermeer BJ, y cols. The distribution of cellular adhesion molecules in pigmented lesions. *Cancer* 1994; 73: 2131.

180. Ahmed AA, Nordkind K, Hedblad M, y cols. Interleukin-1 and 1 b, IL-6, and Tumor necrosis factor- like immunoreactivities in human common and dysplastic nevocellular nevi and malignant melanoma. Am J Dermatopathol 1995; 17: 222.
181. Kornstein MJ, Brooks JSJ, Elder DE. Immunoperoxidase localization of lymphocyte subsets in the host response to melanoma and nevi. Cancer Res 1983; 43: 2749.
182. Louis DN, Edgerton S, Thor AD, y cols. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 immunohistochemistry in brain tumors: a comparative study. Acta Neuropathol 1991; 81: 675.
183. MacKie RM, White SI, Seywright MM, y cols. An assessment of the value of AgNOR staining in the identification of dysplastic and other borderline melanocytic lesions. Br J Dermatol 1989; 120: 511.
184. Howat AJ, Wright AL, Cotton DWK y cols. AgNOR in benign, dysplastic and malignant melanocytic skin lesions. Am J Dermatopathol 1990; 12: 156.
185. Di Gregorio C, Losi L, Annessi G, y cols. Nucleolar organizer regions in malignant melanoma and melanocytic nevi. Comparison of two counting methods. Am J Dermatopathol 1991; 13: 329.

186. Gonzalez AP, Kumar D, Sanchez RL. AgNOR area measurements differentiate benign and malignant melanocytic lesions more accurately than simple counting. *Am J Dermatopathol* 1994; 16: 372.
187. Fogt F, Vortmeyer AO, Tahan SR. Nucleolar organizer regions (AgNOR) and Ki-67 immunoreactivity in cutaneous melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* 1995; 17: 12.
188. Tokuda Y, Mukai K, Matsuno Y, y cols. Proliferative activity of cutaneous melanocytic neoplasms neoplasms defined by a proliferating cell nuclear antigen labelling index. *Arch Dermatol Res* 1992; 284: 319.
189. Takahashi H, Strutton GM, Parsons PG. Determination of proliferating fractions in malignant melanomas by anti-PCNA/cyclin monoclonal antibody. *Histopathology* 1991; 18: 221.
190. Smolle J, Soyer HP, Kerl H. Proliferative activity of cutaneous melanocytic tumors defined by Ki-67 monclonal antibody. *Am J Dermatopathol* 1989; 11: 301.
191. Ostmeier H, Suter L. The Ki-67 antigen in primary human melanomas- its relationship to mitotic rate and tumor thickness and its stability. *Dermatol Res* 1989; 281: 173.

192. Soyer HP. Ki-67 immunostaining in melanocytic skin tumors. Correlation with histologic parameters. *J Cutan Pathol* 1991; 18: 264.
193. Smolle J, Hofmann-Wellenhof R, Kerl H. Prognostic significance of proliferation and motility in primary malignant melanoma of the skin. *J Cutan Pathol* 1992; 19: 110.
194. Rieger E, Hofmann-Wellenhof R, Soyer HP, y cols. Comparison of proliferative activity as assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 monoclonal antibodies in melanocytic skin lesions. *J Cutan Pathol* 1993; 20:229.
195. Reddy VB, Gattuso, Aranha G, y cols. Cell proliferation markers in predicting metastases and malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 1995; 22: 248.
196. Talvo LA, Collan YU, Ekfors TO. Nuclear morphometry, immunohistochemical staining with Ki-67 antibody and mitotic index in the assessment of proliferative activity and prognosis of primary malignant melanomas of the skin. *J Cutan Pathol* 1996; 23: 335.
197. Kaleem Z, Lind AC, Humphrey PA, y cols. Concurrent Ki-67 and p53 immunolabeling in cutaneous melanocytic neoplasms: an adjunct for recognition of the vertical growth phase in malignant melanomas? *Mod Pathol* 2000; 13: 217.

198. Korabiowska M, Brinck U, Middel P y cols. Proliferative activity in the progression of pigmented skin lesions, diagnostic and prognostic significance. *Anticancer Res* 2000; 20: 1781.
199. Kamino H, Tam ST. Immunoperoxidase technique modified by counterstain with azure B as a diagnostic aid in evaluating heavily pigmented melanocytic neoplasms. *J Cutan Pathol* 1991; 18: 436.
200. Bruijn JA, Berwick M, Mihm MC Jr y cols. Common acquired melanocytic nevi, dysplastic melanocytic nevi and malignant melanomas: an image analysis cytometric study. *J Cutan Pathol* 1993; 20: 121.
201. Schmidt B, Weinberg DS, Hollister K, y cols. Analysis of melanocytic lesions by DNA image cytometry. *Cancer* 1994; 73(12): 2917.
202. Drews U. Cholinesterase in embryonic development. *Porg Histochem Cytochem* 1975; 7:1.
203. Reich A, Drews U. Choline acetyltransferase in the chick limb bud. *Histochemistry* 1983; 78: 383.
204. Schmith H. Muscarinic acetylcholine receptor in chick limb bud during morphogenesis. *Histochemistry* 1981; 71: 89.

205. Laasberg T, Neuman T, Langel U. Acetylcholine receptors in the gastrulating chick embryo. *Experienta* 1986; 42: 439.
206. Oettling G, Schmidt H, Show-Klett A, y cols. Expression of the Ca^{2+} mobilizing muscarinic system in the chick embryo correlates with morphogenesis. *Cell Diff* 1988; 23: 77.
207. Lammerding-Köppel M, Spindler-Barth M, Drews U. 20-OH-Ecdysone-induced morphogenetic movements in a *Chironomus* cell line are accompanied by expression of an embryonic muscarinic system, *Roux's Arch Dev Biol* 1994; 203: 439.
208. Lammerding-Köppel M, Noda S, Drews U. Primordial germ cells express an embryonic muscarinic system during migration in chick embryo. Kühnel W, ed. *Annals of anatomy*. Jena, Stuttgart, New York: Gustav Fisher Verlag, 1994; 176 (suppl): 17.
209. Razon N, Soreq H, Roth E, y cols. Characterization of activities and forms of cholinesterases in human primary brain tumors. *Exp Neurol* 1984; 84: 681.
210. Williams CL, Hayes AM, Hummel JE, y cols. Regulation of E-cadherin-mediated adhesion by muscarinic acetylcholine receptors in small cell lung carcinoma. *J. Cell Biol* 1993; 121: 643.

211. Zakut H, Ehrlich G, Ayalon A, y cols. Acetilcholinesterase and butyrylcholinesterase genes coamplify in primary ovarian carcinomas. *J Clin Invest* 1990; 86: 900.
212. Noda S, Lammerding-Köppel M, Oetting G y cols. Characterization of muscarinic receptors in the human melanoma cell line SK-Mel-28 via calcium mobilization. *Cancer Letters* 1998; 133: 107.
213. Kohn EC, Alessandro R, Probst J, y cols. Identification and molecular characterization of a m5 muscarinic receptor in A2058 human melanoma cells. Coupling to inhibition of adenylyl cyclase and stimulation of phospholipase A2. *J Cell Biol* 1996; 271: 17476.
214. Grando SA, Kirst DA, Qi M y cols. Human keratinocytes synthesize, secrete and degrade acetylcholine. *Soc Invest Dermatol* 1993; 101: 32.