



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Estudi de les alteracions genètiques en melanoma cutani mitjançant hibridació *in situ* fluorescent: valor diagnòstic i pronòstic

Maria Alba Díaz Lorca

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

**Tesi doctoral**  
Universitat de Barcelona  
Facultat de Medicina

**Estudi de les alteracions genètiques en  
melanoma cutani mitjançant hibridació *in  
situ* fluorescent: valor diagnòstic i pronòstic**

**Maria Alba Díaz Lorca**  
**Barcelona, 2015**





**Estudi de les alteracions genètiques en  
melanoma cutani mitjançant hibridació *in situ*  
fluorescent: valor diagnòstic i pronòstic**

Tesi presentada per  
Maria Alba Díaz Lorca  
Per optar al grau de Doctor en Medicina

Directora: Dra. Llúcia Alòs Hernández

Facultat de Medicina  
Departament d'Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia  
Universitat de Barcelona  
Març 2015



La Dra. Llúcia Alòs Hernández certifica que la tesi titulada “**Estudi de les alteracions genètiques en melanoma cutani mitjançant hibridació *in situ* fluorescent: valor diagnòstic i pronòstic**”, presentada per Maria Alba Díaz Lorca, ha estat realitzada sota la seva direcció i compleix tots els requisits que dicta la normativa vigent per a la presentació de tesis doctorals com a compendi d’articles a la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

Dra. Llúcia Alòs Hernández

Barcelona, Març de 2015



*Al Marc*

*Al Martí (el meu sol)*

*A la Berta (la meva lluna)*





*No es veu bé més  
que amb el cor;  
allò essencial  
és invisible per als ulls*

“El petit príncep”  
Antoine de Saint-Exupéry



## Agraïments

Primer de tot vull donar les gràcies de tot cor a la Llúcia, artífex d'aquesta tesi i de tota la feina que hi ha al darrera. Gràcies Llúcia per haver-me obert els braços des del primer dia i per haver-me iniciat en el món de la nostra professió, en tots els seus camps. Però sobretot per ensenyar-me a assaborir les coses amb una combinació perfecta de passió i bon humor, recepta a la que mai falta una gran dosi de consells pràctics així com tampoc un polsim d'aquell instint de protecció maternal que també et caracteritza. Gràcies de veritat!

Vull donar les gràcies també a tota la gent del Servei d'Anatomia Patològica, perquè tots junts conformen l'embolcall perfecte perquè la feina surti més ben feta. Recordo com si fos ahir el dia en què vaig venir a visitar el servei per primer cop, les bones vibracions que en vaig percebre i el gran entusiasme del Rami. No vaig dubtar ni un moment en decidir que tots vosaltres formariu part dels primers anys de la meva formació i resulta que heu esdevingut part imprescindible de la meva vida! En aquest punt voldria fer un agraïment especial a la Rosana per la seva amistat, de la teva "cilindrina", així com una especial dedicació a l'estimada Teresa Cuberes, per donar-me una lliçó de valentia i coratge.

Als tots els residents amb qui he tingut l'oportunitat de coincidir. Compartir en grup alegries i penes ho fa tot molt més increïble i inoblidable. A l'Àngels, la meva coR, perquè a pesar de la distància continuem connectades; al Dani, per ser el "Yang" que equilibrava tant "Yin"; a la Vicky, simplement per ser com ets i per continuar formant part de la meva vida i de la meva família; a la Paola, por tu capacidad de trabajo y tu fortaleza; a la Sofía, por ser tan dulce y cariñosa; i als "petits", a la Malu i al Leo, per la teva noblesa i sentit de l'humor. I a la Susi, per la teva generositat i senzillesa.

A totes les persones implicades en més o menys grau en els nostres treballs: a la gent del grup de Melanoma, per fer la feina ben feta i no parar mai els motors; a la Dolors Costa, per no tenir mai un “no” per resposta; a la Concha Muñoz, per haver compartit llargues esperes i passejades per tot l'hospital tot fent els BACs, ah! Y por prestarme tus metafases!; al Kiko i la Rocío (aquell moment a l'Hospital del Mar) per haver-nos obert les seves portes de bat a bat. I en especial a la Sandra (la Sandruski). Vaig tenir la sort de poder coincidir amb tu a “Júniors” durant els tres anys de la meva beca, sempre estas disposada a escoltar i donar bons consells, sense esperar res a canvi. Ara, a pesar de la distància, continues sent una petita peça clau en el meu dia a dia.

També voldria mencionar a la gent del Labo, perquè en els últims anys i sense voler també han passat a formar part inqüestionable de la meva vida i fins i tot de la meva família.

No m'oblidaria per res del món de les meves “margis” d'Igualada: la Laia, la Sara i la Núria. Sóc conscient que la nostra amistat està per sobre de qualsevol cosa, inclús les grans distàncies, i és que sempre aconseguim trobar cruïlles comunes en els nostres camins tant dispars (tot i que menys sovint del que m'agradaria).

I sobretot, mil gràcies a la meva família. Als meus pares, perquè per molt que sembli un tòpic, sense el seu esforç jo no seria on sóc. Ells m'han ensenyat que amb dedicació i treball es pot arribar on es vulgui. A les meves germanes: la Núria, per fer sempre el seu paper de germana gran a la perfecció, i a l'Anna, per aportar un toc imprescindible d'originalitat a la família. A l'Angelina, la sogra que qualsevol desitjaria. Al Marc, per tenir tanta paciència amb mi, per la teva complicitat, pel teu bon fer, per ser el millor home del món i per descomptat, el millor pare. Al Martí i a la Berta, per ser capaços d'arrencar-me un somriure cada dia, sou el millor que m'ha passat a la vida. Us estimo.

A tots vosaltres, gràcies!

# Índex

<b>Llista d'abreviacions utilitzades</b>	17
<b>I. Introducció</b>	19
<b>1.- Generalitats del melanoma cutani</b>	21
1.1.- Definició	21
1.2.- Factors etiològics	22
1.2.1.- RUV	22
1.2.2.- Fenotip cutani	22
1.2.3.- Predisposició genètica	23
1.3.- Epidemiologia	23
1.4.- Diagnòstic	24
1.4.1. - Aspectes clínics	24
1.4.2. - Aspectes anatomo-patològics	26
1.5.- Classificació actual	29
1.5.1.- Melanoma d'extensió superficial	30
1.5.2.- Melanoma nodular	31
1.5.3.- Melanoma tipus lentígen maligne	32
1.5.4.- Melanoma lentiginós acral	32
1.6.- Estadiatge i pronòstic	33
1.6.1.- Sistema TNM	33
1.6.1.1. Índex de Breslow	35
1.6.1.2. Ulceració	36
1.6.1.3. Índex mitòtic	36
1.6.2.- Altres criteris clinicopatològics amb probable implicació pronòstica	37
<b>2.- Particularitats de les neoplàsies melanocítiques fusocel·lulars</b>	41
2.1.- Nevus melanocític fusocel·lular pigmentat	41
2.2.- Melanoma fusocel·lular	42
<b>3.- Particularitats de les neoplàsies melanocítiques acrals</b>	44
3.1.- Nevus melanocític acral	44

3.2.- Melanoma lentiginós acral	45
<b>4.- Biologia molecular del melanoma</b>	<b>47</b>
4.1.- Oncogens implicats de la via de la MAPK	47
4.1.1.- <i>BRAF</i>	48
4.1.2.- <i>NRAS</i>	48
4.1.3.- <i>KIT</i>	49
4.1.4.- <i>GNAQ</i>	49
4.2.- Altres vies moleculars. Gens supressors	49
4.3.- Alteracions citogenètiques	51
4.3.1.- Alteracions citogenètiques en els nevus melanocítics	51
4.3.2.- Alteracions citogenètiques en els diferents subtipus de melanomes	51
4.4.- Nova classificació molecular del melanoma. Implicacions terapèutiques	52
4.5.- Tècniques moleculars adjuvants al diagnòstic histopatològic del melanoma	55
4.5.1.- Immunohistoquímica	56
4.5.1.1.- Marcadors de diferenciació melanocítica	57
4.5.1.2.- Proteïnes del cicle cel.lular	58
4.5.1.3.- Reguladors de la apoptosi	59
4.5.2.- LOH	60
4.5.3.- MLPA	60
4.5.4.- CGH	61
4.5.5.- FISH	61
4.5.5.1.- Elaboració de sondes FISH amb BACs	62
4.5.5.2.- Sonda multicolor <i>RREB1, MYB, CCND1</i>	63
4.5.5.3.- <i>CDKN2A</i>	65
4.5.5.4.- <i>MYC</i>	66
4.6.- Marcadors moleculars de pronòstic	67
<b>II. Hipòtesi i objectius</b>	<b>71</b>

<b>III. Primer treball</b>	<b>75</b>
<b>IV. Segon treball</b>	<b>89</b>
<b>V. Tercer treball</b>	<b>103</b>
<b>VI. Discussió</b>	<b>111</b>
<b>VII. Conclusions</b>	<b>119</b>
<b>VIII. Bibliografia</b>	<b>123</b>





## **Llista d'abreviacions utilitzades**

aCGH *array comparative genomic hybridization*

ADN àcid desoxirribonucleic

AJCC *American Joint Committee on Cancer*

AKT3 *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3*

AURKA *aurora kinase A*

BACs *bacterial artificial chromosomes*

BAP1 *BRCA1 associated protein-1*

BRAF *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

CCND1 *cyclin D1*

CDKs *cyclin dependent kinases*

CDK4 *cyclin-dependent kinase 4*

CDKN2A *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

CGH *comparative genomic hybridization*

EGFR *epidermal growth factor receptor*

FISH *fluorescent in situ hybridization*

GNAQ *guanine nucleotide binding protein (G protein), q polypeptide*

GNA11 *guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 11 (Gq class)*

HE *hematoxilina-eosina*

HRAS *Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*

HSR *homogeneous staining regions*

KIT *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*

KRAS *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

LOH *loss of heterozygosity*

MAPK *mitogen-activated protein kinase*

MELTUMP *Melanocytic Tumors of Uncertain Malignant Potential*

MITF *microphthalmia-associated transcription factor*

MLPA *Multiplex ligation-dependent probe amplification*

MYB *v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog*

MYC *v-myc avian myelotomatosis viral oncogene homolog*

NRAS *neuroblastoma RAS viral [v-ras] oncogene homolog*

OMS Organització Mundial de la Salut

PCR *polymerase chain reaction*

PI3K *phosphatidylinositol 3-kinase*

PTEN *phosphatase and tensin homolog*

RREB1 *ras responsive element binding protein 1*

RUV radiació ultraviolada

SEER *Surveillance, Epidemiology, and End Results*

TERT *telomerase reverse transcriptase*

TILs *tumor infiltrating lymphocytes*

TNM *T: primary tumor; N: regional lymph nodes; M: distant metastatic sites*

TOP1 *topoisomerase (DNA) I*

TP53 *tumor protein p53*

TSA tumor de spitz atípic

UICC *Union Internationale Contre le Cancer*

# I. Introducció



# Introducció

## 1.- Generalitats del melanoma cutani

### 1.1.- Definició

El melanoma cutani és una neoplàsia maligna derivada dels melanòcits, cèl·lules dendrítiques d'origen neuroectodèrmic que en condicions normals es troben entre els queratinòcits de la capa basal de l'epidermis i el fol·licle pil·lós (Figura 1). La seva principal funció és produir melanina i distribuïr-la entre els queratinòcits adjacents. La melanina és un pigment que protegeix la pell dels efectes carcinogènics de la radiació ultraviolada (RUV). Els melanòcits, però, també poden trobar-se presents en altres localitzacions com ara l'ull (úvea), l'oïda interna, el sistema nerviós central (leptomeninges), el cor i el múscul.

D'altra banda també existeixen proliferacions benignes de melanòcits com són les hiperplàsies melanocítiques i els nevus. Els melanòcits que consitueixen un nevus també poden anomenar-se nevòcits.

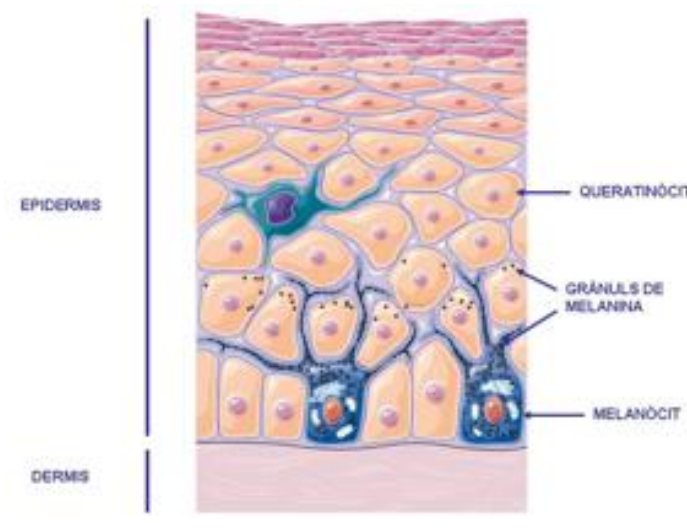


Figura 1.

Imatge esquemàtica de l'estructura de la pell a nivell histològic.

# **Introducció**

## 1.2.- Factors etiològics

El melanoma cutani és una malaltia multifactorial, en la que intervenen tant factors endògens com exògens. Actualment els principals factors de risc considerats per al melanoma cutani són la RUV, el fenotip cutani (incloent la presència de nevus múltiples) i els factors genètics.

### 1.2.1.- RUV

Les RUV tenen diferents efectes sobre la pell, incloent canvis genètics, inducció d'espècies reactives d'oxigen, alteracions en les funcions immunològiques de la pell i producció de factors de creixement.<sup>1</sup> Treballs més recents amb models animals han mostrat que la RUV indueix respostes inflamatòries que promouen la supervivència dels melanòcits i faciliten l'evasió immunològica i la invasió perivascular.<sup>2,3</sup> Diferents estudis epidemiològics han implicat una intensa exposició intermitent a les RUV així com les cremades solars durant la infància amb un major risc de melanoma.<sup>4</sup> El risc de patir melanoma també es veu incrementat per l'exposició a les RUV dels llits de bronzejat, especialment si el seu ús ha estat abans dels 35 anys.<sup>5,6</sup>

### 1.2.2.- Fenotip cutani

Parlem de fototipus quan ens referim a la capacitat, determinada genèticament, que té un individu per assimilar les RUV. La classificació més utilitzada i acceptada actualment és la de Fitzpatrick, que reconeix fins a 6 fototipus diferents.<sup>7</sup> Aquells individus de pell clara amb marcada tendència a cremar-se amb el sol (fototipus I i II) presenten un major risc de desenvolupar un melanoma ja que tenen un risc relatiu de 2.99 respecte als fototipus alts.<sup>8</sup>

Els individus de cabells rossos o pèl-rojos presenten també un major risc relatiu (1.96 i 3.64, respectivament) de patir melanoma respecte aquells de cabell castany o negre. Ocorre el mateix en els individus d'ulls clars, que mostren un risc relatiu de 1.54 respecte als individus d'ulls foscos.<sup>8</sup>

Existeix una forta correlació entre el número de nevus (més de 25) i el risc de melanoma.<sup>9</sup> Més concretament, aquesta associació és més forta per als

## ***Introducció***

melanomes desenvolupats en tronc i extremitats inferiors en comparació amb altres localitzacions.<sup>10</sup> Els pacients amb nevus atípics també presenten un major risc de melanoma en comparació amb la població general.<sup>9</sup> Les guies més actuals suggereixen que aquells pacients amb més de 100 nevus o amb més de 5 nevus atípics són els que presenten un major risc de melanoma.<sup>11</sup>

### 1.2.3.- Predisposició genètica

S'estima que entre el 5 i el 10% dels melanomes són familiars<sup>12,13</sup> amb una gran heterogeneïtat genètica entre famílies, fet que suggereix que hi ha múltiples gens involucrats. Els principals gens implicats en la susceptibilitat a melanoma són *CDKN2A* i *CDK4*, dos gens amb alta penetrància, i als que recentment s'ha afegit *BAP1*.<sup>14-16</sup> *CDKN2A* és un gen supressor tumoral que codifica per a dues proteïnes diferents: p16INK4a (que regula la sortida de la fase G1 inhibint la fosforilació de la proteïna del retinoblastoma a través de *CDK4*)<sup>17</sup> i p14ARF (que actua a través de P53 per a induir o bé l'arrest del cicle cel·lular o bé l'apoptosi).<sup>18,19</sup> *CDK4* és un oncogen que codifica per a una de les proteïnes que s'uneix a p16INK4a.<sup>16</sup> Fins al moment, el número de famílies de melanoma amb mutacions de *CDK4* és reduït en comparació amb la freqüència de mutacions de *CDKN2A*.<sup>20,21</sup>

### 1.3.- Epidemiologia

El melanoma és la primera causa de mort per càncer cutani, tot i no ser el tipus més freqüent de càncer de pell. Tant als Estats Units com a Europa presenta una incidència creixent (Figura 2), amb un increment anual variable entre poblacions però que s'estima d'entre el 3% i el 7%, essent superior en individus de més de 65 anys.<sup>22,23</sup> Aquest augment s'atribueix no només a una major exposició a les RUV sinó també a una detecció cada cop més precoç de les lesions així com també a canvis en la interpretació histològica de les lesions incipients.<sup>24</sup> D'altra banda, les taxes de mortalitat per melanoma han seguit també una tendència a l'alça en els últims anys, sobretot en individus de més de 65 anys.<sup>23</sup>



# Introducció

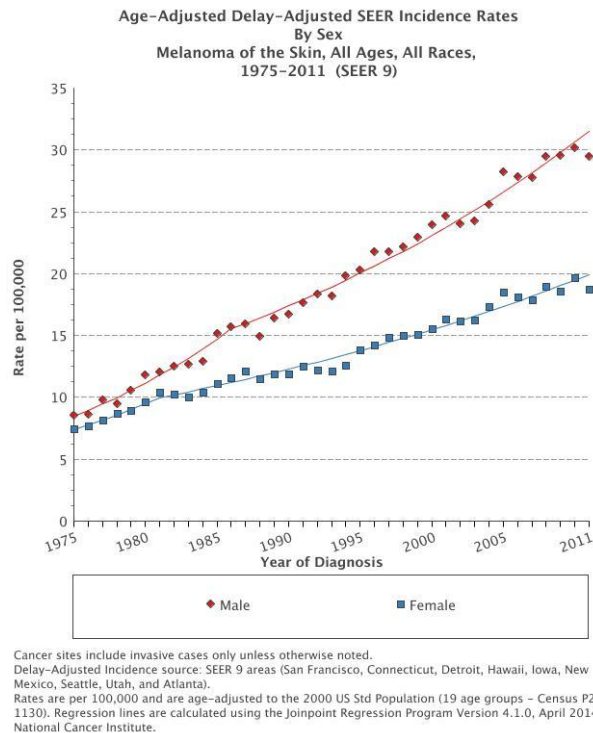


Figura 2. Corba d'evolució de la incidència (nous casos/100.000 habitants) de melanoma des de 1975 a 2011, segons la SEER (*Surveillance, Epidemiology, and End Results*) National Cancer Statistics dels EUA.

## 1.4.- Diagnòstic

### 1.4.1.- Aspectes clínics

La majoria de melanomes cutanis primaris (més del 80%) s'originen *de novo*, és a dir, sense cap relació amb una lesió melanocítica preexistent. Reconèixer clínicament un melanoma pot ser un desafiament inclús per a dermatòlegs experts. Hi ha una sèrie de característiques clíniques suggestives de malignitat com són l'assimetria, unes vores irregulars, una coloració bigarrada, una mida gran i l'aparició de canvis en lesions preexistents, que es corresponen amb la norma clàssica de l'ABCDE del melanoma, acrònim de l'anglès **A**ssimetry; **B**order irregularities; **C**olor variegation; **D**iameter  $\geq 6$  mm

## Introducció

and *Evolving* (Figura 3). Cal remarcar però que aquests trets també poden observar-se en lesions benignes i que, per tant, no són en cap cas criteris absoluts de malignitat.<sup>25,26</sup>

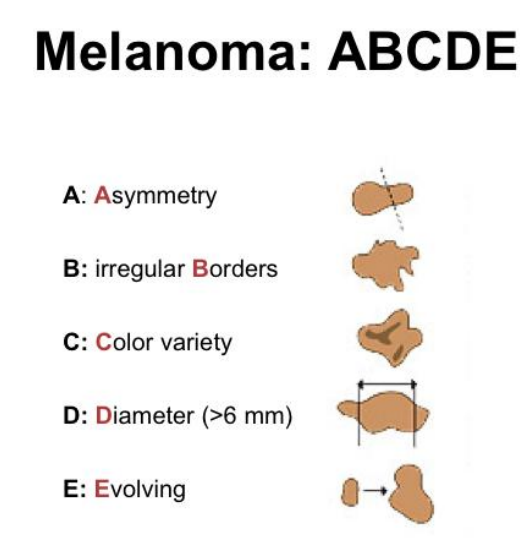


Figura 3. Esquema representatiu de la norma de l'ABCDE per al diagnòstic de melanoma.

Actualment els dermatòlegs també disposen de tècniques complementàries no invasives que assisteixen en el diagnòstic de les lesions melanocítiques, com són la dermatoscòpia, la fotografia digital o la microscopia confocal. La dermatoscòpia, o microscopia d'epiluminiscència, és una tècnica que permet l'observació d'estructures submacroscòpiques i per tant la detecció d'algunes de les característiques de l'ABCDE quan inclús les lesions són de tamany molt reduït, amb una correlació histològica directa i permetent incrementar significativament la detecció del melanoma en etapes molt inicials.<sup>27</sup> La fotografia digital corporal total és especialment útil en el monitoratge dels individus amb múltiples nevus atípics, ja que canvis subtils de lesions preexistents poden ser molt més ben documentats.<sup>28</sup> La microscopia confocal de reflectància és una tècnica d'imatge que permet la visualització *in vivo* d'estructures microanatòmiques de l'epidermis i la dermis superficial.<sup>29</sup>

Sempre que existeixi una sospita de malignitat cal procedir a una biòpsia excisional de la lesió, preferentment completa i amb marges amplis, per tal d'establir el diagnòstic histopatològic ja que aquest es considera actualment el

## **Introducció**

*gold standard* per al diagnòstic de melanoma i per al seu diagnòstic diferencial.<sup>26</sup>

La majoria de melanomes sorgeixen com a tumors superficials confinats a l'epidermis, on poden romandre fins a anys. Durant aquest estadi, conegut com a fase de creixement radial o horitzontal, els melanomes solen ser curables amb tant sols l'extirpació quirúrgica. En algun moment, es postula que com a conseqüència de l'acumulació d'alteracions genètiques, passen a infiltrar la dermis o més enllà (fase de creixement vertical) i presenten ja potencial metastàtic.

### 1.4.2.- Aspectes anatomo-patològics

Com ja s'ha apuntat, l'estudi histopatològic és actualment el pilar del diagnòstic del melanoma i de les neoplàsies melanocítiques en general, considerant-se doncs el *gold standard*. Alhora, l'estudi histopatològic dels melanomes aporta informació pronòstica. El principal problema, però, és que el diagnòstic diferencial histopatològic del melanoma no es basa en un sol o pocs criteris objectius i fàcilment reproduïbles, sinó que sol ser el resultat de la conjunció d'una sèrie de característiques morfològiques de significat i pes variables segons cada cas particular (Taula 1) i a les que sempre cal afegir la informació clínica.

Existeixen varis estudis en què es demostra una gran variabilitat interobservador en el diagnòstic diferencial entre melanoma i nevus, inclús entre dermatopatòlegs experts, amb una discordança que varia entre el 15% i el 25%. Alguns d'aquests estudis mesuren el grau d'acord entre diferents patòlegs mitjançant el valor estadístic de  $\kappa$  (que mesura de forma quantitativa el grau de fiabilitat d'un sistema de classificació), obtenint-se valors inferiors a 0.40, punt de tall per sota del qual es considera que existeix un acord pobre entre observadors.<sup>30-33</sup> Tots aquests fets constitueixen una de les raons principals per la qual aquest tipus de lesions conformen una de les àrees de patologia quirúrgica en què s'emprenen més accions mèdico-legals. Conseqüentment, això afavoreix el diagnòstic de melanoma per part de

## Introducció

l'especialista d'anatomia patològica.<sup>34-36</sup> No cal dir que una classificació correcta de les lesions melanocítiques és crucial, ja que un diagnòstic erroni pot comportar un tractament insuficient d'una neoplàsia potencialment mortal o, pel contrari, un sobretractament amb l'augment de la morbiditat que això comporta (cirurgia més agressiva, buidaments ganglionars, tractaments tòxics i estrés emocional) i també un augment no despreciable dels costos sanitaris.

1. Assimetria
2. Poca delimitació lateral
3. Predominància de melanòcits aïllats sobre els nius
4. Extensió pagetoide
5. Nius melanocítics poc cohesius
6. Nius irregulars en quant a tamany, forma i distribució
7. Absència de maduració en profunditat
8. Regressió
9. Infiltrat inflamatori amb nius irregulars, de distribució heterogènia
10. Atípia citològica
11. Necrosi monocel·lular
12. Mitosis profundes

Taula 1. Criteris morfològics utilitzats en el diagnòstic histològic del melanoma. Adaptada de Ferrara G *et al.*<sup>37</sup>

La majoria de melanomes poden ser diferenciats dels nevus utilitzant els criteris anteriorment mencionats (assimetria, falta de demarcació lateral, extensió pagetoide intraepidèrmica, presència d'atípia citològica, absència de maduració o presència de mitosis en el component dèrmic, etc). Però de la mateixa manera que passa amb el diagnòstic clínic, un sol criteri histològic no és diagnòstic de melanoma de *per se*, ja que aquestes característiques poden trobar-se individualment en els nevus. És per aquesta raó que l'aproximació dicotòmica tradicional (benigne versus maligne) de les neoplàsies

## **Introducció**

melanocítiques és cada vegada menys popular. Està acceptat que existeix una “zona gris” en què s’englobarien diferents tipus de lesions, principalment aquell espectre de lesions relativament gruixudes, de predomini dèrmic i que sovint són difícils o impossibles de diferenciar del melanoma. Aquest grup inclou neoplàsies melanocítiques de cel·lularitat fusiforme i/o epitelioides com els tumors de spitz atípics (TSA), els nevus blaus cel·lulars i/o epitelioides i els nevus de penetració profunda.<sup>38-40</sup> De fet s’ha proposat el terme “tumors melanocítics de potencial maligne incert” (en anglès MELTUMP, acrònim de l’anglès *Melanocytic Tumors of Uncertain Malignant Potential*) per a aquestes lesions, per tal de reflectir la incertesa de la seva classificació i comportament biològic.<sup>40,41</sup> En tots aquests casos, la utilització de tècniques complementàries podria millorar la sensibilitat diagnòstica i una correcta classificació de les lesions.

Els TSA comprenen un grup ampli de lesions melanocítiques de potencial maligne incert. Són lesions que exhibeixen alhora característiques morfològiques dels nevus de Spitz i dels melanomes spitzoides.<sup>42-44</sup> S’ha intentat caracteritzar-los morfològicament, proposant els següents trets: mida gran (>10 mm de diàmetre), assimetria, mala delimitació, ulceració, afectació del teixit cel·lular subcutani, atípia important, creixement difús amb alta densitat cel·lular, absència de maduració i presència de mitosis dèrmiques profundes (Figura 4). Aquestes característiques, però, són compartides pels melanomes i, per tant, poc útils a l’hora de classificar aquestes lesions.<sup>38</sup> Entre un 30% i un 50% dels pacients amb TSA presenten metàstasis ganglionars en el moment del diagnòstic<sup>45-48</sup> però el seu significat biològic continua essent incert, si bé molts d’ells presenten un pronòstic favorable.<sup>44</sup> Actualment no és possible discernir si es tracten de lesions indolents o bé melanomes de baix grau.

## Introducció

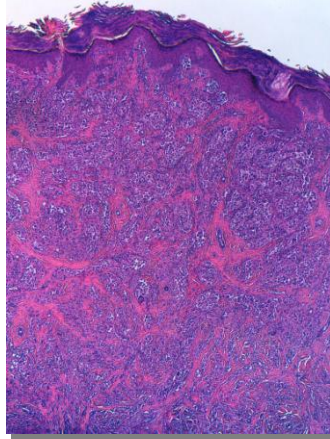


Figura 4. Imatge histològica d'un TSA (Hematoxilina-eosina, HE, 4X).

### 1.5.- Classificació actual

Segons l'actual classificació de la Organització Mundial de la Salut (OMS) es reconeixen quatre subtipus principals de melanoma cutani si bé n'existeixen algunes variants addicionals que són menys freqüents i que constitueixen menys del 5% dels casos (Taula 2).<sup>49</sup>

Melanoma d'extensió superficial
Melanoma nodular
Melanoma tipus lentígen maligne
Melanoma lentiginós acral
Melanoma desmoplàstic
Melanoma originat sobre nevus blau
Melanoma originat sobre nevus congènit gegant
Melanoma de la infància
Melanoma nevoide
Melanoma persistent

Taula 2. Classificació histològica de melanoma cutani segons la OMS

Adaptada de LeBoit *et al.*<sup>49</sup>

## **Introducció**

Es tracta d'una classificació clinicopatològica, és a dir, basada en la localització anatòmica i/o el grau de dany actínic i en les característiques morfològiques, però amb molt poc impacte en el maneig clínic dels pacients, sobretot pel què fa a predicció de pronòstic o elecció de possibles tractaments. De fet, no s'han pogut demostrar diferències significatives en quant a supervivència global o resposta a tractaments entre les diferents categories, corregides pel gruix del tumor.<sup>50,51</sup> No obstant, aquesta subclassificació continua sent útil en el reconeixement i diagnòstic de les entitats així com també amb fins didàctics.

### 1.5.1.- Melanoma d'extensió superficial

El melanoma d'extensió superficial és el subtipus més freqüent en la raça caucàsica i representa aproximadament el 70% del total dels melanomes. La majoria apareixen *de novo* si bé fins a un 25% poden trobar-se en associació amb un nevus preexistent, ja sigui un nevus displàstic o un nevus congènit. Típicament apareixen en zones de la pell amb exposició solar intermitent (tronc i extremitats proximals), amb una incidència que mostra un pic al voltant dels 50 anys i una posterior tendència decreixent. Es caracteritzen per presentar una fase de creixement radial intermitja i quan es diagnostiquen solen ser ja almenys mínimament invasors. Des del punt de vista histològic solen ser proliferacions asimètriques i mal delimitades de melanòcits atípics que es disposen en nius i de forma aïllada dins de l'epidermis, amb creixement pagetoide. Els nius són irregulars i tenen tendència a la confluència. El component infiltrant sol estar compost de nius o masses sòlides que infiltrin difusament la dermis. Els melanòcits neoplàstics solen ser epitelioides però també poden ser fusiformes, pleomòrfics, etc (Figura 5).

## Introducció

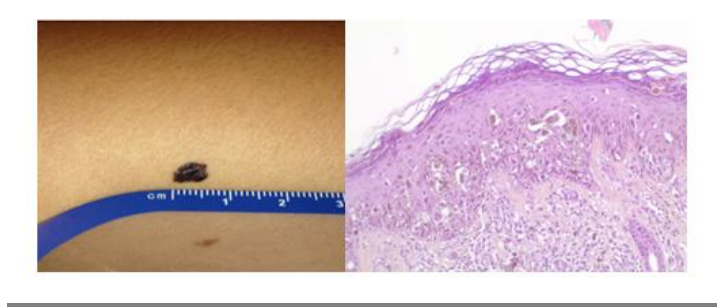


Figura 5. Imatge clínica (dreta) i histològica (esquerra) d'un melanoma d'extensió superficial.

### 1.5.2.- Melanoma nodular

El segon tipus per ordre de freqüència és el melanoma nodular, que representa entre un 10% i un 15% dels casos segons les sèries. Pot aparèixer en qualsevol localització (tot i que és més habitual en el tronc) i generalment es presenta com una lesió polipoide o pedunculada, freqüentment ulcerada i de creixement ràpid. De forma peculiar, els melanomes nodulars apareixen *de novo* sobre una pell normal sense fase de creixement radial preexistent i inicialment ja es presenten en la fase de creixement vertical. Histològicament, doncs, el melanoma nodular es presenta com una proliferació de melanòcits atípics, invasiva i amb escàs component epidèrmic. De fet, per definició, si el component epidèrmic existeix aquest no pot estendre's més de tres crestes interpapil·lars més enllà del component dèrmic (Figura 6).

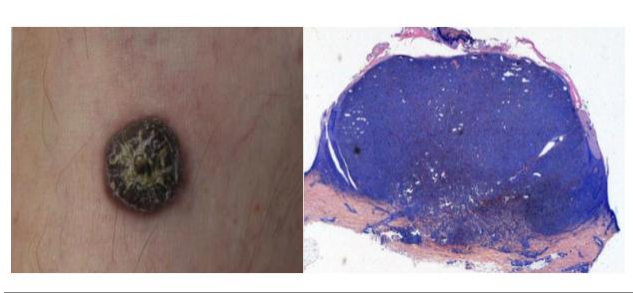


Figura 6. Imatge clínica (dreta) i histològica (esquerra) d'un melanoma nodular.



## **Introducció**

### 1.5.3.- Melanoma tipus lentígen maligne

El melanoma tipus lentígen maligne representa entre un 4% i 10% del total i característicament apareix en zones de pell amb exposició solar crònica (cap i coll i extremitats distals) en individus d'edat avançada (es calcula que comença a aparèixer al voltant dels 50 anys, amb una posterior incidència progressivament creixent). El seu creixement és lent i insidiós, amb una fase de creixement radial que pot durar més de 10 anys. Histològicament són lesions que apareixen en pells amb dany actínic evident (elastosi solar, atròfia epidèrmica) i que es caracteritzen per una fase radial en la que s'observa una proliferació lentiginosa de melanòcits atípics en la unió dermo-epidèrmica, amb extensió freqüent als acrosiringis i als fol·licles pilosos. A mesura que la lesió evoluciona els melanòcits tenen tendència a formar nius poc cohesius que més tard acabaran invaint la dermis, moltes vegades adoptant una morfologia fusiforme (Figura 7).

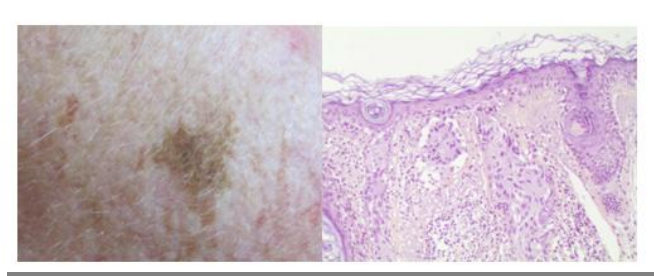


Figura 7. Imatge clínica (dreta) i histològica (esquerra) d'un melanoma tipus lentígen maligne.

### 1.5.4.- Melanoma lentiginós acral

El quart subtipus, que representa menys del 5% del total dels melanomes, és el melanoma lentiginós acral (MLA). Donat que la seva prevalença és la mateixa en totes les races (a diferència dels altres subtipus), és el melanoma més freqüent en els individus de raça negra o asiàtica. Sol aparèixer en palmells, plantes i regió subungueal (localitzacions amb poca exposició solar i protegides de les RUVs per una capa còrnia gruixuda). Histològicament presenten també unes característiques distintives: proliferació

## Introducció

a la unió dermo-epidèrmica de melanòcits atípics adoptant un patró marcadament lentiginós, amb focus de creixement melanocític confluent associats i marcada tendència al creixement pagetoide. Els melanòcits solen presentar uns processos dendrífics allargats. L'epidermis sol mostrar canvis d'acantosi amb crestes interpapil·lars allargades (Figura 8).

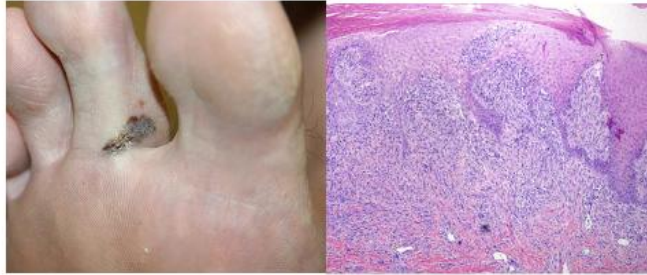


Figura 8. Imatge clínica (dreta) i histològica (esquerra) d'un melanoma lentiginós acral.

### 1.6.- Estadiatge i pronòstic

#### 1.6.1.- Sistema TNM

Com en moltes altres neoplàsies, el principal factor pronòstic del melanoma cutani en el moment del diagnòstic és el seu estadi clínic. Actualment s'utilitza la setena versió del sistema d'estadiatge TNM (acrònim de l'anglès *T: primary tumor*, *N: regional lymph nodes* i *M: distant metastatic sites*), fruit de la unificació dels criteris de la AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) i de la UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*)<sup>52</sup>. Les categories TNM definides per aquesta última edició així com l'agrupació per estadis estan expressats a les Taules 3 i 4, respectivament.

Destaca la importància de criteris histopatològics en la determinació del pronòstic dels pacients, sobretot en estadis localitzats (I i II). En aquests casos, el gruix del tumor (índex de Breslow), la presència o absència d'ulceració epidèrmica i l'índex mitòtic són potents predictors de supervivència i per aquesta raó són ítems imprescindibles en l'elaboració de l'informe anatómo-patològic.

## Introducció

<b>T</b>	<b>Gruix (mm)</b>	<b>Ulceració/Mitosis</b>
<b>is</b>	No aplicable	No aplicable
<b>1</b>	≤ 1.00	a: sense ulceració i mitosis < 1/mm <sup>2</sup> b: amb ulceració o mitosis ≥ 1/mm <sup>2</sup>
<b>2</b>	1.01-2.00	a: sense ulceració b: amb ulceració
<b>3</b>	2.01-4.00	a: sense ulceració b: amb ulceració
<b>4</b>	> 4	a: sense ulceració b: amb ulceració
<b>N</b>	<b>Número de ganglis metastàtics</b>	
<b>0</b>	0	NA
<b>1</b>	1	a: micrometàstasis b: macrometàstasis
<b>2</b>	2-3	a: micrometàstasis b: macrometàstasis c: metàstasis en trànsit/satel·litosi sense ganglis metastàtics
<b>3</b>	4+ ganglis metastàtics o massa adenopàtica /satel·litosi amb ganglis metastàtics	
<b>M</b>	<b>Localització</b>	<b>Lactat deshidrogenasa (LDH) sèrica</b>
<b>0</b>	Sense metàstasis a distància	No aplicable
<b>1a</b>	Cutànies, subcutànies o nodals	Normal
<b>1b</b>	Pulmonars	Normal
<b>1c</b>	Qualsevol altra visceral	Normal
	Qualsevol metàstasi distant	Elevada

Taula 3. Sistema internacional d'estadificació TNM per a melanoma cutani.

7a edició. Adaptada de Balch *et al.*<sup>52</sup>

## Introducció

Estadi	TNM		
<b>Estadi 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Estadi IA</b>	T1a	N0	M0
<b>Estadi IB</b>	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
<b>Estadi IIA</b>	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
<b>Estadi IIB</b>	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
<b>Estadi IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>Estadi IIIA</b>	T1a-4a	N1a, 2a	M0
<b>Estadi IIIB</b>	T1a-4a	N1b, 2b, 2c	M0
	T1b-4b	N1a, 2a, 2c	M0
<b>Estadi IIIC</b>	T1b-4b	N1b, 2b	M0
	Qualsevol T	N3	M0
<b>Estadi IV</b>	Qualsevol T	Qualsevol N	M1

Taula 4. Agrupació per estadis.

Adaptada de *TNM Classification of Malignant Tumours (UICC)*.<sup>52</sup>

### 1.6.1.1.- Índex de Breslow

L'índex de Breslow representa el gruix del melanoma primari, s'expressa en mil·límetres (mm) i és la distància entre la capa més superficial de l'estrat granulós de l'epidermis i el punt de màxima infiltració del tumor (en cas d'ulceració epidèrmica es pren com a punt de referència la base de l'úlcer) (Figura 9). És ben conegut que un increment en el gruix del melanoma es correlaciona significativament amb un pitjor pronòstic. Així, la supervivència als 10 anys passa de ser del 92% en aquells pacients amb lesions primes (amb un índex de Breslow per sota d'1 mm) a un 50% en els pacients amb lesions gruxides (índex de Breslow major de 4 mm).<sup>52</sup>

## Introducció

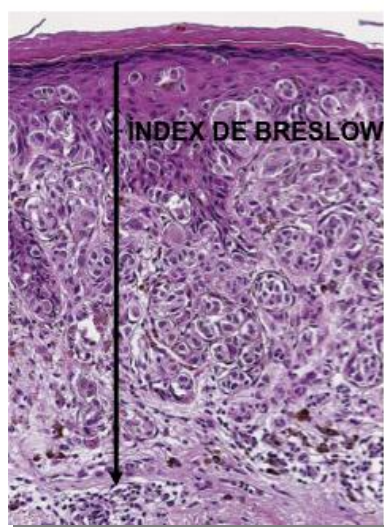


Figura 9. Exemple de la mesura de l'índex de Breslow en un melanoma infiltrant.

### 1.6.1.2.- Ulceració

La ulceració es defineix histològicament com a l'absència d'un epiteli intacte per sobre del melanoma. Està ben demostrat que les taxes de supervivència en pacients amb un melanoma ulcerat són significativament inferiors a les dels pacients amb un melanoma no ulcerat de la mateixa categoria T (és a dir, amb un índex de Breslow similar) i, a la vegada, similars a les d'aquells pacients amb un melanoma no ulcerat però amb una categoria T superior.(52)

### 1.6.1.3.- Índex mitòtic

Mentre que l'índex de Breslow i la presència d'ulceració ja estaven inclosos en el sistema d'estadiatge anterior, l'índex mitòtic s'ha incorporat en l'última edició donat que es va demostrar el seu poder predictor de pronòstic en melanomes localitzats (categoria T1), tenint en compte com a punt de tall el valor de 1 mitosi per  $\text{mm}^2$ .<sup>52,53</sup> A més, l'índex mitòtic ha substituït el nivell de Clark en la subclassificació d'aquesta categoria. L'índex mitòtic s'ha de valorar en qualsevol melanoma primari, identificant primer aquella àrea de melanoma infiltrant amb més mitosis (*hot spot*) i, a

## **Introducció**

partir d'allà, anar comptabilitzant el número de mitosis en camps adjacents fins a cobrir una àrea d'un total d'1 mm<sup>2</sup>.

### 1.6.2.- Altres criteris clinicopatològics amb probable implicació pronòstica:

Addicionalment existeixen altres paràmetres clinicopatològics que podrien predir l'evolució dels pacients, tot i que no estan inclosos en el sistema d'estadiatge i que han estat repetidament estudiats mostrant en ocasions resultats contradictoris. Tot seguit es comentaran breument els més importants:

- Criteris clínics:
  - Edat: s'ha descrit l'edat com un factor pronòstic independent, inclús quan es corregeix per altres variables com el gruix del tumor, les mitosis o la ulceració <sup>53</sup>, si bé no es pot descartar una confusió amb altres causes de mortalitat.
  - Sexe: s'ha vist que les dones presenten un millor pronòstic que els homes en el cas de melanomes localitzats, inclús corregint-se per altres factors pronòstics coneguts <sup>53,54</sup> mentre que en el cas de melanomes en estadis avançats (III i IV) el paper del sexe del pacient en el pronòstic no queda tant clar. <sup>55,56</sup>
  - Localització anatòmica: s'ha descrit un pitjor pronòstic en aquells melanomes localitzats a l'àrea de cap i coll, en tronc i en extremitats inferiors. <sup>53,55,57</sup>
- Criteris anatomo-patològics:
  - Nivell de Clark: el nivells d'invasió del melanoma proposats per Clark (Figura 10) són I (melanoma *in situ*), II (invasió de la dermis papil·lar superficial), III (invasió de la dermis papil·lar superficial, amb expansió de la mateixa), IV (invasió de la dermis reticular) i V (invasió del teixit cel·lular subcutani). S'han

## Introducció

eliminat de l'última edició del sistema d'estadiatge de l'AJCC ja que, si bé existeix una bona correlació amb el pronòstic en l'anàlisi univariant, aquesta es perd en l'anàlisi multivariant quan s'introdueix l'índex mitòtic.<sup>52</sup>

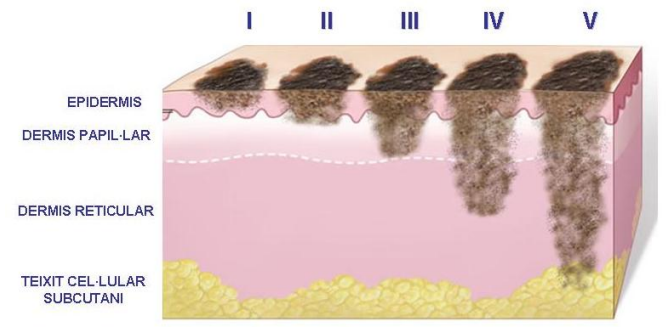


Figura 10. Nivells de Clark.

➤ Fase de creixement: es reconeixen dos patrons de creixement en els melanomes: radial i vertical. Aquests es correlacionen bé amb el nivell d'invasió ja que si bé tots els melanomes *in situ* (Clark I) són melanomes no invasius en fase de creixement radial, els melanomes invasius (Clark III a V) es troben en la fase de creixement vertical. L'excepció es dona en aquells melanomes primis amb un nivell de Clark II, en què pot veure's qualsevol dels dos patrons. En aquests casos, la presència d'una fase de creixement vertical comporta un pitjor pronòstic.<sup>58</sup>

➤ Regressió: la regressió es defineix com la presència a dermis de fibrosi, proliferació vascular, infiltrat inflamatori i melanòfags, en associació amb una destrucció parcial o completa de les cèl·lules tumorals. La seva relació amb la supervivència és polèmica. Mentre que la gran majoria d'estudis no han trobat cap relació amb el pronòstic, alguns han mostrat que els melanomes primis amb regressió tenen un major potencial metastàtic.<sup>59-61</sup>

## Introducció

➤ Invasió vascular àngio-limfàtica: molts autors han associat la presència de cèl·lules tumorals dins els espais limfovasculars (Figura 11) amb un major risc de recidiva i de metàstasis ganglionars i a distància, afectant doncs significativament tant la supervivència lliure de malaltia com la supervivència global dels pacients.<sup>62-64</sup> No obstant d'altres han mostrat que no és un factor pronòstic independent.<sup>65</sup> La discrepància entre aquests estudis pot atribuir-se a la dificultat i a la variabilitat interobservador a l'hora d'identificar la invasió vascular en les seccions d'HE.

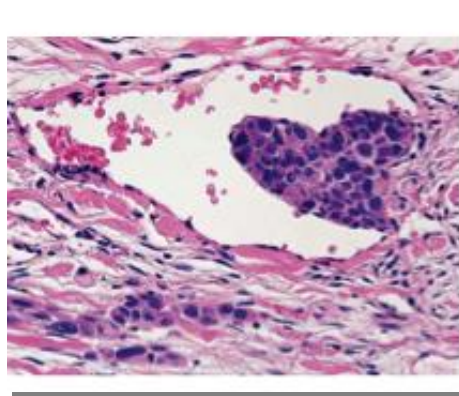


Figura 11. Invasió neoplàsica per melanoma d'un espai limfovascular (HE, 40X).

➤ Invasió perineural: la infiltració dels nervis per cèl·lules tumorals, molt més freqüent en melanomes desmoplàstics o fusocel·lulars, s'ha relacionat amb un increment en les recidives tumorals i, per tant, amb un descens en la supervivència lliure la malaltia.<sup>66</sup>

➤ Limfòcits infiltrants del tumor (TILs, de l'anglès *Tumor infiltrating lymphocytes*): es consideren una resposta immunològica de l'hoste enfront del tumor i es classifiquen en absents (o mínims), presents i inactius o presents i actius (Figura 12). La presència de TILS s'ha relacionat amb una millor



## Introducció

supervivència, si bé l'avaluació d'aquest criteri està molt subjecte a l'observador.<sup>67,68</sup>

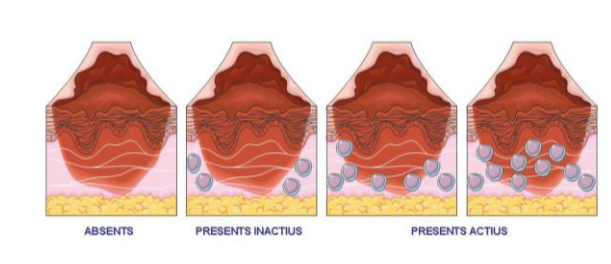


Figura 12. Representació esquemàtica de la classificació dels TILs.

➤ **Satel·litosi microscòpica:** es defineix com la presència d'agregats de cèl·lules tumorals de més de 0.05 mm de diàmetre, situats a dermis o teixit cel·lular subcutani i separats del tumor primari, com a màxim 2 centímetres.<sup>52</sup> La presència de satel·litosi microscòpica s'ha relacionat amb un major risc de metàstasis ganglionars així com amb una disminució de la supervivència lliure de malaltia i de la supervivència global.<sup>52,69</sup>

### **2.- Particularitats de les neoplàsies melanocítiques fusocel·lulars**

Les lesions melanocítiques es caracteritzen per una gran diversitat morfològica tant des del punt de vista arquitectural com citològic.<sup>70</sup> Mentre que els melanòcits funcionals mostren una aparença dendrítica, els melanòcits lesionals poden adoptar una morfologia epiteliode o, amb menys freqüència, fusiforme o mixta. Una morfologia fusiforme no implica doncs, en sí, un potencial biològic més agressiu i cal interpretar-se en el context clinicopatològic de cada cas.<sup>71</sup>

Les lesions melanocítiques amb cel·lularitat fusiforme abarquen un espectre d'entitats que van des de benignes a malignes i en ocasions poden plantejar clares dificultats en el seu diagnòstic diferencial. Així doncs, d'una banda, existeixen una sèrie de lesions melanocítiques benignes que poden mostrar una cel·lularitat fusiforme, com ara els nevus neuroides, alguns nevus congènits, nevus situats en localitzacions denominades "especials" (localitzacions acral, vulvar, regió mamària, regions flexurals, orella i cuir cabellut), nevus de Spitz o spitzoides i també el nevus fusocel·lular pigmentat. A l'altre extrem de l'espectre existeixen totes aquelles lesions melanocítiques malignes que poden presentar una citomorfologia fusiforme, i que s'engloben sota el terme genèric de "melanoma fusocel·lular".<sup>71</sup>

#### **2.1. - Nevus melanocític fusocel·lular pigmentat**

El nevus melanocític fusocel·lular pigmentat (o nevus de Reed) va ser descrit per primera vegada l'any 1975 per Reed *et al* com un nevus melanocític adquirit benigne distintiu i que històricament s'ha considerat com una variant del nevus de Spitz.<sup>72,73</sup> La majoria de casos presenten les característiques clíniques i histològiques típiques que permeten el seu diagnòstic però en algunes ocasions poden imitar al melanoma<sup>74</sup>. Des del punt de vista clínic es presenta com una lesió de petita mida que té un patró distintiu a la

## Introducció

dermatoscòpia (“en esclat d’estels”) però no exclusiu dels nevus melanocítics fusocel·lulars pigmentats. A més aquesta lesió sol ser de color negre i típicament creix molt ràpid. Aquestes característiques fan que moltes vegades siguin lesions preocupants per al clínic i se’n procedeixi a l’exèresi diagnòstica. Des del punt de vista histològic es tracta d’una proliferació simètrica de melanòcits fusiformes molt pigmentats i que poden presentar característiques preocupants com ara una activitat proliferativa augmentada amb presència de figures de mitosi, una mala delimitació lateral i extensió tant annexial com pagetoide.<sup>75-77</sup> A més solen acompanyar-se d’un infiltrat inflamatori moderat amb abundants melanòfags així com abundant eliminació de pigment a través de l’epidermis. És per totes aquestes característiques que moltes vegades són mal diagnosticats com a melanomes fusocel·lulars i sovint són motiu de consulta entre patòlegs (Figura 13).



Figura 13. Imatges clínica (esquerra), dermatoscòpica (centre) i histològica (dreta) d’un nevi fusocel·lular pigmentat.

### 2.2. - Melanoma fusocel·lular

Sota la denominació genèrica de “melanoma fusocel·lular” s’inclouen diferents subtipus histològics de melanomes, essent els més comuns aquells melanomes en què el component *in situ* mostra melanòcits d’aparença dendrítica (és a dir, el melanoma lentiginós acral i el melanoma tipus lentígen maligne) però també el melanoma spitzoide i una petita proporció de melanomes nodulars i d’extensió superficial. Des del punt de vista histològic, el

## ***Introducció***

seu diagnòstic diferencial amb els nevus fusocel·lular pigmentats i altres variants de nevus de Spitz pot ser especialment difícil en algunes ocasions.

Les característiques clinicopatològiques més rellevants dels principals subtipus de melanomes ja s'han descrit anteriorment. Sota el terme de melanoma spitzoide s'inclouen aquells melanomes que mostren algunes (i en ocasions moltes) característiques pròpies dels nevus de Spitz. Clínicament solen ser pàpules o nòduls rosats d'aproximadament 1 centímetre de diàmetre, que de forma ocasional poden presentar una distribució irregular del pigment i que més freqüentment apareixen en extremitats o en l'àrea de cap i coll. La gran majoria es donen en adults si bé també existeixen casos descrits en adolescents i infants prepuberals, casos en que comporten de manera especial un gran repte diagnòstic.<sup>78</sup> A més, des del punt de vista histològic, solen mostrar una notable similitud amb els nevus de Spitz, tant des del punt de vista arquitectural com citològic (Figura 14).



Figura 14 . Imatges clínica (esquerra), dermatoscòpica (centre) i histològica (dreta) d'un melanoma spitzoide.

### **3.- Particularitats de les neoplàsies melanocítiques acrals**

Una de les àrees més desafidores en el camp del diagnòstic histopatològic de les lesions melanocítiques és en el cas d'aquelles lesions de localització acral, és a dir, que apareixen en palmells de les mans, plantes dels peus i en regió subungueal. Es calcula que les lesions pigmentades acrals són relativament freqüents, donant-se en entre un 4% i un 9% dels caucàsics. La gran majoria són nevus i, en menys proporció, melanomes.<sup>79</sup>

#### **3.1. - Nevus melanocític acral**

Els nevus que apareixen en localització acral es consideren dins del grup de nevus que poden mostrar atipia relacionada amb la localització, com passa també amb els nevus de la zona genital o de zones flexurals.<sup>80</sup> Són relativament freqüents, donant-se en entre un 4% i un 9% dels individus caucàsics. Clínicament solen ser lesions petites (de menys de 7 mm de diàmetre) que apareixen en palmells, plantes, superfícies volars dels dits i regió ungueal i que presenten una pigmentació uniforme, amb vores irregulars però ben definides. Generalment són lesions estables i més freqüentment junturals que no pas els nevus d'altres localitzacions. A la dermatoscòpia solen presentar un patró molt típic anomenat "patró paral·lel del solc".

Les característiques histològiques peculiars que poden presentar i que en moltes ocasions poden ser preocupants són bàsicament en el component juntural<sup>81</sup> i són les següents: extensió pagetoide, patró de creixement lentiginós, distribució irregular dels nius, poca delimitació lateral, atipia citològica focal o eliminació de pigment transepidermic. Tot i aquestes característiques no es consideren lesions precursors ni marcadors de risc per al desenvolupament de melanomes acrals (Figura 15).<sup>82</sup>

## Introducció

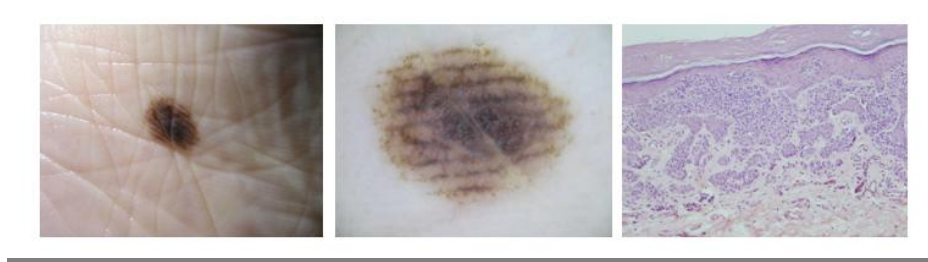


Figura 15. Imatges clínica (esquerra), dermatoscòpica (centre) i histològica (dreta) d'un nevus melanocític acral.

### 3.2. - Melanoma lentiginós acral

És el quart subtipus de melanoma reconegut per la OMS i mostra unes característiques clinicopatològiques distintives, tal i com ja s'ha comentat anteriorment. Apareix sobretot a les plantes dels peus, essent el taló la localització més freqüent però també pot aparèixer a les mans, a la cara volar dels dits i a la regió subungueal. Excepcionalment es dona abans dels 30 anys, essent la mitjana d'edat de presentació entre els 60 i els 70 anys. Les lesions més incipients solen ser màcules pigmentades que creixen superficialment amb el temps, amb unes vores ben definides però molt irregulars. Solen presentar un diàmetre superior a 1 centímetre i superior als 3 centímetres en aquelles lesions que ja presenten un component invasiu. A la dermatoscòpia solen presentar un patró molt típic anomenat "patró paral·lel de la cresta".

Histològicament es caracteritza per mostrar un patró de creixement predominantment lentiginós en la seva fase radial, freqüentment amb canvis d'acantosi i hiperqueratosi de l'epidermis suprajacent. Les lesions acròmiques no són infreqüents. Quan infiltra, moltes vegades els melanòcits adopten una morfologia fusiforme (Figura 16).<sup>49</sup>

## ***Introducció***



Figura 16. Imatges clínica (esquerra), dermatoscòpica (centre) i histològica (dreta) d'un melanoma lentiginós acral.

## 4.- Biologia molecular del melanoma

Un millor coneixement de l'etiopatogènia del melanoma pot conduir cap al desenvolupament de teràpies dirigides i per tant cap a una millora substancial en el tractament i pronòstic dels pacients. En aquest sentit, els avenços més importants dels últims anys en el camp de les neoplàsies melanocítiques han estat d'una banda el descobriment del paper de la via de senyalització de les proteïnes quinases activades per mitògen (MAPK, de l'anglès *mitogen-activated protein kinase*) com a via clau en el desenvolupament del melanoma, i d'altra banda, la revolució en el camp de la citogenètica. Tot seguit se'n comentaran de forma resumida els aspectes més importants.

### 4.1.- Oncogens implicats de la via de la MAPK

La via de senyalització de MAPK és una cascada de transducció de senyals extracel·lulars des de la membrana plasmàtica cap al nucli, mitjançant events de fosforilació i que acaba amb l'activació d'una sèrie de factors de transcripció que s'uniran a promotors de gens relacionats amb la proliferació, diferenciació i supervivència cel·lulars (Figura 17).<sup>83</sup> Per tant, una desregulació de la via juga un paper important en la patogènia tumoral, ja que proporciona al tumor capacitats de creixement i manteniment cel·lular.

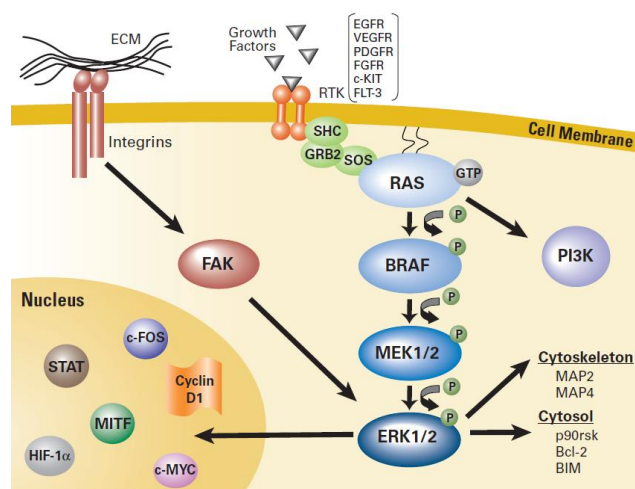


Figura 17. Esquema de la via MAPK. Adaptat de Fecher LA *et al.*<sup>84</sup>



## **Introducció**

Tal i com ja s'ha mencionat la via MAPK juga un paper importantíssim en la patogènia del melanoma, si bé es troba activada de forma aberrant en més del 80% dels melanomes primaris <sup>85,86</sup>, sobretot secundàriament a mutacions de *BRAF* (*v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*) en un 50-70% dels casos segons la sèrie i a mutacions de *NRAS* (*neuroblastoma RAS viral [v-ras] oncogene homolog*) en un 15-20% dels casos segons la sèrie. <sup>87-91</sup> Ambdues mutacions solen ser mútuament excloents. <sup>87,92</sup>

Les mutacions de *BRAF* i *NRAS*, però, són compartides pels nevus a freqüències similars, fet que suggereix que l'activació de la via MAPK seria necessària per al desenvolupament de les neoplàsies melanocítiques però no suficient per a la seva transformació maligna. Events genètics addicionals serien doncs necessaris per a l'expansió clonal i progressió tumoral dels melanomes <sup>92,93</sup>.

### **4.1.1.- *BRAF***

Tal i com s'ha dit, entre un 50 i un 70% dels melanomes presenten mutacions del gen *BRAF* (7q34), que comporten una activació constitutiva de la via de senyalització de MAPK. Aproximadament el 90% d'aquestes mutacions són per una substitució d'un àcid glutàmic per una valina al codó 600 (*BRAF* V600E) i que afecta el domini quinasa de la proteïna, si bé també es reconeixen altres mutacions activadores menys freqüents (per exemple: *BRAF* V600K i V600R). <sup>94</sup>

### **4.1.2.- *NRAS***

El primer oncogen identificat en melanoma va ser *RAS*, essent *NRAS* el membre de la família més freqüentment alterat. <sup>95</sup> La freqüència de les mutacions de *NRAS* en melanoma varia entre un 15% i un 20%, mentre que *HRAS* i *KRAS* estan rarament mutats, a diferència de la gran majoria de càncers, en què *KRAS* és amb diferència el gen més freqüentment mutat. El punt de mutació més freqüent és el codó 61 en l'exó 2, a pesar de que també es detecten ocasionalment mutacions en l'exó 1. Les mutacions del codó 61 són heterogènies, essent les més freqüents C181A (Q61K) i A182G

## ***Introducció***

(Q61R).<sup>96,97</sup> A part d'activar la via de MAPK, les mutacions de *NRAS* també activen simultàniament la via fosfatidilinositol- 3-quinasa (PI3K).

### **4.1.3.- *KIT***

*KIT* codifica per a un receptor tirosin-quinasa transmembrana. La unió del seu lligand resulta en l'activació d'una sèrie de vies de senyalització (MAPK i PI3K) que promouen la proliferació i supervivència cel·lular. Les seves mutacions es troben globalment en el 2% dels melanomes, essent més freqüents en els melanomes de mucoses (18%), en els melanomes lentiginosos acrals (21%) i en els melanomes de pell amb exposició solar crònica (15%).<sup>98</sup> S'han descrit diferents mutacions en melanoma però la més comuna és la p.L576P, que es detecta en una tercera part dels casos.<sup>99</sup> *KIT* també es pot trobar activat en melanomes per altres mecanismes com l'amplificació gènica, fet que ocorre en un número significatiu de casos.<sup>100</sup>

### **4.1.4.- *GNAQ***

*GNAQ* i *GNA11* codifiquen per les  $\alpha$ -subunitats de proteïnes G heterotrimèriques, que uneixen una sèrie de receptors transmembrana a les cascades de senyalització intracel·lular, sobretot la via MAPK. Les seves mutacions resulten en una activació constitutiva de la via i s'han detectat en un 45% i 32% dels melanomes uveals (respectivament) i en un 55% i un 7% dels nevus blaus (respectivament). A més aquestes mutacions semblen ser mútuament excloents entre elles i alhora amb les mutacions de *BRAF* i *NRAS*.<sup>101</sup> S'hipotetitzava que aquestes mutacions serien un event genètic inicial en els melanomes uveals, que podria ser seguit o bé d'una pèrdua d'heterozigositat del gen *BAP1* a 3p (resultant en un subtipus més agressiu) o bé de guanys a 6p (resultant en un subtipus més indolent).<sup>102</sup>

## **4.2.- Altres vies moleculars. Gens supressors.**

Altres alteracions menys freqüents que s'han descrit són les amplificacions de *MITF*, la sobreexpressió d'oncogens com *AKT3* i les

## Introducció

mutacions o delecions de gens supressors de tumors com *PTEN*, *TP53* o *CDKN2A*<sup>103</sup>. Tal i com ja s'ha descrit *CDKN2A* és un dels gens més importants de susceptibilitat a melanoma i les seves mutacions són presents en una gran proporció de melanomes familiars. Codifica per a dues proteïnes, p16INK4a i p14ARF, que actuen com a supressores tumorals ja que regulen de forma negativa la progressió del cicle cel·lular, regulant les vies de retinoblastoma i p53, respectivament.<sup>104,105</sup>

Recentment s'han descrit mutacions del gen *BAP1*, gen supressor de tumors que juga un paper important en el control de la progressió del cicle cel·lular, en el punt de control G1/S.<sup>102,106</sup> Les seves mutacions s'han relacionat amb una major agressivitat en melanoma uveal i també amb una major predisposició a presentar tumors melanocítics, especialment un subtipus especial de tumor de spitz epitelioides que histològicament mostra una combinació de nius de melanòcits convencionals amb melanòcits de morfologia spitzoide (Figura 18), en absència d'altres característiques típiques dels nevus de Spitz com són la hiperplàsia epidèrmica o els cossos de Kamino. A més es tracten de lesions purament dèrmiques. Freqüentment també presenten mutacions de *BRAF*, típicament absents en els nevus de Spitz.<sup>15</sup>

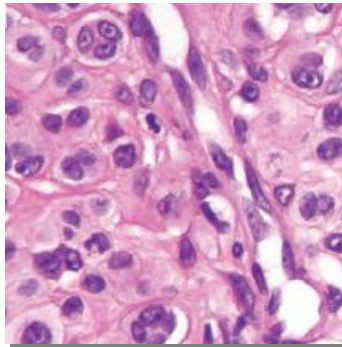


Figura 18. Imatge histològica d'un nevus associat a mutacions de *BAP1*.

## **Introducció**

### **4.3.- Alteracions citogenètiques**

Les alteracions citogenètiques van ser descrites per primer cop en línies cel·lulars de melanoma i en teixits, amb estudis de cariotipatge convencional,<sup>107,108</sup> amb una baixa sensibilitat i especificitat per a ser utilitzades com a marcador diagnòstic. A finals dels anys 90 els primers estudis amb hibridació genòmica comparada (CGH, de l'anglès *Comparative genomic hybridization*) convencional, tècnica descrita l'any 1992<sup>109</sup> i que va revolucionar l'anàlisi citogenètica dels tumors sòlids, van revelar que la gran majoria de melanomes tenen nombroses aberracions cromosòmiques, tant en forma de pèrdues com de guanys.<sup>110,111</sup> Uns anys més tard es va desenvolupar la tècnica d'*array* CGH (aCGH)<sup>112</sup> mitjançant la qual, i analitzant sèries més àmplies de tumors, es va corroborar aquest resultat i alhora es va suggerir l'existència de diferents patrons d'aberracions cromosòmiques depenent de la localització de la lesió i del grau d'exposició solar.

#### **4.3.1.- Alteracions citogenètiques en els nevus melanocítics**

Tos els estudis realitzats han demostrat que els nevus no presenten aquest tipus d'alteracions a excepció d'una petita proporció de nevus de Spitz (entre un 10% i un 20%), que mostren guanys aïllats del braç curt del cromosoma 11,<sup>113,114</sup> alteració no compartida pels melanomes. Aquests guanys s'associen freqüentment a mutacions de *HRAS*, que condueixen a una activació constitutiva de la via MAPK.<sup>115</sup>

#### **4.3.2.- Alteracions citogenètiques en els diferents subtipus de melanomes**

Els estudis de CGH han demostrat que més del 95% dels melanomes presenten aberracions cromosòmiques, mostrant freqüentment pèrdues en els cromosomes 9, 10, 6q i 8p i guanys involucrant els cromosomes 7, 8q, 6p, 1q, 17 i 20.<sup>116,117</sup>

A més, existeixen clares diferències tant pel què fa al número d'alteracions com a les regions alterades entre diferents grups de melanomes, essent aquestes diferències sobretot marcades entre aquells melanomes amb

## ***Introducció***

poca o gens relació amb les RUV (acrals o de mucoses) i aquells melanomes amb diferents graus de relació amb l'exposició al sol (intermitent o crònica). En conjunt, tant els melanomes acrals com de mucoses presenten un major grau d'aberracions cromosòmiques, trobant-se amplifícacions en un 89% i un 85% dels casos, respectivament. Els melanomes acrals es caracteritzen per presentar freqüentment guanys de 6p, 11q13, 22q11-13 i 5p15.<sup>116,118</sup> Els melanomes de mucoses presenten freqüents guanys de 6p, 12q14, 11q13 i 17q així com pèrdues de 3q, 8p, 10 i 11p. Per contra, les amplifícacions són poc freqüents en els melanomes desenvolupats en pell amb exposició solar crònica o intermitent.<sup>86</sup>

### **4.4.- Nova classificació molecular del melanoma. Implicacions terapèutiques.**

Tal i com s'ha mencionat anteriorment, la classificació actual del melanoma està basada en criteris clinicopatològics i no té cap valor pronòstic<sup>50,51</sup>. Per tal d'establir si una malaltia està composta per diferents subtipus cal integrar les característiques clinicopatològiques amb els factors biològics subjacents i identificar subgrups homogenis pel què fa a etiologia, comportament clínic i requeriments de maneig. Aquesta seria la base d'una classificació amb utilitat clínic.

Cada cop més s'està apostant per una integració de les alteracions moleculars a les morfològiques en el que podria ser la futura classificació del melanoma, basada en factors ambientals (grau d'exposició solar) i en les seves alteracions moleculars associades,<sup>86,119</sup> amb implicacions diagnòstiques, pronòstiques i de tractament.

Com ja s'ha descrit, en els últims anys s'ha avançat significativament en el coneixement de les bases genètiques del melanoma, identificant-se no només aberracions cromosòmiques (tant en forma de guanys com de pèrdues), sinó també mutacions puntuals sobretot en gens que codifiquen majoritàriament per proteïnes implicades en la via MAPK. A més, cadascuna

## Introducció

d'aquestes alteracions es donen amb diferents freqüències en diferents subtipus de melanomes i a la vegada semblen estar relacionades amb grups de pacients amb unes característiques clinicopatològiques diferencials. La taula 5 resumeix les característiques biològiques diferencials principals entre els subtipus de melanomes proposats recentment per Curtin *et al.*<sup>86</sup>

	Mutacions*	Aberracions cromosòmiques**
<b>Melanomes en pell amb exposició solar intermitent</b>	<i>BRAF</i> 54-63.1% <i>NRAS</i> 17.8-22% <i>KIT</i> *** 0%	Guanyes 6p, 7, 8q, 17q, 20q Pèrdues 9p, <b>10</b> , 21q
<b>Melanomes en pell amb exposició solar crònica</b>	<i>BRAF</i> 6-31.1% <i>NRAS</i> 15-16.1% <i>KIT</i> *** 28%	Guanyes 6p, <b>11q13</b> , 17q, 20q Pèrdues 6q, 8p, 9p, 12, 21q
<b>Melanomes en pell acral</b>	<i>BRAF</i> 15-25% <i>NRAS</i> 10-12.5% <i>KIT</i> *** 23-36%	Guanyes 5p15, 5p13, <b>6p</b> , 7, 8q, <b>11q13</b> , 12q14, 17q, 20q Pèrdues 6q, 9p, <b>10</b> , 11q, 21q
<b>Melanomes de mucoses</b>	<i>BRAF</i> 3-11% <i>NRAS</i> 5% <i>KIT</i> *** 15.6-39%	Guanyes <b>1q</b> , 4q12, <b>6p</b> , 7, 8q, <b>11q13</b> , <b>12q14</b> , <b>17q</b> , 20q Pèrdues <b>3q</b> , 4q, 6q, <b>8p</b> , 9p, <b>10</b> , <b>11p</b> , 11q, 21q

Taula 5. Taula resum dels subtipus de melanoma emergents, amb les seves alteracions moleculars associades.<sup>86,99,119-121</sup>

\* *NRAS* i *BRAF* són mutacions excloents; expressades en freqüències, segons les sèries.

\*\* detectades per aCGH, negreta si significativament diferents entre els grups ( $p < 0.05$ )<sup>86</sup>

\*\*\*mutacions i/o amplificacions<sup>98</sup>

Les mutacions de *BRAF* s'associen de forma reproduïble a unes característiques clinicopatològiques específiques. Els melanomes amb mutacions de *BRAF* solen presentar-se en pacients joves (< 55 anys) i apareixen principalment en àrees de pell amb exposició solar intermitent (sobretot tronc però també extremitats). Es tracta del subgrup més comú en caucàsics. Histològicament també solen mostrar unes característiques

## ***Introducció***

morfològiques distintives: extensió pagetoide important, tendència a la formació de nius intraepidèrmics, bona delimitació lateral, pigment abundant, melanòcits epitelioides i tendència a aparèixer en pell amb poc dany actínic i, per tant, amb poca elastosi solar.<sup>86,119-122</sup> Recentment, alguns autors han descrit que els melanomes amb mutacions de *BRAF* metastatitzen més freqüentment als ganglis limfàtics regionals i que la presència de melanòcits intraepidèrmics amb creixement pagetoide, el predomini de la formació de nius sobre el patró lentiginós i el grau de melanització dels melanòcits tenen un major valor predictiu per la presència de mutacions de *BRAF* que no pas el subtipus histològic en sí.<sup>119,120</sup> Des del punt de vista citogenètic, és un dels subgrups que menys freqüentment presenta aberracions cromosòmiques, conjuntament amb els melanomes originats sobre pells amb exposició solar crònica.

Les mutacions de *NRAS* s'han descrit com a més freqüents en melanomes nodulars i en melanomes originats sobre pell amb dany actínic.<sup>123</sup> Tanmateix s'han associat a un pitjor pronòstic,<sup>124</sup> si bé els melanomes amb mutacions de *NRAS* solen mostrar un elevat índex mitòtic i ser més gruixuts que aquells melanomes amb mutacions de *BRAF*.

Les alteracions de *KIT*, majoritàriament mutacions però també amplifícacions, es detecten sobretot en melanomes acrals, en melanomes de mucoses o en melanomes originats sobre pell amb exposició solar crònica, melanomes que per regla general mostren una baixa freqüència de mutacions de *BRAF*. Casualment es tracten de melanomes amb una sèrie de característiques en comú a pesar de ser entitats tant dispars: presenten una incidència creixent amb l'edat, rarament s'associen a un nevus preexistent, mostren un patró de creixement característicament lentiginós i tendeixen a tenir un component *in situ* mal circumscrit. Aquest últim fet s'ha relacionat amb una mobilitat lateral incrementada dels melanòcits neoplàstics explicada per l'activació de la via de *KIT*.<sup>125</sup> Cal remarcar, però, que aquests subtipus de melanomes també mostren alguns trets diferencials entre sí. Així doncs, mentre que els melanomes acrals i els melanomes de mucoses es caracteritzen per

## **Introducció**

presentar una inestabilitat genòmica distintiva que es tradueix en nombroses amplifícacions i delecions gèniques focals al llarg de tot el genoma,<sup>86,113,116,126</sup> els melanomes originats en pell amb exposició solar crònica rarament presenten aquest tipus d'alteracions, exceptuant amplifícacions del gen de la ciclina D1 (*CCND1*).<sup>86</sup> Alhora, els melanomes acrals es distingeixen dels melanomes de mucoses en dos aspectes. D'una banda presenten aberracions cromosòmiques diferents. De l'altra, els melanomes acrals es caracteritzen per presentar amplifícacions gèniques ja en les fases precoces,<sup>116,118</sup> en contraposició als melanomes d'altres localitzacions, que solen mostrar amplifícacions gèniques generalment en fases tardanes tal i com passa en la gran majoria de tumors sòlids.<sup>127</sup>

Aquesta nova subclassificació molecular tindria també implicacions terapèutiques, ja que existeixen teràpies dirigides contra alguns dels gens alterats.<sup>128-130</sup> Dabrafenib i Vemurafenib són inhibidors selectius de *BRAF*, actualment indicats en el tractament del melanoma metastàtic o no ressecable amb la mutació de *BRAF* V600E, grup de pacients en què comporten una millora significativa de la supervivència.<sup>94,131,132</sup> També existeixen inhibidors selectius de les quinases MEK1 i MEK2 (Trametinib), indicats en melanomes metastàtics o no ressecables amb les mutacions de *BRAF* V600E i V600K, resultant també en millores significatives en la supervivència.<sup>133</sup> Pel què fa a *KIT*, existeixen inhibidors selectius com l'Imatinib i que actualment s'estudien en diversos assajos clínics amb melanomes avançats que tenen mutacions activadores d'aquest gen.<sup>100,134</sup>

### 4.5.- Tècniques moleculars adjuvants en el diagnòstic histopatològic del melanoma

En els últims anys s'han intentat desenvolupar nombroses tècniques amb l'objectiu d'assistir en el diagnòstic diferencial nevus-melanoma si bé des del punt de vista assistencial poques d'elles han estat aplicades (Taula 6).



## Introducció

Tècnica	Referències
Immunohistoquímica	135-137
Pèrdua d'heterozigositat (LOH)	138,139
<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i> (MLPA)	140-142
Hibridació genòmica comparada (CGH) i <i>array</i> CGH (aCGH)	113,117,143
Hibridació <i>in situ</i> fluorescent (FISH)	144

Taula 6. Tècniques moleculars complementàries que s'han proposat per al diagnòstic diferencial entre nevus i melanoma.

### 4.5.1.- Immunohistoquímica

La immunohistoquímica, mètode basat en la detecció immunoenzimàtica d'antígens cel·lulars en teixit mitjançant anticossos específics, és una tècnica àmpliament utilitzada en la rutina diària de diagnòstic del laboratori d'anatomia patològica. En l'àrea de les lesions melanocítiques existeixen varis marcadors si bé gran part d'ells es consideren marcadors de diferenciació, útils per distingir els tumors melanocítics de tumors d'altres llinatges.<sup>135</sup> Malauradament, cap marcador ha demostrat fins al moment una capacitat de distinció clara entre les lesions benignes i les malignes. En aquests casos és important no només el grau de positivitat de la tinció en qüestió sinó també el seu patró d'expressió i la seva localització, i sempre en valoració conjunta amb les característiques morfològiques de la lesió.<sup>137</sup> Els marcadors més freqüentment proposats com a útils en el diagnòstic diferencial corresponen bàsicament a marcadors de diferenciació (HMB45, melan-A i SOX-10) però també proteïnes del cicle cel·lular (Ki67, Ciclina D1, p16INK4a, p27KIP1, p21WAF1/Cip1 i p53), reguladors de l'apoptosi (survivina) o d'altres com la proteïna nuclear PHH-3, dels quals tot seguit se'n destacaran els aspectes més rellevants.

## **Introducció**

### 4.5.1.1.- Marcadors de diferenciació melanocítica

L' HMB45 (*human melanoma black*) és un anticòs monoclonal que reconeix la gp100, una glicoproteïna pre-melanosoma.<sup>145</sup> Es considera sobretot un marcador de diferenciació però tradicionalment s'ha utilitzat també en determinades situacions de diagnòstic diferencial nevus-melanoma. En les lesions melanocítiques mostra un patró de tinció que recorda el patró de maduració dels nevus<sup>136</sup>; per tant, en la majoria de nevus la tinció per HMB45 es restringeix al component juntural i/o al component dèrmic superficial, mentre que es perd en profunditat (a excepció de les lesions tipus nevus blau). Contràriament, la majoria de melanomes cutanis expressen HMB45 d'una forma més heterogènia, bé marcant cèl·lules aïllades o bé en grups.<sup>137,146</sup> També és útil a l'hora de ressaltar el patró de creixement epidèrmic dels melanòcits, fent més evident els patrons de creixement lentiginós o de creixement pagetoide.  
147,148

El melan-A és un anticòs que detecta MART-1 (de l'anglès *Melanoma Antigen recognized by T-cells*)<sup>149</sup> i també és un marcador de diferenciació melanocítica,<sup>150</sup> expressant-se tant en lesions benignes com malignes, a excepció dels melanomes desmoplàstics.<sup>136</sup> Així doncs no és un marcador de malignitat en sí però el seu patró d'expressió ens ajuda a ressaltar els melanòcits, la seva densitat i distribució, sent útil en el diagnòstic diferencial en algunes situacions com pot ser la distinció entre queratosi actínica pigmentada o lentígen solar *versus* melanoma *in situ* tipus lentígen maligne en pells d'àrees fotoexposades.<sup>151</sup> La seva tinció dual amb l'antígen de proliferació Ki-67 utilitzant dos sistemes de detecció diferents també és útil en el diagnòstic diferencial nevus-melanoma ja que permet identificar la fracció de melanòcits que estan proliferant.<sup>152</sup>

SOX-10 és un factor de transcripció, marcador de diferenciació de cresta neural i, per tant, de diferenciació melanocítica.<sup>153</sup> És un marcador molt sensible de melanoma, incloent les variants desmoplàstica i

## **Introducció**

fusocel·lular però els nevus també l'expressen.<sup>154</sup> S'ha demostrat útil en la detecció de metàstasis en ganglis limfàtics sentinella i a l'hora de diferenciar el melanoma desmoplàstic de cicatrius dèrmiques.<sup>155,156</sup>

### 4.5.1.2.- Proteïnes del cicle cel·lular

La desregulació de les proteïnes del cicle cel·lular és una característica comuna del desenvolupament tumoral. El Ki67 (o MIB-1) és un marcador de proliferació, ja que la proteïna Ki-67 s'expressa en les fases proliferatives del cicle cel·lular (G1, S, G2, M) mentre que està absent en la fase de repòs (G0). Es tracta d'un marcador que pot ser força útil en el diagnòstic diferencial benigne-maligne donat que existeixen diferències en quant a quantitat i patró de distribució de la proliferació entre nevus i melanomes. Mentre que la majoria de nevus solen mostrar positivitat en menys d'1% de les cèl·lules i aquesta es sol limitar al component juntural, els melanomes presenten uns índex de proliferació més elevats, generalment superiors al 10%, i amb una distribució més irregular de la positivitat i amb predominància a les parts profundes.<sup>157-159</sup> Però té les seves limitacions ja que un resultat negatiu o un índex de proliferació baix no assegura un diagnòstic de benignitat<sup>160,161</sup> i és ben reconegut que existeix un cert encavalcament, sobretot en aquelles lesions considerades ambigües.<sup>135</sup>

La ciclina D1 juga un paper important en la progressió de la fase G1 a la fase S del cicle cel·lular i per tant en la proliferació cel·lular.<sup>162</sup> Si bé una sobreexpressió de ciclina D1 s'ha relacionat amb la transformació maligna en els tumors melanocítics,<sup>163,164</sup> també s'han detectat nivells d'expressió variables i inclús elevats en algunes lesions benignes com ara nevus displàstics o nevus de Spitz, tot i que aquests casos solen presentar un patró d'expressió zonal.<sup>165-167</sup> Per contra, els nevus melanocítics congènits o adquirits comuns solen mostrar nivells d'expressió baixos.<sup>168</sup>

## ***Introducció***

Tant p16INK4a com p27KIP1 són proteïnes inhibidores de les quinases dependents de ciclines (CDK's, de l'anglès *cyclin dependent kinases*) i, per tant, supressores del cicle cel·lular. Mentre que la seva expressió sol detectar-se en lesions benignes i en fases inicials del melanoma, aquesta es sol perdre en les fases més avançades del creixement tumoral.<sup>163,169-173</sup> p21WAF1/Cip1, un altre inhibidor de CDKs, mostra una major expressió en nevus de Spitz en comparació amb nevus comuns i melanomes.<sup>161,165,174</sup>

La proteïna p53, la funció principal de la qual és mantenir les cèl·lules amb dany de l'ADN en fase de repòs, s'havia proposat inicialment com un marcador útil per diferenciar nevus de melanomes, si bé s'expressa en major proporció en la fase de creixement vertical del melanomes.<sup>160</sup> Altres estudis, però, han posat de manifest la seva expressió també en nevus.<sup>148,175</sup>

Un altre marcador que ha anat cobrant protagonisme en els últims anys és la fosfohistona 3 (PHH3), probablement el marcador més específic de mitosis, ja que la histona 3 és una proteïna nuclear que es fosforila al màxim durant la mitosi. Estudis recents han suggerit que la seva tinció immunohistoquímica augmenta significativament la concordança interobservador en la valoració de l'índex mitòtic en melanomes primis<sup>176</sup> i també correlacionen la seva positivitat amb la supervivència dels pacients.<sup>177,178</sup> Alhora és també útil com a eina complementària per al diagnòstic diferencial entre lesions melanocítiques benignes i malignes.<sup>179</sup>

### 4.5.1.3.- Reguladors de l'apoptosi

La survivina és una proteïna de la família d'inhibidors de l'apoptosi.<sup>180</sup> Alguns estudis han descrit una expressió nuclear de survivina augmentada en els melanomes, contràriament als nevus que solen

## **Introducció**

resultar negatius. Malauradament la seva expressió en els melanomes és molt baixa, fet que dificulta el seu ús amb finalitat diagnòstica.<sup>148,165,179,181</sup>

### 4.5.2.- LOH.

Estudis de detecció de pèrdua d'heterozigositat han demostrat diferències importants en el número de còpies d'ADN entre nevus i melanomes, detectant-se freqüentment pèrdues de 9p, 10q, 6q i 18q en els melanomes<sup>138,139</sup> mentre que els nevus rarament presenten aquest tipus d'alteracions. Es tracta d'una tècnica amb limitacions a l'hora de ser aplicada a la rutina diagnòstica diària, ja que cal disposar d'ADN de cèl·lules no tumorals, la mostra es pot contaminar per cèl·lules normals i un sol experiment només permet analitzar un nombre limitat de locus.

### 4.5.3.- MLPA

L'amplificació múltiple amb sonda dependent de lligament és una tècnica descrita per primer cop l'any 2002 que mesura el número de còpies de fins a 45 seqüències d'àcids nucleics en una sola reacció. Està basada en la hibridació de sondes específiques per a seqüències determinades sobre ADN genòmic, seguida d'una amplificació per PCR múltiples i una anàlisi semiquantitativa dels productes de la PCR. Es tracta d'un mètode que requereix tant sols 20 ng d'ADN extret de teixit fixat en formol i parafinat i que permet diferenciar seqüències que difereixen tant sols en un nucleòtid.<sup>142,182</sup> És un mètode sensible però amb falsos positius, que s'ha testat en alguns casos de lesions melanocítiques. Takata *et al* van detectar alteracions per MLPA en la gran majoria dels melanomes estudiats, mostrant tots ells alteracions en més de 3 locus diferents i essent les pèrdues de 9p21 presents en un 70% dels casos. També van detectar alteracions en 1 o 2 locus en tots els nevus de Spitz així com en el 50% dels nevus melanocítics comuns estudiats.<sup>140</sup> Puig-Butillé *et al* van estudiar una sèrie de melanomes acrals mitjançant MLPA i van observar que aquest presentaven guanys de 20q13 (*AURKA*), 11q13 (*CCND1*) i 5p15/1p13.2 (*TERT/NRAS*).<sup>183</sup> Més recentment s'ha proposat la utilitat d'aquesta tècnica en la detecció de les pèrdues del cromosoma 3 i guanys de

## ***Introducció***

8q en els melanomes uveals, alteracions que impliquen un major risc de metastàsis en aquests pacients, ja que s'ha observat que la tècnica de MLPA és capaç de detectar aquells pacients de risc amb una precisió similar a la de la FISH.<sup>184</sup>

### **4.5.4.- CGH**

La CGH es basa en la comparació d'ADN genòmic del tumor amb ADN de referència (no necessàriament del mateix pacient), cadascun dels quals estan marcats amb fluorocroms diferents i subseqüentment hibridats en metafases cromosòmiques normals (CGH convencional) o en arrays d'ADN genòmic (aCGH). La CGH és aplicable en teixits fixats en formol i parafinats i permet l'evaluació de tot el genoma en un sol experiment, però té l'inconvenient que és una tècnica difícil d'aplicar a la pràctica diària, laboriosa i costosa (en temps i diners). A més és necessària una quantitat important d'ADN (almenys 500 ng per a cada experiment).<sup>143,185,186</sup> Tal i com ja s'ha descrit anteriorment, existeixen varis estudis de lesions melanocítiques mitjançant aquesta tècnica (veure apartat 4.3.)

### **4.5.5.- FISH**

La tècnica de FISH permet detectar i localitzar seqüències específiques d'àcids nucleics directament sobre preparacions cromosòmiques, suspensions cel·lulars o talls de teixits fixats en formol i inclosos en parafina.<sup>185</sup> Consisteix en utilitzar petites seqüències d'ADN de cadena senzilla, a les que denominarem sondes, prèviament marcades directa o indirectament amb molècules fluorescents (fluorocroms). La base metodològica de la seva realització consisteix en un procés de desnaturalització de l'ADN a temperatures elevades, seguit de la incubació conjunta de l'ADN de la mostra i la sonda a una temperatura de 37°C (hibridació) (Figura 19). Finalment es procedeix a l'anàlisi dels resultats utilitzant un microscopi de fluorescència.

És una tècnica que s'utilitza de forma rutinària amb finalitat diagnòstica però també pronòstica de les neoplàsies hematològiques així com també en

## Introducció

alguns tumors sòlids.<sup>187</sup> Permet detectar tant alteracions cromosòmiques numèriques (guanys i/o pèrdues) com estructurals (translocacions).

Per a l'estudi de les alteracions numèriques s'utilitzen sobretot sondes de locus específic, és a dir, sondes que hibriden amb una regió genòmica específica, corresponent al gen d'interès. Moltes vegades van acompanyades d'una sonda centromèrica d'un altre color específica per al centròmer del cromosoma on es situa el gen a estudi, per tal de tenir un control del número de còpies del cromosoma.

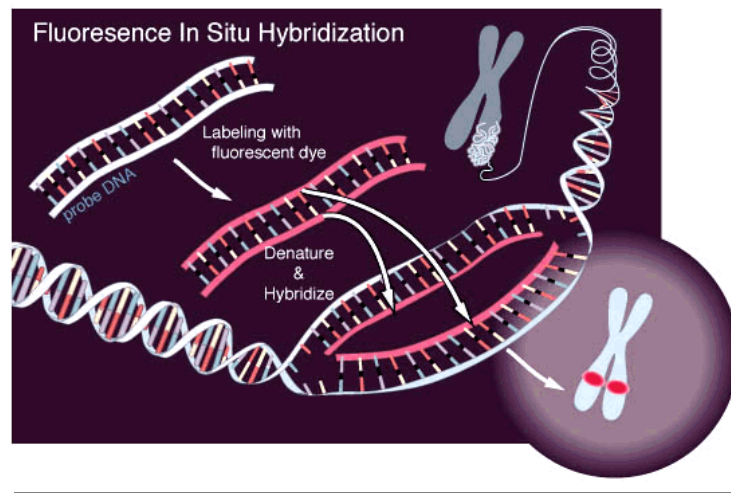


Figura 19. Esquema dels principis bàsics de la tècnica de FISH.

Font: *National human genome research institute*

Actualment existeixen nombroses sondes comercials, però en cas de que no existeixin per a la regió específica que es vol estudiar, es poden dissenyar i elaborar sondes no comercials mitjançant cromosomes artificials de bacteris (BACs, de l'anglès *Bacterial Artificial Chromosome*).

### 4.5.5.1.- Elaboració de sondes FISH amb BACs

Els BACs són sistemes de clonatge especialitzats derivats del F-plàsmid del bacteri *Escherichia coli*. Els plàsmids contenen una seqüència del genoma humà d'un tamany d'entre 3.000 i 30.000 parells de bases i un gen de resistència a un antibiòtic, generalment el cloramfenicol.<sup>188</sup> Els

## **Introducció**

clons de BACs es conserven en bacteris *E coli* cultivats en medi LB (Luria-Bertoni), a -80°. La biblioteca de BACs més coneguda és la llibreria 32K (col·lecció 32.000 clons) del *Children's Hospital Oakland Research Institute* (CHORI). Una vegada determinat el BAC que conté l'insert d'ADN que es correspon amb el gen d'interès, aquest s'extreu de la biblioteca genòmica. Es sotmet a dos subcultius amb medi LB, ambdós de 24 hores a 300 rpm a 37°C, el primer de 3mL i el segon de 50 mL, per tal d'obtenir així el màxim rendiment possible. Tot seguit, i després de procediments de lisi cel·lular i purificació, es procedeix a l'extracció de l'ADN. Finalment es realitza la tècnica de *Nick Translation*, mitjançant la qual es porta a terme el marcatge de l'ADN extret amb un fluorocrom (existeixen diferents colors).

Un cop obtinguda la sonda amb el BAC es comproba la seva especificitat mitjançant la hibridació sobre cromosomes en metafase.<sup>189</sup>

### 4.5.5.2.- Sonda multicolor *RREB1*, *MYB*, *CCND1*

Per tal de formular una sonda de FISH per al diagnòstic de melanoma, Bastian *et al* van seleccionar 14 gens candidats corresponents a aquelles aberracions cromosòmiques més freqüents detectades per CGH en estudis previs, incloent 148 melanomes i 153 nevus. Es van comparar diferents combinacions de 3 o 4 sondes, en subgrups d'una cohort de 97 melanomes i 95 nevus. Finalment es va identificar aquell panell de sondes de FISH amb un major poder dicriminatori entre lesions benignes i malignes: *RREB1* a 6p25, *MYB* a 6q23, *CCND1* a 11q13 i el centròmer del cromosoma 6 (CEN6). Subseqüentment, aquesta combinació de sondes va ser aplicada en una nova cohort de 58 melanomes i 51 nevus, per tal de determinar els punts de tall corresponents a una millor sensibilitat i especificitat, valors que van ser alhora validats en una tercera cohort. Aquesta sonda va ser patentada per Abbott/Vysis®,<sup>190</sup> amb una sensibilitat del 86,7% i una especificitat del 95,4%. Es tracta d'una sonda multicolor que conté sondes específiques per als gens *RREB1* (6p25) en Spectrum Red, *MYB* (6q23) en Spectrum Gold, *CCND1*



## Introducció

(11q13) en Spectrum Green i per al centròmer del cromosoma 6 (CEN6) en Spectrum Aqua. L'algoritme òptim per definir un resultat positiu és el següent: >55% dels nuclis amb més còpies de *RREB1* que de CEN6, >29% dels nuclis amb més de 2 còpies de *RREB1*, > 40% dels nuclis amb menys còpies de *MYB* que de CEN6 o >39% dels nuclis amb més de 2 còpies de *CCND1*. Una lesió melanocítica que compleixi qualsevol dels 4 criteris ha de ser considerada com un resultat positiu per melanoma (Figura 20).

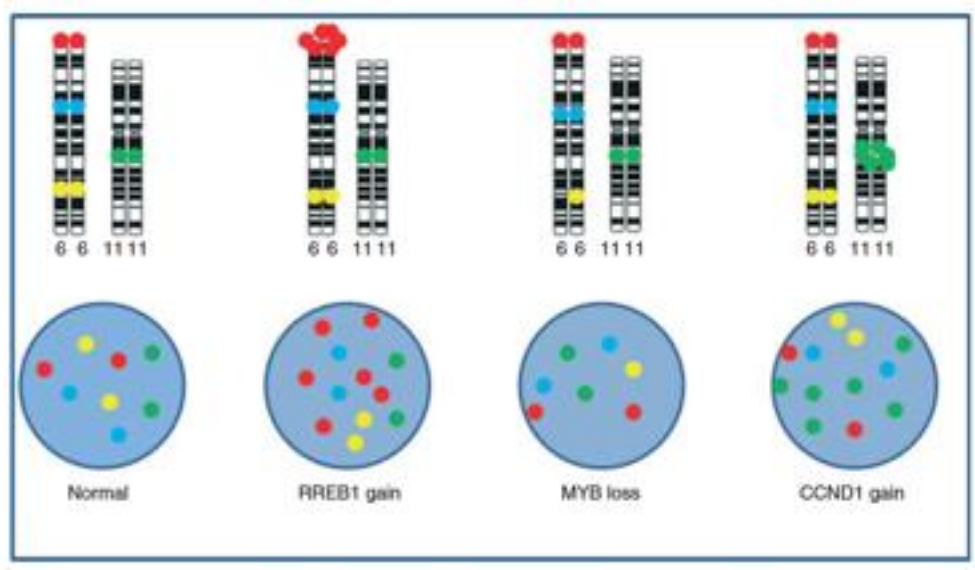


Figura 20. Criteris de valoració dels resultats de la sonda FISH multicolor *RREB1*, *MYB*, *CCND1*. Adaptada de Senetta R *et al.*<sup>191</sup>

Fins al moment aquesta sonda s'ha testat en múltiples escenaris, demostrant la seva utilitat en el diagnòstic diferencial tot i que amb sensibilitats i especificitats variables (Taula 7), essent de dubtosa utilitat en lesions ambigües<sup>192,193</sup> i amb una sensibilitat especialment baixa a l'hora de detectar els melanomes spitzoides.<sup>194</sup>

Aquesta variabilitat en la sensibilitat de la sonda multicolor podria explicar-se per la gran heterogeneïtat dels diferents tipus de melanomes a nivell molecular i, per tant, podria augmentar-se amb el desenvolupament de noves sondes addicionals específiques per a gens lligats a escenaris clinicopatològics concrets.<sup>195</sup> El que podria representar una altra gran

## Introducció

limitació d'aquest test és el fet que les neoplàsies spitzoides freqüentment presenten cèl·lules poliploides (és a dir, amb tres o més jocs complets de cromosomes), sobretot en el component epitelioides atípic d'alguns nevus, podent dificultar la interpretació de la prova i donant lloc a falsos positius.<sup>196,197</sup> En aquest sentit recentment s'ha proposat afegir a la sonda multicolor l'estudi de dos nous gens: *CDKN2A* (localitzat a 9p21) i *MYC* (localitzat a 8q24).<sup>198</sup>

Diagnòstic diferencial	S	E	Referència
Melanoma desmoplàstic vs nevus esclerosant	46%	100%	199
Metàstasi de melanoma nevus blau-like vs nevus blau epitelioides	90%	100%	200
Melanoma vs nevus de conjuntiva	100%	100%	201
Melanoma metastàtic vs nevus intranodal	83%	94%	202
Melanoma nevoide vs nevus mitòticament actiu	100%	100%	144
Melanoma nevoide vs melanoma sobre nevus	78%	100%	203

Taula 7. Sensibilitat i especificitat de la sonda comercial de FISH en els diferents escenaris en què ha estat testada

### 4.5.5.3.- *CDKN2A*

És ben reconegut que els melanomes spitzoides són molt heterogenis a nivell molecular però varis estudis han suggerit que presenten pèrdues de p16INK4a (una de les dues proteïnes codificades pel gen *CDKN2A*, localitzat a 9p21) amb elevada freqüència.<sup>165,169,204</sup> A més, els estudis de CGH previs han demostrat que aquest locus és un dels que més freqüentment mostra aberracions en forma de delecions en els melanomes,<sup>113,117</sup> tot i que en un principi no va ser inclòs en la sonda

## ***Introducció***

de FISH comercial. Això va ser així perquè en els primers estudis no es diferenciaven les pèrdues de 9p21 heterozigotes de les homozigotes i, tenint en compte que molts nevus displàstics i nevus de Spitz poden presentar un cert grau de pèrdues heterozigotes de 9p21,<sup>205-207</sup> el seu estudi per FISH no aportava poder discriminatori a la nova sonda.<sup>190</sup> En resum, els melanomes presenten freqüentment delecions homozigotes de 9p21 (Figura 21), i sobretot ho fan els melanomes spitzoides,<sup>194</sup> raó per la qual s'ha proposat afegir l'estudi d'aquest locus a la sonda multicolor, amb la finalitat principal d'augmentar la sensibilitat a l'hora de detectar aquest subtipus de melanomes. El fet d'afegir l'estudi d'un locus d'un cromosoma addicional disminueix també les possibilitats de donar falsos positius deguts a la presència de cèl·lules poliploides, sobretot presents en lesions spitzoides benignes.

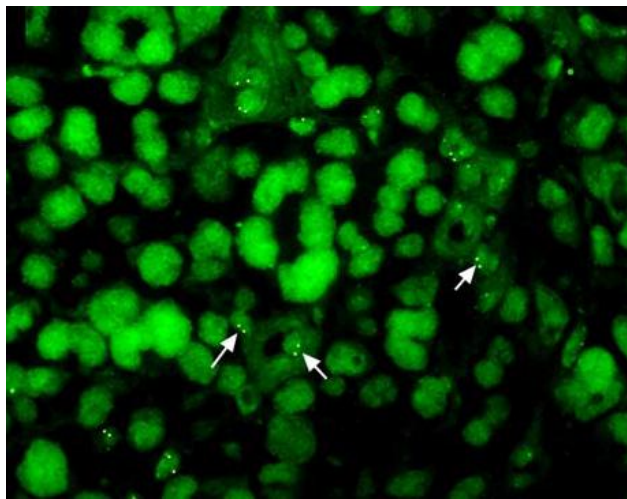


Figura 21. Imatge de FISH en què s'observen nombroses cèl·lules melanocítiques amb deleción homozigota de 9p21 (Spectrum Green). Les fletxes indiquen cèl·lules no tumorals amb dotació normal (control intern).<sup>198</sup>

### **4.5.5.4.- *MYC***

El gen *MYC* (8q24) està localitzat al braç llarg del cromosoma 8, una de les regions més freqüentment amplificades en melanomes segons

## ***Introducció***

els estudis de CGH <sup>113</sup> mentre que les seves amplificacions per FISH es detecten en un 10% dels melanomes (Figura 22).<sup>208</sup> S'ha proposat també afegir l'estudi del seu locus per FISH a la sonda multicolor pel seu valor pronòstic, donat que estudis recents han demostrat que les amplificacions de *MYC* en melanoma s'associen a un pitjor pronòstic.<sup>209</sup>

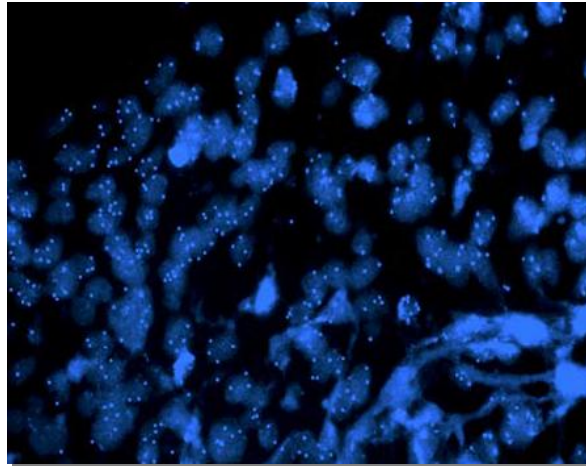


Figura 22. Imatge de FISH mostrant cèl·lules melanocítiques amb guany en el número de còpies de *MYC* (Spectrum Aqua).<sup>198</sup>

### 4.6.- Marcadors moleculars de pronòstic

La necessitat cada vegada més gran d'identificar eines que ens permetin d'estratificar els pacients en termes de pronòstic ha fet explorar la utilitat de la immunohistoquímica i de la FISH amb aquesta finalitat en l'àrea del melanoma.

Existeixen nombrosos estudis que han intentat identificar marcadors immunohistoquímics relacionats amb la progressió tumoral en melanomes i, per tant, candidats potencials per a esdevenir marcadors de pronòstic, si bé en cap dels casos s'han validat testant-los en grans sèries de melanomes primaris amb seguiments clínics llargs.<sup>210</sup> Varis treballs han demostrat que la valoració de l'índex de proliferació mitjançant Ki67 en melanomes primis (Breslow < 1mm) prediu més acuradament l'evolució del tumor que no pas l'índex mitòtic,<sup>211,212</sup> fet pel qual fins i tot s'ha proposat que aquest marcador substitueixi la valoració de l'índex mitòtic en el sistema d'estadiatge de l'AJCC.<sup>210</sup> Altres marcadors

## Introducció

pronòstics proposats han estat el factor de transcripció MITF en melanomes de gruix intermig (de 1 a 4 mm),<sup>213</sup> o panells multimarcadors que contenen proteïnes del cicle cel·lular (BCL6, Ki67, p16INK4a i p27KIP1)<sup>163</sup> o molècules relacionades amb l'oncogènesi del melanoma (ATF2, p21,  $\beta$ -catenina, p16INK4a i fibronectina).<sup>214</sup>

Les amplificacions gèniques (definides com a un augment en el número de còpies d'una determinada regió cromosòmica) representen un mecanisme essencial de sobreexpressió proteica i activació d'oncogens en cèl·lules tumorals.<sup>127</sup> Així doncs, en el camp del melanoma, existeixen algunes amplificacions gèniques que s'han proposat com a factors pronòstics. Pouryazdanparast et al van descriure un subgrup de melanomes amb amplificacions de *MYC* amb unes característiques clíniques i histològiques distintives: aparició en pell amb exposició solar intermitent, tumors amelanòtics (tant clínica com histològicament), preferentment nodulars o de creixement dèrmic, amb freqüent consumpció de l'epidermis, amb poca associació a nevus preexistents i amb un curs clínic agressiu.<sup>208</sup> També s'han proposat les amplificacions de *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*),<sup>215</sup> *MITF* (*microphthalmia-associated transcription factor*)<sup>216,217</sup> o *TOP1* (*topoisomerase (DNA) I*).<sup>218</sup> Amb el desenvolupament i aplicació de la sonda multicolor *RREB1*, *MYB*, *CCND1* també s'ha descrit que un resultat de FISH positiu es correlaciona amb un major risc de metàstasis o mort deguda al melanoma.<sup>219</sup> Prèviament, a més a més, ja s'havien associat a un pitjor pronòstic les amplificacions de *CCND1*, sobretot quan apareixen en forma de regions amb tinció homogènia (HSR, de l'anglès *Homogeneous staining regions*)(Figura 23).  
209,220

## ***Introducció***

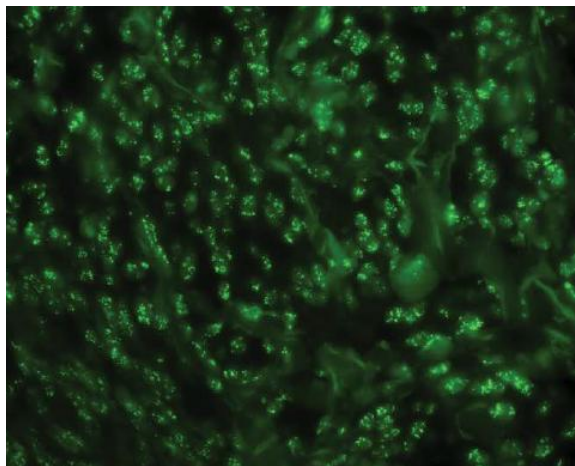


Figura 23. Imatge de FISH d'un melanoma mostrant amplificació massiva del gen de la ciclina D1 (*CCND1* Spectrum Green) en forma de HSR.<sup>220</sup>



## **II. Hipòtesi i objectius**





## ***Hipòtesi i objectius***

### **Hipòtesi**

El melanoma és la primera causa de mortalitat per càncer cutani. L'estudi histopatològic és considerat actualment el *gold standard* per al diagnòstic de melanoma i per al diagnòstic diferencial amb lesions melanocítiques benignes (nevus). Aquest, però, mostra moltes limitacions i de fet existeix una gran variabilitat interobservador inclús entre dermatopatòlegs experts. Contextos clars de dificultat diagnòstica són les neoplàsies melanocítiques fusocel·lulars i les neoplàsies melanocítiques acrals.

Estudis recents amb hibridació genòmica comparada (CGH) han demostrat que els melanomes freqüentment presenten aberracions cromosòmiques tant en forma de guanys com de pèrdues de determinats gens, alteracions no compartides pels nevus. A més, aquests estudis també han posat en evidència que sota la denominació de melanoma existeixen alhora diferents subtipus de neoplàsies amb aberracions cromosòmiques distintives, suggerint diferents bases patogenètiques. Així, els melanomes lentiginosos acrals es caracteritzen per presentar amplificacions dels gens *CCND1*, *TERT* i *AURKA* en un nombre determinat de casos.

La ***hipòtesi del treball*** és que l'estudi de les alteracions genètiques mitjançant FISH pot ser útil com a eina complementària en el diagnòstic diferencial nevus-melanoma en contextos de dificultat diagnòstica. Alhora pot contribuir a la subclassificació dels diferents tipus de melanoma i a la identificació de nous marcadors pronòstic.

### **Objectius**

#### *Objectiu general*

Determinar la utilitat de l'estudi de determinats gens mitjançant FISH com a eina complementària a l'estudi histopatològic en el diagnòstic de les neoplàsies melanocítiques fusocel·lulars i de les neoplàsies melanocítiques acrals, així com correlacionar les alteracions genètiques amb les característiques clinicopatològiques dels pacients.

## *Hipòtesi i objectius*

### *Objectius concrets*

- 1.- Revisar una sèrie de neoplàsies melanocítiques fusocel·lulars, incloent nevus de Reed i melanomes fusocel·lulars, atenent a les característiques clinicopatològiques (**primer treball**)
- 2.- Estudiar en aquests casos l'expressió de proteïnes del cycle cel·lular (Ki67, p53, p16INK4a, p27KIP1, ciclina D1) i reguladors de la apoptosi (survivina) amb tècniques d'immunohistoquímica, i determinar la seva utilitat en el diagnòstic histopatològic (**primer treball**)
- 3.- Determinar la sensibilitat i especificitat de la FISH amb l'estudi dels gens *REEB1* (6p25), *MYB* (6q23) i *CCND1* (11q13) en el diagnòstic diferencial de les neoplàsies melanocítiques fusocel·lulars benignes i malignes (**primer treball**)
- 4.- Revisar una sèrie de neoplàsies melanocítiques acrals, incloent nevus i melanomes acrals, i determinar la sensibilitat i especificitat de la FISH amb l'estudi dels gens *REEB1* (6p25), *MYB* (6q23), *CCND1* (11q13) i **MYC** (8q24) en el seu diagnòstic diferencial (**segon treball**)
- 4.- Elaborar sondes de FISH específiques per al marcatge dels gens *TERT* (5p15) i *AURKA* (20q13) a partir de BAC's que contenen insert el segment d'ADN d'aquests gens (**segon treball**)
- 5.- Estudiar els gens *TERT* i *AURKA* mitjançant FISH en la sèrie de lesions melanocítiques acrals i determinar la sensibilitat i especificitat en el diagnòstic d'aquestes lesions quan s'afegeixen a les sondes prèviament testades (**segon treball**)
- 6.- Correlacionar l'estat dels gens *TERT*, *AURKA* i *CCND1* amb la seva expressió proteica avaluada mitjançant immunohistoquímica, en les neoplàsies melanocítiques acrals (**segon treball**)
- 7.- Correlacionar els estudis moleculars amb les característiques histopatològiques dels tumors acrals i amb els paràmetres clínics i pronòstics dels pacients (**tercer treball**)

## **III. Primer treball**



**Pigmented spindle cell nevus: clues for differentiating it from spindle cell malignant melanoma. A comprehensive survey including clinicopathologic, immunohistochemical and FISH studies**

Diaz A, Valera A, Carrera C, Hakim S, Aguilera P, García A, Palou J, Puig S, Malveyh J, Alos L

*Am J Surg Pathol* 2011; 35:1733-1742

El nevus melanocític fusocel·lular pigmentat, també anomenat nevus de Reed, és un tumor melanocític distintiu que pot mostrar algunes característiques tant clíniques com histològiques preocupants i que per tant pot imitar un melanoma. En una sèrie de 46 lesions melanocítiques amb cel·lularitat fusiforme, incloent 22 nevus de Reed i 24 melanomes fusocel·lulars, vàrem recollir les dades clíniques i histològiques i vàrem evaluar l'expressió de proteïnes del cicle cel·lular i reguladors de l'apoptosi mitjançant immunohistoquímica. A més, es va realitzar estudi de FISH utilitzant sondes específiques per a 6p25 (*RREB1*), 11q13 (*CCND1*), 6q23 (*MYB*) i el centròmer del cromosoma 6, corresponent a la sonda comercial desenvolupada per Abbott/Vysis® en col·laboració amb el Dr. Boris Bastian (Universitat de Califòrnia, San Francisco, EUA). Els nevus fusocel·lulars pigmentats es presentaven en individus més joves, més freqüentment en dones i es tractaven de lesions més petites (de menys de 7 mm) afectant majoritàriament les extremitats inferiors. Pel contrari, els melanomes afectaven principalment tronc, extremitats superiors i l'àrea de cap i coll. Des del punt de vista histològic, la simetria, una bona delimitació lateral així com la uniformitat dels nius cel·lulars vàren resultar característiques estadísticament significatives a favor de nevus, mentre que la presència de creixement pagetoide i l'extensió annexial es veien freqüentment en ambdues lesions. Els marcadors immunohistoquímics que van mostrar una expressió significativament diferencial van ser Ki67, ciclina D1 i survivina. La FISH va resultar positiva en 1 dels 15 nevus de Reed mentre que va resultar negativa en 4 de 15 melanomes. Aquests resultats correlacionaven amb una sensibilitat

## ***Primer treball***

del 73% i una especificitat del 93%. Vàrem concloure que en l'evaluació dels tumors melanocítics fusocel·lulars la integració de la informació clínica i histològica és essencial. Tècniques addicionals com la immunohistoquímica (antígen de proliferació Ki67, ciclina D1 i survivina) o la FISH poden ser útils com a eines complementàries al diagnòstic histopatològic.

## Pigmented Spindle Cell Nevus: Clues for Differentiating It From Spindle Cell Malignant Melanoma. A Comprehensive Survey Including Clinicopathologic, Immunohistochemical, and FISH Studies

Alba Díaz, MD,\* Alexandra Valera, BSc,\* Cristina Carrera, MD,† Sofía Hakim, MD,\* Paula Aguilera, MD,† Adriana García, MD,\* Josep Palou, MD,† Susana Puig, MD, PhD,† Josep Malvehy, MD, PhD,† and Lúcia Alos, MD, PhD\*

**Abstract:** Pigmented spindle cell nevus (PSCN), also known as Reed nevus, is a distinctive melanocytic tumor that can show worrisome clinical and histologic features mimicking a malignant melanoma. From a series of 46 pigmented spindle cell melanocytic lesions, including 22 PSCN and 24 spindle cell malignant melanomas (SCMMs), we collected clinical and histopathologic characteristics and evaluated cell cycle and apoptosis regulators by immunohistochemistry. Moreover, fluorescence in situ hybridization (FISH) using probes targeting 6p25 (*RREB1*), 11q13 (*CCND1*), 6q23 (*MYB*), and centromere 6 was performed. PSCN presented in younger people, frequently in women, and were small lesions under 7 mm in diameter affecting the lower limbs, whereas SCMMs arose more frequently in the trunk, upper limbs, and head and neck region. Histologically, symmetry, good lateral demarcation, and uniformity of cellular nests were significantly differential features of PSCN, whereas pagetoid and adnexal spread were frequently seen in both tumors. Immunohistochemical markers that significantly differed from melanomas were Ki-67, cyclin D1, and survivin. FISH was positive in 1 of 15 PSCN and was negative in 4 of 15 SCMMs. These results correlated to a sensitivity of 73% and a specificity of 93%. In conclusion, in the evaluation of pigmented spindle cell melanocytic tumors, the integration of clinical and histologic assessment is essential. However, ancillary techniques such as proliferation antigen Ki-67, cyclin D1, survivin, and FISH can be useful as adjunctive tools.

**Key Words:** nevus, melanoma, immunohistochemistry, FISH

(*Am J Surg Pathol* 2011;35:1733–1742)

From the \*Department of Pathology, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona; and †Department of Dermatology, Melanoma Unit, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain.

Conflicts of Interest and Source of Funding: The authors have disclosed that they have no significant relationship with, or financial interest in, any commercial companies pertaining to this article.

Correspondence: Lúcia Alos, MD, PhD, Department of Pathology, Hospital Clínic, Villarroel, 170. 08036 Barcelona, Spain (e-mail: lalos@clinic.ub.es).

Copyright © 2011 by Lippincott Williams & Wilkins

Pigmented spindle cell nevus or Reed nevus (PSCN) was first described by Reed et al<sup>28</sup> in 1975 as a distinctive benign acquired melanocytic nevus that has been widely considered as a variant of Spitz nevus. A number of such cases show the typical clinical and histopathologic features that allow us to make a proper diagnosis; however, not infrequently, some cases can mimic a malignant melanoma.<sup>30</sup> Clinically, it presents as an intensely pigmented lesion that frequently acquires a black color and displays rapid growth; it causes clinical concern and is frequently excised. Histologically, it is composed of a symmetric, spindle-shaped, and heavily pigmented melanocytic proliferation. However, even typical PSCN can show some features of histologic concern, such as increased proliferative activity with the presence of mitotic figures, scarce demarcation, and adnexal and pagetoid spread. Some of these cases are misdiagnosed as spindle cell malignant melanoma (SCMM) and are not infrequently found in the consultation files of melanocytic lesions.<sup>8</sup>

It is well recognized that the histologic diagnosis of spitzoid melanocytic lesions is not always straightforward, and it is one of the most controversial issues in dermatopathology. Low reproducibility and interobserver variability in the diagnosis of these lesions have been reported, even among expert dermatopathologists.<sup>3</sup> There is a need to define histologic criteria to evaluate such lesions and to integrate ancillary techniques to increase sensitivity and specificity to reach an accurate diagnosis. Despite the fact that no immunohistochemical markers are yet known to reliably differentiate benign nevus from malignant melanoma, some can be helpful when added to the histologic evaluation, such as the HMB-45 staining pattern<sup>5</sup> and the proliferative index measured by the Ki-67 labeling.<sup>6</sup> Other cell cycle proteins and apoptosis regulators, such as cyclin D1 (*CCND1*), p16INK4, p27KIP1, p53, and survivin, have been used previously to differentiate benign nevus from malignant melanoma with different and controversial results.

Recently, molecular techniques such as fluorescence in situ hybridization (FISH) have been evolving as part of a routine diagnostic tool for the evaluation of melanocytic



tumors. A commercially available set of probes targeting 6p25 (*RREB1*), 11q13 (*CCND1*), 6q23 (*MYB*), and CEP6 has proven to be useful in several studies in increasing sensitivity and specificity in the differential diagnosis between benign nevi and melanomas.<sup>7,9,16,18,27</sup>

Despite the difficulties in diagnosing a subset of PSCN, to our knowledge, no comprehensive studies integrating clinicopathologic characteristics with immunohistochemical and FISH techniques have been published before. The aim of this study is to review a series of typical PSCN and SCMMs with histologic similarities by integrating clinical data, histologic characteristics, immunohistochemical procedures, and FISH so as to determine those features that are useful as diagnostic tools in a proper differential diagnosis.

## MATERIALS AND METHODS

### Case Selection and Data Collection

We collected a total of 46 formalin-fixed, paraffin-embedded samples from 2005 to 2009 from the archives of the Pathology Department at the Hospital Clínic of Barcelona. We included 22 PSCN and 24 SCMMs. All the melanomas were similar in histology to PSCN, as all of them were mainly composed of spindle-shaped cells. The patients were seen and followed up in the Melanoma Unit of the Department of Dermatology at the Hospital Clínic. The study was approved by the institutional ethics review board. Clinical data were obtained from the review of the clinical files.

Whole hematoxylin and eosin-stained sections were examined blindly by 3 pathologists (A.D., J.P., and L.A.) to agree on diagnoses. Only cases with complete uniformity of opinion among the 3 dermatopathologists were selected. Atypical forms of PSCN were excluded from the study. The following histologic features were recorded: size, symmetry, lateral demarcation, nest uniformity, presence of epidermal hyperplasia, epidermal pigmentation, lentiginous growth, pagetoid spread, adnexal extension, melanocytic cell pigmentation, cellular atypia, and mitotic rate. Melanocytic cell pigmentation was graded semiquantitatively as absent, slight, or marked. Cellular atypia was defined as the presence of cells with an increased variability in nuclear size and shape, having irregular chromatin and prominent nucleoli. Mitotic rate was evaluated in 10 high-power fields (HPF) ( $\times 400$ ) by using an Olympus BH-2 microscope. Regarding dermal changes, we evaluated the presence of lymphocytic inflammatory infiltrate, plasma cells, melanophages, vascular proliferation, elastosis, and regression. The presence of inflammatory lymphocytic infiltrate and melanophagia in the dermis was assessed in 2 categories: absent/sparse or moderate/marked. Finally, for melanomas, Clark level and Breslow thickness were registered.

### Tissue Array Construction

The areas to be included in the tissue arrays were selected from whole hematoxylin and eosin-stained sections. The tissue microarrays were constructed by using a Manual

Tissue Arrayer 1 (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI), and 2 new paraffin blocks were created including duplicated representative 2-mm cores from each case.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemical studies were conducted from tissue microarrays with the automated immunohistochemical system TechMate 500 (Dako Co, Carpinteria, CA), using the EnVision system (Dako). In brief, 4- $\mu$ m-thick sections were deparaffinized and hydrated through graded alcohol and water. Peroxidase was blocked for 7.5 minutes in ChemMate peroxidase-blocking solution (Dako). Thereafter, the slides were incubated with primary antibodies for 30 minutes and washed in ChemMate buffer solution (Dako). The peroxidase-labeled polymer was then applied for 30 minutes. After washing in ChemMate buffer solution, the slides were incubated with the 3-Amino-9-Ethylcarbazole substrate chromogen solution, washed in water, counterstained with hematoxylin, and mounted. The primary antibodies used in the study were as follows: HMB-45 [Dako, Carpinteria, CA; clone HMB-45, Ready-to-Use (RTU)], Ki-67 (Dako; clone MIB-1, RTU), CCND1 (Dako; clone SP4, RTU), p16INK4 (mtm Laboratories, Heidelberg, Germany; clone E6H4, RTU), p27KIP1 (Dako; clone SX53G8, dilution 1:20), p53 (Dako; clone DO-7, RTU), and survivin (Novus Biologicals, Littleton, CO; clone NB500-201, dilution 1:500). Appropriate positive and negative controls were used for each antibody. The percentage of positive cells was recorded in each case with regard to cytoplasmic (for HMB-45) or nuclear (for Ki-67, CCND1, p27KIP1, p53, and survivin) staining. p16INK4-positive cells showed both nuclear and cytoplasmic staining.

### FISH

FISH was performed by using the 4-color probe set targeting the ras responsive element binding protein 1 (*RREB1*) on 6p25, V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (*MYB*) on 6q23, cyclin D1 (*CCND1*) on 11q13, and the chromosome 6 centromeric region (Abbott Molecular, Des Plaines, IL).

From each tissue microarray block, 2- $\mu$ m-thick sections were mounted onto positively charged slides (SuperFrost Plus, ThermoShandon, Pittsburgh, PA), and they were deparaffinized and dehydrated. Thereafter, pretreatment and pepsin digestion (2 min) were carried out, followed by dehydration in 70%, 85%, and 96% ethanol for 2 minutes each. Hybridization was performed at 37°C for 16 to 18 hours. Sections were placed in washing buffer at room temperature for 2 to 10 minutes to remove the coverslips and then immersed in 65°C washing buffer for 10 minutes, dehydrated, dried, and counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole.

### Enumeration of FISH Signals

FISH evaluation was carried out using an Olympus BX-51 microscope equipped with 4',6-diamidino-2-

phenylindole, Aqua, Gold, GreenV2, and Red single band-pass filter sets.

First, each case was examined at low-power magnification to select those areas with abnormal copy numbers. Thereafter, at least 10 adjacent nuclei from 3 different areas were enumerated (a total of 30 cells) under high-power magnification ( $\times 400$ ). Overlapping nuclei and nuclei with  $< 2$  signals were not listed. Moreover, cases in which only  $< 30$  nuclei could be evaluated, or in which nuclei did not show signals for all probes, were excluded. A case was considered as having a positive FISH result if any of the following criteria were met: (a) gain in 6p25 (*RREB1*) relative to CEP6  $> 55\%$  or (b) gain in 6p25 (*RREB1*)  $> 29\%$ , (c) gain in 11q13 (*CCND1*)  $> 38\%$  and (d) loss in 6q23 (*MYB*) relative to CEP6  $> 40\%$ , according to the previously determined cutoffs.<sup>17</sup>

**Statistical Analysis**

Statistical differences within qualitative parameters were assessed by the  $\chi^2$  test. Quantitative data were compared between both groups using either a Student *t* test (for variables with a normal distribution) or a Mann-Whitney *U* test (for variables without a normal distribution). Spearman rank order correlations were performed on quantitative data. The results were considered statistically significant at a *P* value of 0.05 or less (2 sided).

**RESULTS**

**Clinical Findings**

The clinical features in both groups are summarized in Table 1. PSCN significantly presented in younger people ( $P < 0.0001$ ), affected women more frequently ( $P = 0.03$ ), and were significantly smaller in size when compared with SCMMs ( $P < 0.0001$ ). While PSCN were mainly located in the lower limbs (12 of 22 lesions), the majority of SCMMs arose in the trunk, upper limbs, and the head and neck region (20 of 24 lesions) ( $P = 0.001$ ).

None of the patients with PSCN presented local recurrences or metastases. All the patients with a diagnosis of SCMM were treated following the protocols in our hospital with appropriate surgical excision of margins. No local recurrences occurred after a mean follow-up of 21.6 months. Only 1 patient diagnosed with superficial spreading-type SCMM with a Breslow index of 0.8 mm presented lymph node and lung metastases 1 year after the diagnosis.

**Histopathologic Findings**

Sixteen of the 22 PSCN were junctional, and 6 were compound, with the dermal component being limited to the papillary dermis in all cases. Two SCMMs were in situ, 9 were Clark level II, and 13 were Clark level III. Breslow index in infiltrating melanomas ranged between 0.3 and 0.8 mm. Histologic classification revealed 15 superficial spreading melanomas, 5 lentigo maligna melanomas, and 4 spitzoid melanomas.

The histologic features of both PSCN and SCMMs are summarized in Table 2. Histologic characteristics that

**TABLE 1. Clinical Characteristics of Patients With PSCN and SCMM**

	PSCN	SCMM	<i>P</i>
n	22	24	
Age, median (range)	22 (3-54)	62 (26-90)	$< 0.0001$
Sex (male:female)	4:18	12:12	0.03
Location			
Head & Neck	0	5	
Trunk	7	7	
Upper limb	2	8	0.001*
Lower limb	13	3	
Unknown	0	1	
Size, median (range), mm	4 (2-7)	7 (3-17)	$< 0.0001$

\*Statistical comparison was performed between cases located in the head and neck + trunk + upper limbs and those located on lower limbs.

significantly favored the diagnosis of PSCN were symmetry, good lateral circumscription, nest uniformity, epidermal hyperplasia and pigmentation, marked melanocytic cell pigmentation, and presence of abundant dermal melanophages (Figs. 1, 2). Moreover, in most nevi, cell pigmentation and dermal melanophages were homogeneously distributed, whereas in most melanomas both cellular pigmentation and dermal melanophagia appeared irregularly distributed. In 3 PSCN, atypical cells with enlarged and indented nuclei and prominent nucleoli were identified. However, these cells were isolated and only occasionally found, and most of the tumoral cells did not show atypical nuclear features (Fig. 1D).

The histologic characteristics that significantly correlated with SCMM diagnosis were as follows: presence of a lentiginous growth pattern, cellular atypia in most cells, presence of 2 or more mitoses per 10 HPF, and dermal features including the presence of plasma cells, elastosis, and regression (Figs. 3, 4).

**Immunohistochemistry Analysis**

Immunohistochemical data are summarized in Table 3. HMB-45 was highly expressed in the intraepidermal component of most PSCN and SCMMs. However, the dermal component was negative in PSCN, whereas it was irregularly positive in SCMMs. We observed that both groups differed significantly only in the average percentage of Ki-67, cyclin D1, and survivin nuclear positive cells, which were higher in melanomas when compared with nevi ( $P < 0.0001$  for the 3 markers) (Fig. 3F, Fig. 4C). For malignant melanomas we found a statistically significant positive correlation between mitotic rate and the proportion of positive cells for Ki-67 ( $\rho = 0.48$ ,  $P = 0.001$ ), cyclin D1 ( $\rho = 0.36$ ,  $P = 0.017$ ), and survivin ( $\rho = 0.58$ ,  $P < 0.0001$ ).

**FISH Results**

The FISH results are presented in Table 4. FISH could be assessed in 30 of 44 cases (15 PSCN and 15 SCMMs). The remaining cases were excluded because only  $< 30$  nuclei could be assessed properly or because nuclei did not show signals for all probes.

TABLE 2. Histologic Characteristics of PSCN and SCMM, Including Dermal Features

	PSCN (n = 22)	SCMM (n = 24)	P
Symmetry	20 (91%)	2 (8%)	< 0.0001
Good lateral demarcation	16 (73%)	5 (21%)	< 0.0001
Nest uniformity	21 (95.5%)	0 (0%)	< 0.0001
Epidermal hyperplasia	20 (91%)	13 (54%)	0.006
Epidermal pigmentation	17 (77%)	13 (54%)	0.029
Lentiginous growth	3 (14%)	12 (50%)	0.009
Pagetoid spread	17 (77%)	21 (87%)	0.36
Adnexal extension	9 (41%)	14 (58%)	0.23
Melanocytic cell pigmentation			
Absent	0 (0%)	2 (9%)	< 0.0001
Slight	9 (41%)	18 (82%)	
Marked	13 (59%)	2 (9%)	
Cellular atypia	3 (14%)	24 (100%)	< 0.0001
Mitotic count*			
1	5 (23%)	11 (50%)	0.002
≥ 2	0 (0%)	9 (37%)	
Dermal features			
Lymphocytic inflammation			
Absent/scarce	15 (68%)	10 (42%)	0.07
Moderate/marked	7 (32%)	14 (58%)	
Presence of plasma cells	0 (0%)	6 (25%)	0.01
Melanophages			
Absent/scarce	6 (27%)	18 (75%)	0.001
Moderate/marked	16 (73%)	6 (25%)	
Vascular proliferation	20 (91%)	19 (79%)	0.26
Elastosis	0 (0%)	10 (42%)	0.001
Regression	0 (0%)	8 (33%)	0.003

\*Mitoses per 10 HPF (×400).

One of the 15 PSCN (6%) tested positive by FISH, and it only met 1 criterion (gain in *RREB1* >29%) (Fig. 2B). However, the relation of *RREB1* with CEP6 was under 55%.

With regard to SCMMs, 11 of 15 cases showed FISH-positive results. The number of met criteria ranged from 1 (in 7 cases) to 3 (in 1 case). These results corresponded to a sensitivity of 73% and a specificity of 93%.

The 5 cases with contradictory FISH results were reevaluated by the 3 dermatopathologists, and clinical, histologic, and immunohistochemical studies were taken into account. No reason to modify the original diagnoses was found. The PSCN with a positive FISH result was a symmetrical and well-demarcated lesion with neither atypical cells nor mitotic figures (Fig. 2). The negative SCMM cases for FISH were 3 superficial spreading-type melanomas and 1 lentigo maligna-type melanoma. All of them were mainly composed of spindle cells, but scarce and isolated epithelioid cells were identified (Fig. 3).

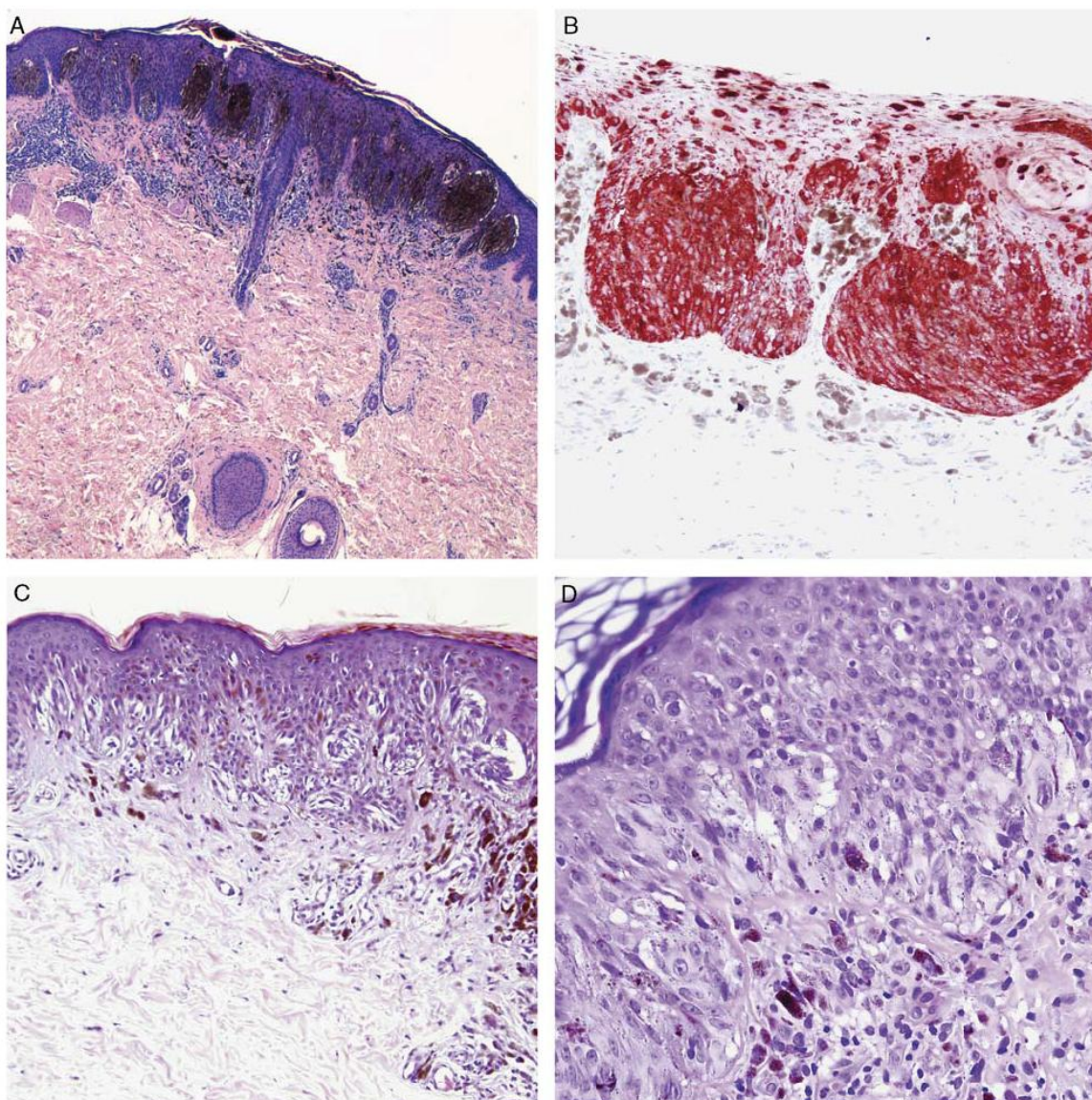
## DISCUSSION

In this series of 46 melanocytic tumors, including pigmented spindle cell or Reed nevi (PSCN) and SCMMs, we found clinical and histologic criteria, immunohistochemical findings, and FISH results that significantly correlated with the diagnosis of benign lesion or malignant melanoma.

Clinically, benign tumors significantly presented at a younger age, predominantly in female patients, mainly

in the lower extremities, and measured <7 mm. These clinical characteristics of PSCN must be taken into account in the evaluation of these lesions. In fact, it has been stressed before that the proper diagnosis of PSCN is particularly sensitive to clinical information.<sup>11</sup>

Histologic features favoring the diagnosis of benign nevus were architectural (symmetry, clear demarcation, uniformity of tumoral nests, and epidermal hyperplasia) and cytologic (homogenous and diffuse tumoral cell pigmentation, absence of marked and diffuse cellular atypia, and low mitotic index). Conversely, histologic characteristics favoring the diagnosis of malignant melanoma were the lack of tumoral nest uniformity, lentiginous growth, irregular pigmentation, cellular atypia, and high mitotic index. Interestingly, pagetoid and adnexal spread, which can be histologic features of concern in the assessment of melanocytic lesions, were frequently seen in both PSCN and SCMMs. Cellular atypia was considered when cells with an increased variability in nuclear size and shape, especially with enlarged and indented nuclei, irregular chromatin, and presence of prominent nucleoli, were identified. Atypical cells were only occasionally found in some PSCN, whereas they were predominant in all SCMMs, in accordance with other authors.<sup>23</sup> Despite the fact that there were histologic characteristics that significantly correlated with the diagnosis of a benign lesion, some nevi failed to show all these features, especially PSCN at an early stage, which were poorly circumscribed and had a lentiginous pattern (Fig. 1). Conversely, some malignant melanomas also shared some histologic features

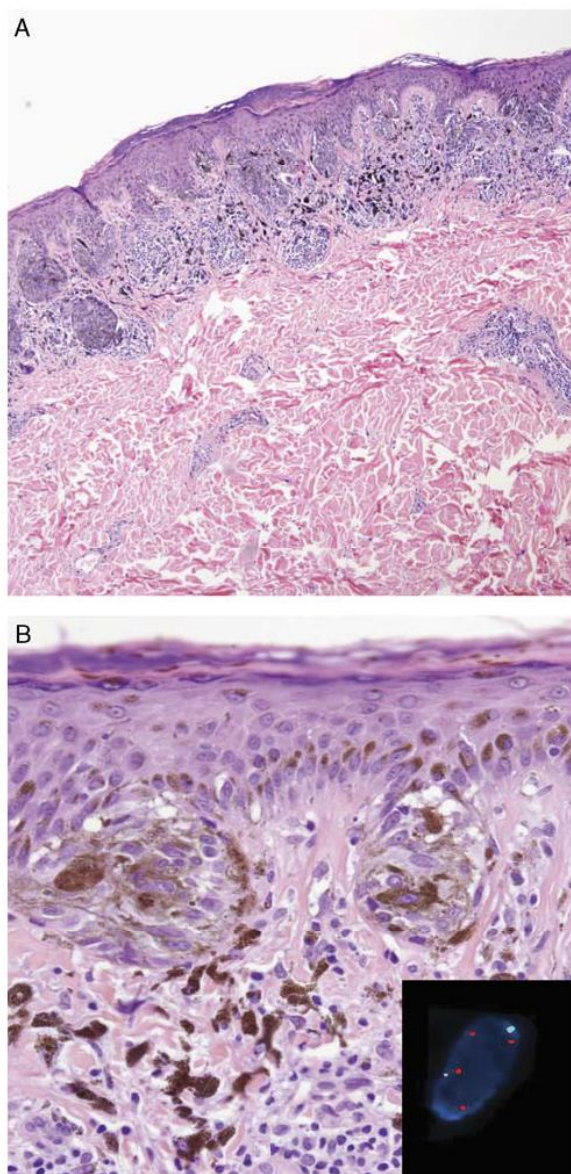


**FIGURE 1.** A, Histologic characteristics of a PSCN in the thigh of a 16-year-old girl. It shows a symmetrical melanocytic cell proliferation that is both heavily and diffusely pigmented and is distributed in regular nests. Note the adnexal extension of the tumor cells [hematoxylin and eosin (HE),  $\times 40$ ]. B, The same case stained with HMB-45, which highlights the extensive pagetoid spread of tumor cells (HMB-45,  $\times 100$ ). C, A picture showing a border of a poorly demarcated PSCN at an early stage in the thigh of an 18-year-old woman. Tumoral nests are slightly irregular in this area of the lesion (HE,  $\times 100$ ). D, A PSCN in the thigh of a 17-year-old girl. It shows focally cellular atypia: some nuclei are more than twice the size of a keratinocyte and have prominent nucleoli (HE,  $\times 200$ ).

of PSCN (Table 2). Nevertheless, some dermal features can be very useful in evaluating these lesions, because a dermal inflammatory infiltrate composed of plasma cells and features of elastosis and regression were characteristics seen only in malignant melanomas.

Immunohistochemistry is the most widely used technique to evaluate melanocytic lesions as an adjunctive

tool to histopathologic study. The HMB-45 staining pattern has been proposed as a useful marker.<sup>5</sup> In our series, most lesions were intraepidermal and intensely positive for HMB-45; hence we could not find statistical differences between the nevi and melanomas. However, HMB-45 was lost in the dermal component of PSCN and was positive in the dermal component of most SCMMs,



**FIGURE 2.** Histologic pictures of a PSCN with a positive FISH result arising in the thigh of a 28-year-old woman. A, A symmetrical, heavily pigmented melanocytic proliferation with typical epidermal hyperplasia and composed of regular tumoral nests [hematoxylin and eosin (HE),  $\times 40$ ]. B, At higher magnification, the lack of cellular atypia and marked pigmentation can be seen (HE,  $\times 200$ ). Inset: FISH picture of the same case showing a nucleus with increased number of *RREB1* (red) signals ( $\times 1000$ ).

according to the results of other studies.<sup>5</sup> HMB-45 was also useful to highlight pagetoid and adnexal spread and to assess the lentiginous pattern of growth.

Dysregulation of cell cycle proteins is a common characteristic of tumor development. Ki-67 protein is

expressed during the proliferative cell cycle (G1, S, G2, and M phases) and is absent in the resting (G0) phase. The proliferative index, measured through Ki-67 protein expression, was significantly low in PSCN, ranging from 0% to 5%, whereas the mean proliferation rate in SCMMs was 12.7%, ranging from 1% to 40%. The usefulness of Ki-67 labeling for differential diagnosis between benign and malignant melanocytic tumors has been published before.<sup>20,21</sup> It is a known helpful marker in routine practice when positive, whereas a negative result or low proliferation rate does not ensure the diagnosis of a benign lesion.

Cyclins regulate cell cycle progression in association with cyclin-dependent kinases (CDKs). Cyclin D1 (*CCND1*) plays an important role in the progression from the G1 to S phase and in cell proliferation. In our series, the expression of the protein detected by immunohistochemistry did not correlate with the *CCND1* gene amplification that occurred in only 3 melanomas. The immunoeexpression of cyclin D1 was significantly lower in nevi than in melanomas (mean of 12.4% vs. 41.5%). However, this expression was variable among cases, and some nevi showed higher expression compared with some melanomas. Although a high expression of cyclin D1 has been related to malignant transformation in melanocytic tumors, a variable or even a high expression of cyclin D1 has been observed in some nevus subtypes, such as Spitz and dysplastic nevi, in contrast to common acquired or congenital nevi, which usually show a low expression of this marker.<sup>2,14,25</sup>

Both p16INK4 and p27KIP1 are CDK inhibitors and suppress cell cycle progression. Familial melanomas and a subset of sporadic melanomas show deletion or mutation of the *CDKN2A* gene.<sup>13</sup> However, p16INK4 protein expression is usually present in melanomas, especially in early phases of tumor growth, but it is frequently lost in advanced stages of tumor growth.<sup>15,29</sup> Similar results have been observed with p27KIP1 protein expression, which is usually lost in the dermal vertical growth component of melanomas. Both p16INK4 and p27KIP1 expressions have been inversely related to a poor prognosis of melanomas.<sup>2,12,32</sup> Most melanomas tested in our study were thin tumors, and we could not find significant differences in the immunostain of either protein when comparing PSCN and SCMMs. p16INK4 was equally expressed in nevi and melanomas, whereas p27KIP1 had a tendency to show a higher expression in benign nevi than in melanomas; an absence of or low p27KIP1 expression was mainly observed in malignant melanomas.

Tumor suppressor gene *TP53* has a primary function in maintaining cells in a resting stage after DNA damage, and it can also initiate apoptosis if damaged DNA is not repaired. Different tumor types carry *TP53* mutation, allowing escape from P53-induced cell cycle arrest and apoptosis. *TP53* dysfunction is generally associated with p53 protein overexpression. In malignant melanomas, mutation of the *TP53* gene accounts for about 20% of cases; however, p53 overexpression is usually higher, and it has been observed in some benign nevi as well, according to our results. These results indicate that the detection of the protein does not

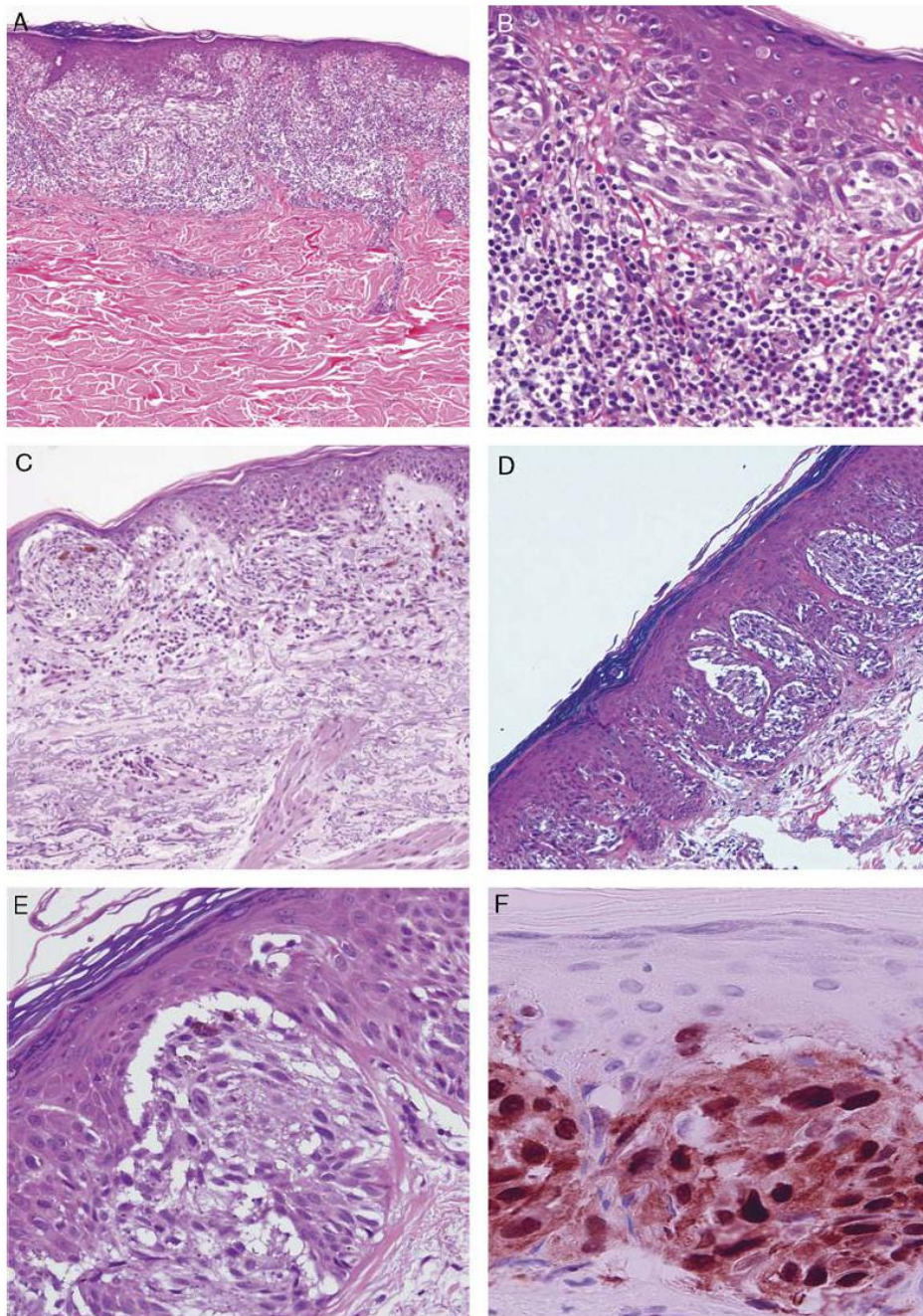
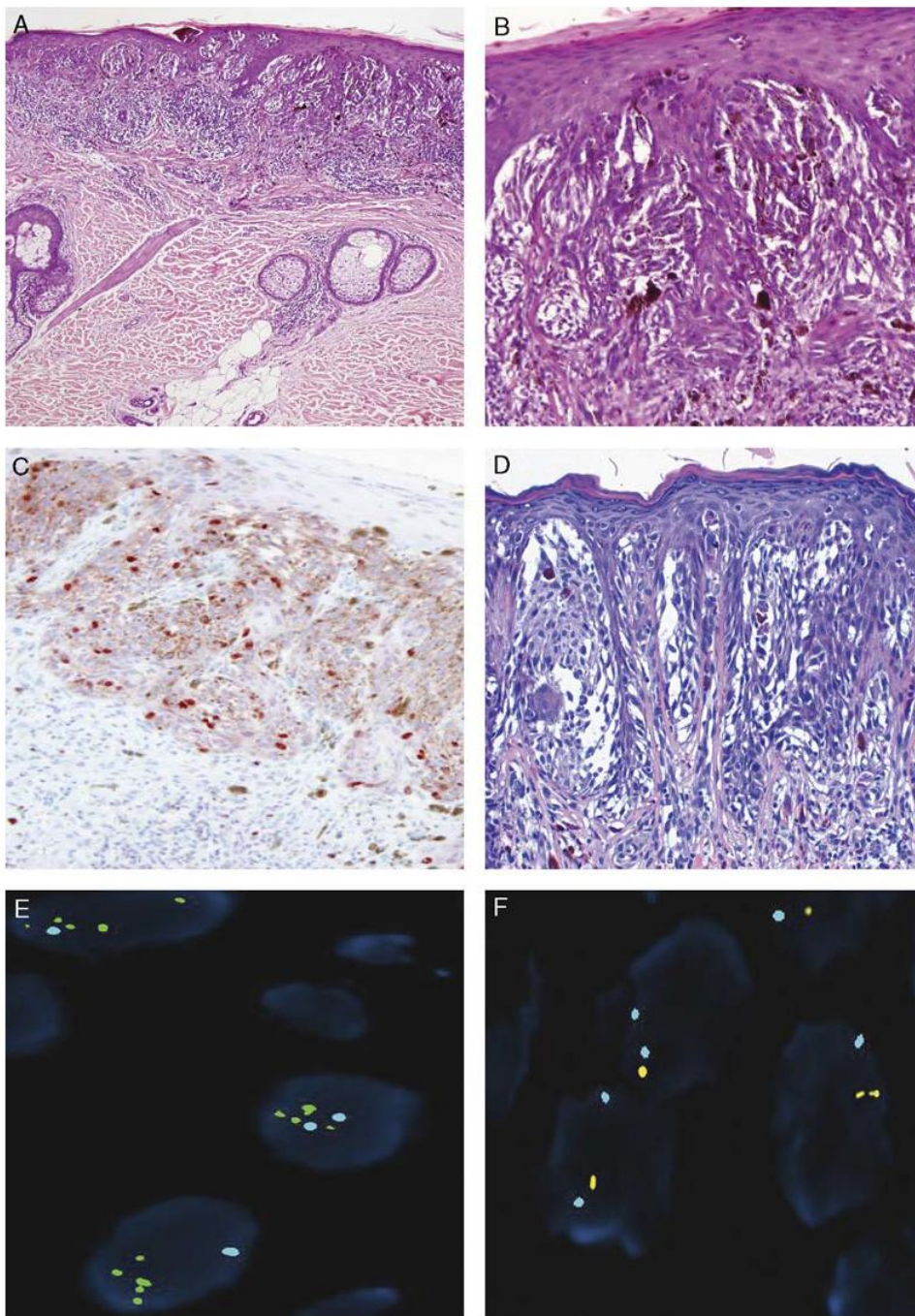


FIGURE 3. Histologic pictures of SCMM with negative FISH results. A, SCMM, superficial spreading type, arising in the back of a 62-year-old woman. This is an asymmetrical melanocytic proliferation arranged in irregular nests, associated with epidermal hyperplasia and a dense dermal inflammatory infiltrate [hematoxylin and eosin (HE),  $\times 40$ ]. B, The same case at a higher magnification. The tumor cells show atypia, and plasma cells can be identified in the inflammatory infiltrate (HE,  $\times 200$ ). C, SCMM, lentigo maligna type, in the forearm of a 67-year-old woman. It is a heterogeneously pigmented lesion composed of irregular nests. There is slight cellular atypia. In the dermis we can observe marked elastosis (HE,  $\times 100$ ). D, SCMM, superficial spreading type, arising in the wrist of a 55-year-old woman. The lesion is composed of irregular tumoral nests. In the dermis there is elastosis (HE,  $\times 100$ ). E, The same case at a higher magnification, showing irregular pigmentation and focal cellular atypia (HE,  $\times 200$ ). F, Cyclin D1 immunostain of the same case, showing a high proportion of positive cells (Cyclin D1,  $\times 200$ ).



**FIGURE 4.** Histologic pictures of SCMM. A, Asymmetrical lesion composed of irregular nests and classified as spitzoid melanoma arising in the shoulder of a 60-year-old man. There is marked epidermal hyperplasia and a predominance of lymphocytic infiltrate in the dermis [hematoxylin and eosin (HE),  $\times 40$ ]. B, The same lesion at a higher magnification. The tumoral cells show slight atypia and irregular pigmentation. Scattered and irregularly distributed melanophages can be seen in the dermis. C, Survivin immunostain of the same case, showing some nuclear positive cells (Survivin,  $\times 100$ ). D, SCMM, superficial spreading type, arising in the shoulder of a 26-year-old man. There is epidermal hyperplasia and lentiginous growth of the tumoral cells (HE,  $\times 200$ ). E, A FISH picture of the same case, showing an amplification of *CCND1* (green signal) ( $\times 1000$ ). F, Another FISH picture of a melanoma case with loss of *MYB* (gold signal) in relation to CEP6 (aqua signal) ( $\times 1000$ ).

TABLE 3. Immunohistochemical Results of PSCN and SCMMs

	Percentage of Positive Cells Mean (Range)		P
	PSCN	SCMM	
HMB-45*	90.5 (70-100)	88.5 (70-100)	0.56
Ki-67	1.4 (0-5)	12.7 (1-40)	< 0.0001
Cyclin D1	12.4 (1-40)	41.5 (1-95)	< 0.0001
p27 <sup>KIP1</sup>	40.8 (1-80)	29.3 (0-70)	0.19
p16 <sup>INK4</sup>	23.1 (0-70)	15.90 (0-60)	0.31
p53	42.4 (0-90)	34.7 (1-80)	0.45
Survivin	0	2.75 (0-10)	< 0.0001

\*Only intraepidermal component of both PSCN and SCMM was assessed.

correlate with the gene mutation in melanocytic tumors.<sup>1,31</sup> However, the loss of functional p53 appears to be a late change in melanoma progression. A higher expression of the p53 protein in the vertical growth phase of the tumor has been observed and has been proposed as a useful marker for differentiating from benign nevi.<sup>20</sup>

Survivin is a protein member of the inhibitor of the apoptosis family, which acts by blocking mitochondrial-induced apoptosis.<sup>22</sup> A nuclear higher expression of

survivin in malignant melanomas has been previously reported, in contrast with benign nevi.<sup>10,14,26</sup> Moreover, this expression has been assessed as a prognostic factor and as a potentially important therapeutic target in melanomas.<sup>19</sup> In our study, nevi did not express this protein, whereas melanomas showed a low but significantly higher expression of it, in accordance with previously published studies.<sup>10,14,26</sup> However, nuclear staining for survivin was very low in all positive cases, which renders the assessment of this marker difficult and limits its usefulness for differential diagnosis purposes.

Interestingly, in our series we have related the expression of survivin with the proliferative activity of the tumors, as we have found a statistically significant positive correlation between the mitotic rate and the expression of Ki-67, cyclin D1, and survivin in malignant melanomas.

Previous studies using comparative genomic hybridization have demonstrated that nevi and melanomas differ dramatically in the presence of numerous clonal chromosomal aberrations.<sup>4</sup> On the basis of this molecular information, a novel targeted FISH assay including 4 probes has been developed, and its usefulness in differentiating several problematic melanocytic lesions

TABLE 4. FISH Results of PSCN and SCMMs

Case	Percentage of Cells Showing Gain in <i>RREB1</i>	Percentage of Cells Showing <i>RREB1</i> Gain Relative to Cep6	Percentage of Cells Showing Gain in <i>CCND1</i>	Percentage of Cells Showing <i>MYB</i> Loss Relative to Cep6	Overall FISH Result
<b>PSCN</b>					
1	20	6	3	3	Negative
2	3	0	3	16	Negative
3	0	3	13	20	Negative
4	6	0	3	26	Negative
5	13	10	3	20	Negative
6	0	3	6	6	Negative
7	0	3	3	16	Negative
8	3	0	5	10	Negative
9	0	3	3	13	Negative
10	6	3	8	4	Negative
11	3	10	0	23	Negative
12	6	0	0	10	Negative
13	10	3	0	33	Negative
14	33	43	0	13	Positive
15	0	3	3	10	Negative
<b>SCMM</b>					
1	30	20	3	63	Positive
2	6	10	16	26	Negative
3	6	30	3	30	Negative
4	13	10	46	20	Positive
5	36	56	23	46	Positive
6	13	23	16	50	Positive
7	43	56	10	26	Positive
8	6	10	3	30	Negative
9	0	10	73	13	Positive
10	33	43	20	13	Positive
11	6	60	6	16	Positive
12	6	6	3	63	Positive
13	16	56	0	20	Positive
14	33	43	66	13	Positive
15	3	16	0	30	Negative

Bold lettering if met criteria.



has been described in some recent publications.<sup>7,9,16,18,27</sup> However, this molecular test should never be used as an alternative to careful microscopy and expert consultation.<sup>24</sup> This is the first time that these probes have been tested in a series of PSCN and SCMMs. We detected 1 false-positive case: 1 PSCN met 1 criterion related to *RREB1*, which showed an abnormal number of copies, whereas the relation with CEP6 was normal. False-positive results in nevi of several types, including Spitz nevi, have been observed before.<sup>16</sup> This result gives a specificity of 93%, similar to previously published studies. In our series, 4 SCMMs were negative for FISH studies: 3 superficial spreading malignant melanomas and 1 lentigo maligna-type melanoma (Fig. 3). These results correspond to a sensitivity of 73%. Interestingly, these malignant melanomas were in situ or thin tumors. The low sensitivity of around 70% has been detected before in another type of in situ melanoma,<sup>17</sup> whereas in melanomas with vertical growth or metastasis the sensitivity of these FISH probes ranges from 83% to 90%.<sup>9,16,18,27</sup>

In conclusion, a comprehensive study for the evaluation of pigmented spindle cell melanocytic lesions is required. Despite the fact that the integration of clinical and histopathologic features remains essential in distinguishing PSCN from SCMMs, ancillary techniques including the study of proliferation antigen Ki-67, cyclin D1, survivin, and FISH, are useful as adjuvant tools to improve sensitivity and specificity in reaching an accurate diagnosis.

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Elena Gonzalvo and Maria del Carmen Garcia for performing the technical procedures and Gemma Laguna for secretarial assistance.

#### REFERENCES

- Albino AP, Vidal MJ, McNutt AS, et al. Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. *Melanoma Res.* 1994;4:35–45.
- Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol.* 2004;164:193–203.
- Barnhill RL, Argenyi ZB, From L, et al. Atypical Spitz nevi/tumors: lack of consensus for diagnosis, discrimination from melanoma, and prediction of outcome. *Hum Pathol.* 1999;30:513–520.
- Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, et al. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* 1998;58:2170–2175.
- Bergman R, Dromi R, Trau H, et al. The pattern of HMB-45 antibody staining in compound Spitz nevi. *Am J Dermatopathol.* 1995;17:542–546.
- Bergman R, Malkin L, Sabo E, et al. MIB-1 monoclonal antibody to determine proliferative activity of Ki-67 antigen as an adjunct to the histopathologic differential diagnosis of Spitz nevi. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:500–504.
- Busam KJ, Fang Y, Jhanwar SC, et al. Distinction of conjunctival melanocytic nevi from melanomas by fluorescence in situ hybridization. *J Cutan Pathol.* 2010;37:196–203.
- Cook MG. Benign melanocytic lesions mimicking melanomas. *Pathology.* 2004;36:414–418.
- Dalton SR, Gerami P, Kolaitis NA, et al. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to distinguish intranodal nevus from metastatic melanoma. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:231–237.
- Ding Y, Prieto VG, Zhang PS, et al. Nuclear expression of the antiapoptotic protein survivin in malignant melanoma. *Cancer.* 2006;106:1123–1129.
- Ferrara G, Argenyi Z, Argenziano G, et al. The influence of clinical information in the histopathologic diagnosis of melanocytic skin neoplasms. *PLoS One.* 2009;4:e5375.
- Florenes VA, Maelandsmo GM, Kerbel RS, et al. Protein expression of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 in malignant melanoma: inverse correlation with disease-free survival. *Am J Pathol.* 1998;153:305–312.
- Flores JF, Walker GJ, Glendening JM, et al. Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma. *Cancer Res.* 1996;56:5023–5032.
- Garrido-Ruiz MC, Requena L, Ortiz P, et al. The immunohistochemical profile of Spitz nevi and conventional (non-Spitzoid) melanomas: a baseline study. *Mod Pathol.* 2010;23:1215–1224.
- George E, Polissar NL, Wick M. Immunohistochemical evaluation of p16INK4A, E-cadherin, and cyclin D1 expression in melanoma and Spitz tumors. *Am J Clin Pathol.* 2010;133:370–379.
- Gerami P, Jewell SS, Morrison LE, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Am J Surg Pathol.* 2009;33:1146–1156.
- Gerami P, Barnhill RL, Beilfuss BA, et al. Superficial melanocytic neoplasms with pagetoid melanocytosis: a study of interobserver concordance and correlation with FISH. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:816–821.
- Gerami P, Wass A, Mafee M, et al. Fluorescence in situ hybridization for distinguishing nevoid melanomas from mitotically active nevi. *Am J Surg Pathol.* 2009;33:1783–1788.
- Grossman D, McNiff JM, Li F, et al. Expression and targeting of the apoptosis inhibitor, survivin, in human melanoma. *J Invest Dermatol.* 1999;113:1076–1081.
- Kaleem Z, Lind AC, Humphrey PA, et al. 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;13:217–222.
- Kapur P, Selim MA, Roy LC, et al. Spitz nevi and atypical Spitz nevi/tumors: a histologic and immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 2005;18:197–204.
- Liu T, Brouha B, Grossman D. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene.* 2004;23:39–48.
- Massi G, LeBoit PE, eds. *Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma.* Germany: Steinkopff Verlag Darmstadt; 2004.
- McCalmont TH. Fillet of FISH. *J Cutan Pathol.* 2011;38:327–328.
- Nagasaka T, Lai R, Medeiros LJ, et al. Cyclin D1 overexpression in Spitz nevi: an immunohistochemical study. *Am J Dermatopathol.* 1999;21:115–120.
- Nasr MR, El-Zammar O. Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol.* 2008;30:117–122.
- Pouryazdanparast P, Newman M, Mafee M, et al. Distinguishing epithelioid blue nevus from blue nevus-like cutaneous melanoma metastasis using fluorescence in situ hybridization. *Am J Surg Pathol.* 2009;33:1396–1400.
- Reed RJ, Ichinose H, Clark WH Jr., et al. Common and uncommon melanocytic nevi and borderline melanomas. *Semin Oncol.* 1975;2:119–147.
- Reed JA, Loganzo F Jr, Shea CR, et al. Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res.* 1995;55:2713–2718.
- Requena L, Sanchez YE. Pigmented spindle cell naevus. *Br J Dermatol.* 1990;123:757–763.
- Soto JL, Cabrera CM, Serrano S, et al. Mutation analysis of genes that control the G1/S cell cycle in melanoma: TP53, CDKN1A, CDKN2A, and CDKN2B. *BMC Cancer.* 2005;5:36.
- Straume O, Sviland L, Akslen LA. Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res.* 2000;6:1845–1853.

## **IV. Segon treball**



## Segon treball

### ***TERT* and *AURKA* gene copy number gains enhance the detection of acral lentiginous melanomas by fluorescence *in situ* hybridization**

Diaz A, Puig-Butillé JA, Valera A, Muñoz C, Costa D, García-Herrera A, Carrera C, Solé F, Malveyh J, Puig S, Alos L

*J Mol Diagn* 2014; 16: 198-206

L'estudi de locus cromosòmics específics mitjançant FISH s'ha demostrat útil en el diagnòstic diferencial d'alguns tumors melanocítics. Tanmateix s'han assolit diferents índex de sensibilitat segons el context estudiat, probablement com a conseqüència de l'heterogeneïtat que mostren els melanomes a nivell molecular. Els melanomes lentiginosos acrals es caracteritzen per mostrar guanys en el número de còpies de petites regions gèniques, com per exemple els gens *CCND1*, *TERT* i *AURKA*. En una sèrie de 58 lesions melanocítiques acrals vàrem estudiar el valor potencial de la sonda de FISH multicolor en el seu diagnòstic diferencial, conjuntament amb l'estudi del gen *MYC* i de noves sondes desenvolupades, específiques per als gens *TERT* i *AURKA*. Tanmateix vam estudiar l'expressió proteica de *CCND1*, *TERT* i *AURKA* mitjançant immunohistoquímica. La sonda multicolor detectava el 83.5% dels melanomes acrals mentre que un 29.4% d'ells mostraven guanys en el número de còpies de *TERT* i *AURKA*. Quan es combinaven els resultats de totes les sondes s'assolia una sensibilitat del 97% (IC, 82.9% a 99.8%). No es van detectar guanys en el número de còpies del gen *MYC* en cap cas. Cap nevus mostrava alteracions per FISH. L'estudi immunohistoquímic va mostrar un major percentatge de cèl·lules positives per a *CCND1*, *TERT* i *AURKA* en els melanomes acrals en comparació amb els nevus ( $P \leq 0.001$ ). A més, es va detectar una correlació significativament positiva entre els guanys en el número de còpies del gen *CCND1* i la seva expressió proteica ( $P=0.015$ ). Aquests resultats indicarien que el fet d'afegir sondes de FISH específiques per als gens *TERT* i *AURKA* a l'actual sonda multicolor podria millorar la sensibilitat en el diagnòstic dels melanomes acrals.

## ***Segon treball***



## TERT and AURKA Gene Copy Number Gains Enhance the Detection of Acral Lentiginous Melanomas by Fluorescence *in Situ* Hybridization

Alba Diaz,\* Joan Anton Puig-Butillé,<sup>††</sup> Alexandra Valera,\* Concha Muñoz,\* Dolors Costa,\* Adriana Garcia-Herrera,\* Cristina Carrera,<sup>‡§</sup> Francesc Sole,<sup>¶</sup> Josep Malvehy,<sup>‡§</sup> Susana Puig,<sup>‡§</sup> and Lluçia Alos\*

From the Departments of Pathology,\* Biochemical and Molecular Genetics,<sup>†</sup> and Dermatology,<sup>§</sup> Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona; the Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER),<sup>‡</sup> the Carlos III Institute of Health (ISCIII), Barcelona; and the Joseph Carreras Institute for Research against Leukemia,<sup>¶</sup> Hospital "Germans Trias i Pujol", Autonomous University of Barcelona, Barcelona, Spain

Accepted for publication  
October 25, 2013.

Address correspondence to  
Lluçia Alos, M.D., Department  
of Pathology, Hospital Clínic,  
Villarroel 170, Barcelona,  
Spain. E-mail: lallos@clinic.ub.  
es.

The study of specific chromosomal loci through fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is useful in differential diagnosis of melanocytic tumors. However, sensitivity rates vary, probably because of molecular heterogeneity. Acral lentiginous melanomas are characterized by copy number gains of small genomic regions, including *CCND1*, *TERT*, and *AURKA*. In a series of 58 acral melanocytic lesions, we explored the value of a four-color FISH probe, used in addition to determining *MYC* gene status, and assessed the potential diagnostic usefulness of newly developed probes targeting *TERT* and *AURKA*. Moreover, we tested *CCND1*, *TERT*, and *AURKA* protein expression by immunohistochemistry. The four-color FISH probe detected 85.3% of melanomas and 29.4% of *TERT* and *AURKA* copy number gains. Sensitivity was 97% (confidence interval 95%, 82.9% to 99.8%) for the combined results of all probes. No *MYC* copy number gains were detected. No nevi showed aberrations. Immunohistochemistry revealed a higher percentage of cells positive for *CCND1*, *TERT*, and *AURKA* protein in melanomas than in nevi ( $P \leq 0.001$ ). A significant correlation between gene copy number gain and protein expression was found for *CCND1* ( $P = 0.015$ ). Our results indicate that addition of specific FISH probes to the current probe could improve sensitivity for the diagnosis of acral melanomas. Further studies in larger numbers of cases are needed to validate these results. (*J Mol Diagn* 2014, 16: 198–206; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.10.009>)

Histopathological evaluation is the gold standard in differentiating benign from malignant melanocytic lesions. Nonetheless, its subjectivity and other limitations are widely accepted, and a number of cases cannot easily be classified as benign or malignant based only on histopathological evaluation.<sup>1</sup> In recent years, investigations on melanocytic tumors have been focused on identifying gene alterations that can help to differentiate benign from malignant melanocytic tumors. Comparative genomic hybridization studies have demonstrated that benign and malignant melanocytic tumors differ dramatically in the presence of numerous chromosomal aberrations.<sup>2</sup> Based on such results, a commercially available four-color fluorescence *in situ* hybridization (FISH) multiple probe targeting 6p25 (*RREB1*), 6q23 (*MYB*), 11q13

(*CCND1*), and centromere 6 (CEP6) was recently developed to assist in differentiating several problematic melanocytic lesions.<sup>3</sup> This FISH probe, which has been tested in a variety of clinicopathological settings, has proven useful in increasing sensitivity and specificity in the differential diagnosis between benign nevi and melanomas. However, results have differed, mainly depending on the melanocytic lesion

Supported in part by a grant from Hospital Clínic de Barcelona (Ajut a la recerca "Josep Font") (A.D.) and by grants from the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain (PI 11/02010); Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC, FEDER) (RD12/0036/0044), Fundación Española de Hematología y Hemoterapia; INBIOMED HEMA-001/2006, and Obra Social La Caixa-Fundació Carreras (F.S.).

Disclosures: None declared.

Copyright © 2014 American Society for Investigative Pathology  
and the Association for Molecular Pathology.  
Published by Elsevier Inc. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.10.009>

subtype.<sup>4–8</sup> Increasing evidence suggests that melanomas are heterogeneous at the molecular level and that specific tumor subtypes may harbor distinct genomic alterations.<sup>9</sup> In this sense, a broader probe set incorporating 8q24 (*MYC*) and 9p21 (*CDKN2A*) probes has been recently proposed to enhance the detection of melanomas, including the Spitzoid types.<sup>10</sup>

Acral lentiginous melanoma (ALM), one of the four major histopathological melanoma subtypes recognized in the current World Health Organization classification,<sup>11</sup> has distinctive clinicopathological and molecular characteristics. It frequently harbors multiple and distinctive chromosomal aberrations, mainly gene copy number gains of small genomic regions such as the *CCND1*, *TERT*, and *AURKA* genes.<sup>2,9,12–15</sup> Its low incidence in populations of European continental origin might render difficult any deeply clinicopathological and molecular characterization. To date, few cases of ALMs or acral nevi (AN) have been studied with the new multiprobe FISH set.<sup>6,10,16,17</sup> Furthermore, from the standpoint of daily practice, acral pigmented lesions may exhibit site-related atypical features that could hamper differentiation of benign from malignant tumors.<sup>18</sup>

*TERT*, at 5p15.33, encodes for the catalytic subunit of telomerase reverse transcriptase, which stabilizes telomeric length. *TERT* up-regulation enhances cellular proliferation and plays a critical role in oncogenesis.<sup>19</sup> *AURKA*, at 20q13, encodes for aurora kinase A, a cell cycle-regulated kinase that is involved mainly in centrosome function and spindle assembly during chromosome segregation; its dysregulation leads to genetic instability and aneuploidy.<sup>20</sup>

We studied a series of 58 acral melanocytic lesions, comprising both benign and malignant tumors, and we explored the usefulness of the currently available four-color FISH probe, together with *MYC* gene status, for differential diagnosis. We also evaluated the utility of additional FISH probes targeting *TERT* and *AURKA* genes for enhancing detection of ALM and tested *CCND1*, *TERT*, and *AURKA* protein expression by immunohistochemistry.

## Materials and Methods

A total of 58 formalin-fixed, paraffin-embedded samples of acral melanocytic tumors were collected from 2002 to 2008 from the archives of the Pathology Department at the Hospital Clínic of Barcelona, including 34 invasive ALMs and 24 ANs. Unequivocal diagnosis of ALM or AN was confirmed in a masked manner by two dermatopathologists (A.D. and L.A.). All patients were seen and their cases were monitored at the Melanoma Unit, Department of Dermatology, of the same hospital. Clinical data were retrieved from review of the clinical files. The study was approved by the Institutional Ethics Review Board, and written informed consent was obtained from each participant in accordance with the Declaration of Helsinki.

## Elaboration of FISH Probes Targeting *TERT* and *AURKA*

Noncommercial probes targeting *TERT* and *AURKA* were elaborated using bacterial artificial chromosomes (BACs). BAC clones were obtained from the Children's Hospital Oakland Research Institute (Oakland, CA) collection and were selected using the controlled-access genome browser of the Center for Genomic Regulation, Barcelona, Spain [<http://davinci.crg.es/cgi-gbrowse/gbrowse/hg18>, last accessed May 24, 2012 (login required)]. Next, DNA was labeled using a nick translation kit (Abbott Molecular, North Chicago, IL) with SpectrumGreen or SpectrumRed (Abbott Molecular). For *AURKA*, a centromeric probe was added (CEP20), labeled with SpectrumOrange (Abbott Molecular). For *TERT*, another BAC probe, located on 5q15 (*MCTP1*), was developed to be used as whole-chromosome copy number control. The gene locus, the BACs, and the labeling fluorochrome are listed in Table 1. Finally, all probes were hybridized to normal metaphase chromosomes, to verify their location, and to normal skin controls, to obtain the normal pattern of hybridization (two signals on average for each probe).

## FISH Analysis

All cases were analyzed with the commercially available four-color probe set targeting the ras responsive element binding protein 1 gene (*RREB1*) on 6p25, the v-myc avian myeloblastosis viral oncogene homolog gene (*MYB*) on 6q23, the cyclin D1 gene (*CCND1*) on 11q13, and the chromosome 6 centromeric region (Abbott Molecular, Des Plaines, IL). Additionally, cases were hybridized with the commercially available probes Vysis LSI Cyclin D1/CEP 11 (Abbott Molecular) and a Dako *MYC/CEN-8* FISH probe mix (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), which contain fluorescently labeled gene and centromere probes, and with noncommercial probes targeting *TERT* and *AURKA*. From each formalin-fixed, paraffin-embedded sample block, 4- $\mu$ m-thick sections were mounted onto positively charged slides (SuperFrost Plus; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), deparaffinized, and dehydrated. Next, pretreatment and pepsin digestion (3 minutes) was performed, followed by dehydration in 70%, 85%, and 96% ethanol for 2 minutes each. The slides were then incubated in a Dako hybridizer (S2450; Agilent Technologies) for denaturation at 90°C for 5 minutes and hybridization at 37°C for approximately 18 hours. Sections were placed in washing buffer at room

**Table 1** Elaborated FISH Probes from BACs and Fluorochromes Used to Visualize the Specific Gene

Gene	Locus	BAC	Fluorochrome
<i>TERT</i>	5p15.33	RP11-117B23	SpectrumGreen
<i>MCTP1</i> *	5q15	RP11-73K22	SpectrumRed
<i>AURKA</i>	20q13	RP11-158017	SpectrumGreen

\*The gene *MCTP1*, located on 5q15, was used as chromosome 5 copy number control, instead of a centromeric probe.

temperature for 2 to 10 minutes to remove the coverslips, immersed in stringency buffer at 65°C for 10 minutes, and then were dehydrated, dried, and counterstained with DAPI.

### Enumeration of FISH Signals

FISH evaluation was performed using an Eclipse 50i epifluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan; Melville, NY) equipped with appropriate single band-pass filter sets (Abbott Molecular). First, each sample was examined at low-power magnification, to select areas with abnormal copy number. Next,  $\geq 20$  adjacent nuclei from three different areas were enumerated (for a total of  $\geq 60$  cells) under high-power magnification ( $\times 400$ ). Overlapping nuclei and nuclei with less than two signals were not counted. Moreover, if  $< 60$  nuclei could be evaluated or if nuclei did not show signals for all probes, the case was excluded. For the four-color commercial probe set, a sample was considered as having a positive FISH result if any of the following criteria were met: i) gain in 6p25 (*RREB1*) relative to CEP6 in  $> 55\%$  of cells or ii) gain in 6p25 (*RREB1*) in  $> 29\%$  of cells, iii) gain in 11q13 (*CCND1*) in  $> 38\%$  of cells, or iv) loss in 6q23 (*MYB*) relative to CEP6 in  $> 40\%$  of cells, according to previously determined cutoffs. For the *MYC/CEN-8* probe, a sample was considered positive if  $\geq 50\%$  of the enumerated melanoma cells harbored copy number gains of *MYC*.<sup>21</sup> For the LSI Cyclin D1/CEP 11 probe and the noncommercial probes, a tumor was considered positive (with copy number gains) if the ratio between gene copy number and centromere copy number was  $\geq 1.5$ . A ratio of  $> 2$  was considered amplification.<sup>22</sup> In 19 ALMs, the *in situ* component was also evaluated.

### Immunohistochemistry

All cases were stained for CCND1 (1:100; clone SP4; Abcam, Cambridge, UK), TERT (1:100; clone Y182; Abcam), and AURKA (1:300; polyclonal; Abcam) using a Bond Max automated instrument (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) with a Bond Polymer Refine Red Detection system (Leica Microsystems). Appropriate positive and negative controls were used for each antibody.

The percentage of positive cells was recorded semi-quantitatively in each case for cytoplasmic (TERT and AURKA) or nuclear (CCND1, TERT, and AURKA) staining.

### Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using PASW Statistics version 18 (SPSS, Chicago, IL). Associations between variables were performed with use of the exact Fisher test. Quantitative data were compared between groups using either a Student's *t*-test (for variables with a normal distribution) or a *U*-test (for variables without a normal distribution). Pearson correlations were performed on quantitative data. To determine the specificity and sensitivity of FISH, histopathology was considered the gold standard and the 95% confidence

intervals (CIs) of sensitivity and specificity were calculated using the publicly available VassarStats Clinical Calculator 1 (<http://www.vassarstats.net/clin1.html>, last accessed October 23, 2013), which uses the Wilson score method. The results were considered statistically significant at  $P \leq 0.05$  (two-sided).

## Results

### Clinicopathological Characteristics of Patients

The main clinicopathological characteristics of the patients with ALMs are listed in Table 2. The 34 patients were 17 men and 17 women (male-to-female ratio, 1:1); the median age was 67 years (range, 39 to 91 years). The tumor occurred on the feet in 30 of 34 patients (88%) and on the hands in 4 of 34 patients (12%). The median Breslow thickness was 3.8 mm (range, 0.4 to 12 mm). The Clark level was II in 2/34

**Table 2** Main Clinicopathological Characteristics of Patients with ALM

Case no.	Age (years)	Sex	Site	Clark level	Breslow thickness (mm)
1	61	M	Sole	V	12
2	76	F	Sole	IV	5
3	49	F	Sole	V	6
4	89	F	Heel	IV	3.2
5	67	M	Ring finger	III	0.7
6	68	F	Sole	IV	0.9
7	82	F	Sole	IV	6
8	58	M	Sole	V	4.5
9	87	F	Heel	V	10
10	51	F	Sole	V	4.6
11	58	M	Palm	V	8
12	54	M	Sole	V	12
13	67	M	Heel	V	6.5
14	91	F	Heel	IV	2
15	71	F	Palm	IV	1.4
16	83	M	Sole	II	0.9
17	58	M	Index finger	IV	1
18	74	M	Great toe	II	0.4
19	63	M	Sole	III	1
20	78	F	Heel	IV	3
21	74	F	Heel	III	1
22	77	M	Sole	IV	4
23	78	F	Sole	IV	3
24	39	M	Sole	IV	2
25	40	M	Sole	V	2
26	61	M	Great toe	III	0.5
27	75	F	Heel	IV	5
28	60	M	Sole	IV	2
29	73	M	Sole	IV	3.3
30	90	F	Sole	IV	5
31	66	F	Sole	IV	1.2
32	45	M	Heel	IV	5
33	58	F	Heel	IV	3.5
34	83	F	Sole	IV	2.8

M, male; F, female.



lesions (6%), III in 4/34 lesions (12%), IV in 19/34 lesions (56%), and V in 9/34 lesions (26.5%). Ulceration was present in 18 of 34 cases (53%), and the median mitotic count was 4/mm<sup>2</sup> (range, 0 to 18 mitoses).

The 24 patients with AN were 10 men and 14 women (male-to-female ratio, 1:1.4); the median age was 37 years (range, 16 to 64 years). Most of the lesions (22 of 24; 91%) occurred on the feet; histologically, the lesions were mostly compound (21 of 24; 87.5%).

### FISH Results

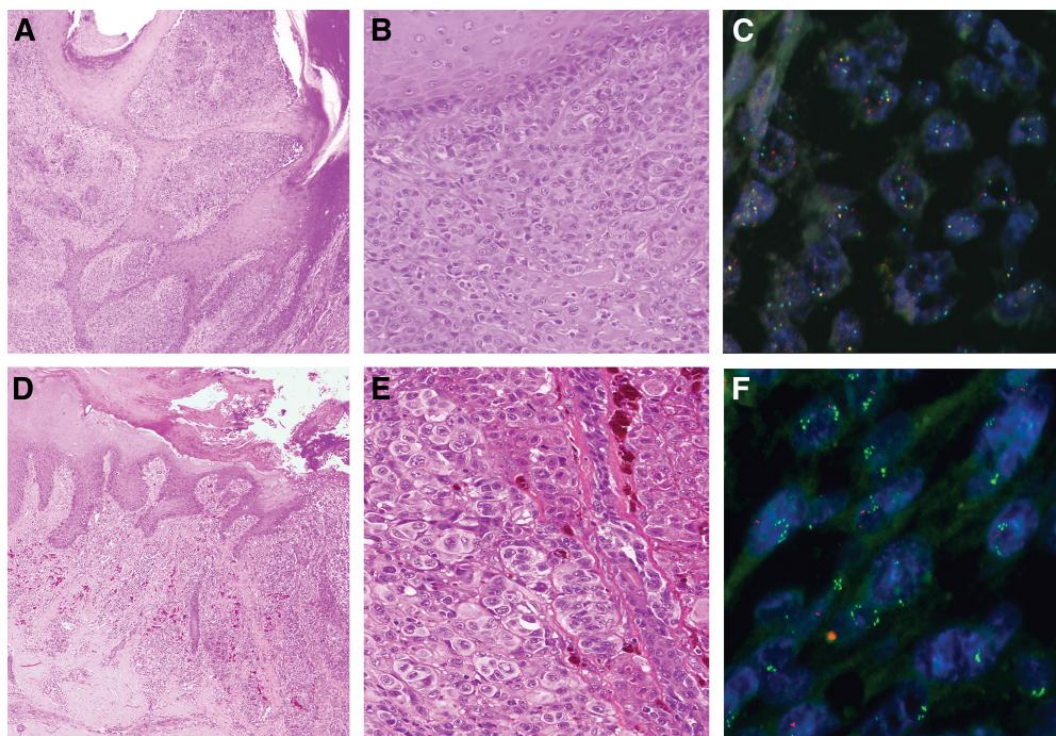
FISH data for the ALMs are summarized in Table 3. Overall, 29 of the 34 ALMs had a positive result when evaluated using the commercial FISH multiprobe set, resulting in a sensitivity of 85.3% (95% CI, 68.2%–94.4%). The *RREB1* gain criterion was the most sensitive, observed

in 25 of 34 cases (74%); 20 of 34 cases (59%) met the *RREB1*/CEP6 gain criterion, 14 of 34 (41%) met the *MYB*/CEP6 loss criterion (Figure 1), and 8 of 34 (24%) met the *CCND1* gain criterion. *CCND1* gains were confirmed in all cases with the commercial probe LSI Cyclin D1/CEP 11, which showed that all were gene amplifications [median *CCND1*/CEP11 ratio, 4.16 (range, 2.18 to 5.10)]. With the noncommercial probes, 10 of 34 tumors (29%) gave positive results. *TERT* copy number gains were present in 8 of 34 cases (24%), and in 6 of these 8 cases there were gene amplifications (average ratio of >2 (Figure 1)). *AURKA* copy number gains were seen in 2 of 34 cases (6%). *CCND1*, *TERT*, and *AURKA* gains were mutually exclusive. No *MYC* copy number gains were detected in any case. With results of all probes combined, FISH had a positive result in 33 of 34 ALMs, for an overall sensitivity of 97% (95% CI, 82.9%–99.8%).

**Table 3** FISH Results for ALM Cases

Case no.	Cells with gain or loss (%)				Copy number ratio	
	<i>RREB1</i> gain	<i>RREB1</i> gain relative to CEP6	<i>CCND1</i> gain	<i>MYB</i> loss relative to CEP6	<i>TERT</i> / <i>MCTP1</i>	<i>AURKA</i> /CEP20
1	76	70	20	26	1.02	1.66
2	93	83	93	10	0.96	0.93
3	46	53	16	20	1.61	1.02
4	10	10	13	70	0.98	1.07
5	20	30	16	10	2.58	1.18
6	66	60	10	3	1.03	0.96
7	80	60	53	43	1.16	1.23
8	60	40	3	43	1.02	0.96
9	36	33	80	70	0.96	1.09
10	86	66	10	56	1.01	1.00
11	16	10	10	50	4.50	1.07
12	46	56	13	26	4.81	1.06
13	93	83	100	83	1.24	1.13
14	80	53	3	50	1.02	0.95
15	90	56	6	56	1.18	1.06
16	10	16	10	16	3.10	0.98
17	70	50	3	20	0.96	1.10
18	16	16	13	20	1.00	0.91
19	70	76	93	66	0.94	1.02
20	80	80	26	16	1.03	1.00
21	80	76	3	6	1.02	1.03
22	70	60	20	30	1.88	1.00
23	10	6	20	50	1.00	1.33
24	66	60	13	16	0.91	0.98
25	16	10	0	16	4.16	1.00
26	80	76	90	60	1.23	1.02
27	96	90	96	10	0.98	1.18
28	90	90	13	10	1.02	1.33
29	70	50	16	13	0.91	0.98
30	16	16	6	10	0.98	2.24
31	53	73	3	10	1.13	0.98
32	66	66	20	26	2.49	1.05
33	10	10	13	60	1.08	0.93
34	93	90	100	46	0.93	0.93

Values that met the criteria for a positive FISH result are highlighted in bold.



**Figure 1** Two examples of ALMs showing different gene alterations by FISH. **A:** A large nonpigmented melanocytic tumor arising on acral skin, with marked associated acanthosis and elongated rete ridges. Case 4. H&E stain. **B:** The same lesion at a higher magnification. Melanocytes in the dermis are predominantly epithelioid and show moderate atypia. A lentiginous proliferation of malignant melanocytes in the dermal–epidermal junction is also evident. H&E stain. **C:** FISH image from the same case shows *MYB* loss (gold signal) relative to *CEP6* (aqua signal) with the commercial four-color probe set. **D:** An ulcerated ALM arising in the sole of a 40-year-old man, with moderate pigmentation. Case 25. H&E stain. **E:** The same lesion at a higher magnification. Nests of malignant melanocytes with marked pleomorphism. H&E stain. **F:** FISH image from the same case shows *TERT* amplification (green signal) relative to the control gene *MCTP1* (red signal). Original magnification:  $\times 40$  (A and D);  $\times 200$  (B and E);  $\times 1000$  (C);  $\times 2000$  (F).

We also evaluated the presence of gene copy number alterations in the *in situ* component of ALMs, which could be assessed confidently in 19 of the 34 cases. In all of these 19 cases, we found *RREB1*, *TERT*, and *CCND1* gene copy number gains in the *in situ* portion, at levels similar to those in the invasive portion (Figure 2). In addition, in 5 of the 34 cases *CCND1* and *TERT* gene copy number gains were also visualized in scattered cells on the basal layer of histologically normal-appearing skin beyond the *in situ* component.

None of the 24 ANs showed any significant copy number changes in any of the targeted genes (Figure 3), resulting in an overall specificity of 100% (95% CI, 82.8%–100%).

### Correlation of FISH Results with Clinicopathological Characteristics

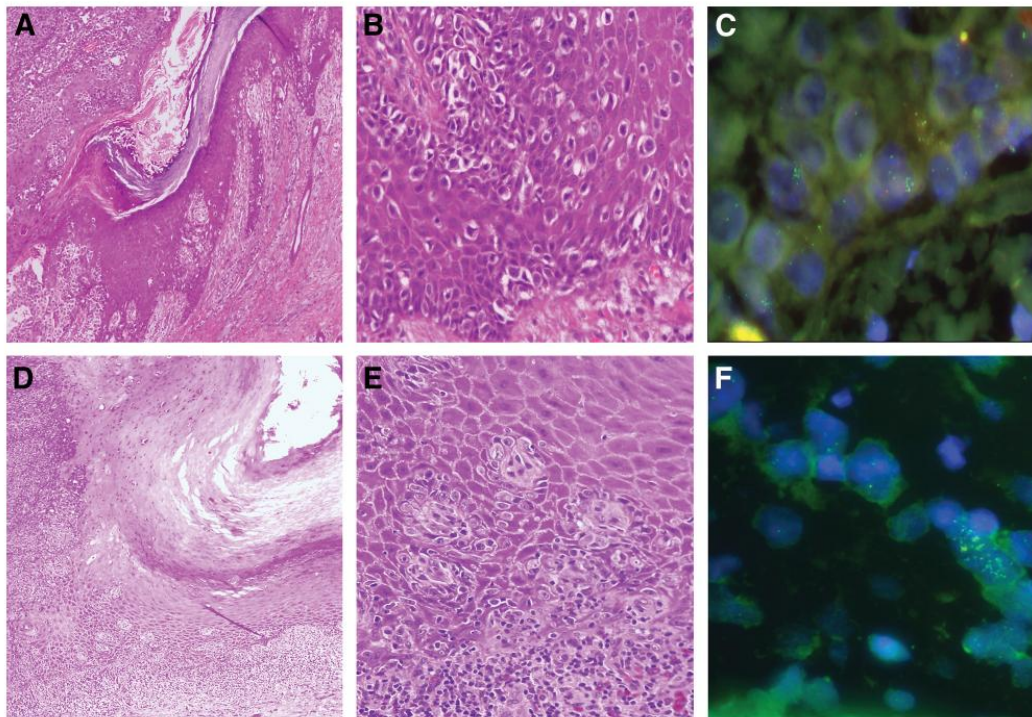
Comparison of clinicopathological characteristics of patients with melanomas harboring *CCND1*, *TERT*, and *AURKA* copy number gains revealed no differences among the three groups. In addition, no histological differences

were found in tumor thickness, ulceration, mitotic rate, tumor cell type, amount of pigmentation, or presence of tumor-infiltrating lymphocytes among the three groups of melanomas.

### Immunohistochemistry Results and Correlation with FISH

Immunohistochemical data are summarized in Table 4. In ALMs, a significantly higher percentage of cells were positive for nuclear *CCND1*, *TERT*, and *AURKA*, compared with ANs. Moreover, ANs exhibited a decreasing *CCND1* immunopositivity in deep portions of the tumor, whereas ALMs exhibited a more homogeneous distribution of *CCND1* immunopositivity. *TERT* and *AURKA* nuclear immunoreactivity did not exhibit any particular distribution pattern. All lesions (both ALM and AN) exhibited *TERT* and *AURKA* cytoplasmic positivity in nearly 100% of cells.

A significantly higher percentage of cells were positive for *CCND1* by immunohistochemistry in ALMs harboring



**Figure 2** Two examples of ALMs in which chromosomal aberrations were detected also in the *in situ* portion by FISH. **A:** An ALM arising in the palm of a 58-year-old man shows a marked lentiginous proliferation pattern at the dermal–epidermal junction. Case 11. H&E stain. **B:** High-power magnification highlights the typical lentiginous proliferation of atypical melanocytes at the border of the tumor. H&E stain. **C:** In a FISH image from the same case, large nuclei at the dermal–epidermal junction show *TERT* amplification (green signal) relative to the control gene *MCTP1* (red signal). **D** and **E:** Histological section of another ALM (Case 27) shows marked epidermal acanthosis (**D**) and a continuous proliferation of atypical melanocytes adopting a lentiginous pattern (**E**). H&E stain. **F:** A FISH image from the same case shows amplification of *CCND1* (green signal) in the invasive portion, which was also detected in scattered large nuclei at the dermal–epidermal junction. Original magnification:  $\times 40$  (**A** and **D**);  $\times 200$  (**B** and **E**);  $\times 1000$  (**C** and **F**).

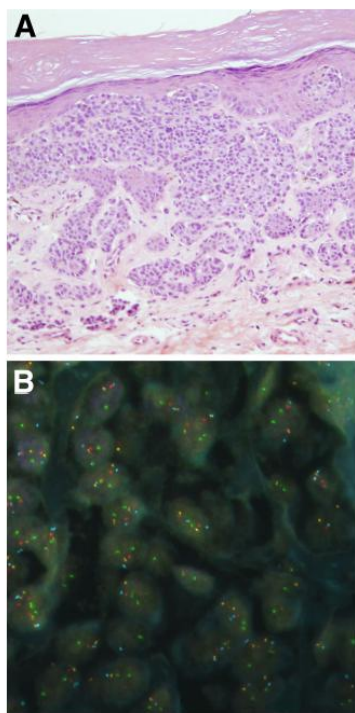
*CCND1* gains [median, 75% (range, 50% to 95%)], compared with ALMs without *CCND1* gain [median, 45% (range, 30% to 80%)] ( $P = 0.002$ ) (Figure 4). Moreover, in ALMs with *CCND1* gains, a positive significant correlation was found between the percentage of nuclear positive cells and the average number of *CCND1* signals ( $\rho = 0.90$ ,  $P = 0.015$ ). No correlation was found between *TERT* or *AURKA* gene copy number gains and the respective protein expression.

## Discussion

ALMs are characterized by frequent gene copy number gains, and we have detected two genes related to oncogenesis that can show increased copy numbers in ALMs: *TERT* and *AURKA*. In the present study, we have confirmed that these genes do not show copy number gains in any benign AN, so both *TERT* and *AURKA* are promising genes for differentiating malignant from benign acral melanocytic tumors. Moreover, we have tested for the first time a commercially developed four-color FISH assay

in a series of 58 acral melanocytic lesions, including both benign and malignant counterparts; only few acral melanocytic lesions have been included in previous studies.<sup>6,10,16,17</sup> This FISH assay identified 29 of 34 ALMs; for ANs, all FISH findings were negative. These results correlate with a sensitivity of 85.3% (95% CI, 68.2%–94.4%) and a specificity of 100% (95% CI, 82.8%–100%), similar to rates in previous studies. However, sensitivity rates for this FISH probe have varied, ranging from 40% to 100%, depending mainly on the melanoma subtype.<sup>4–8</sup> When we added exploration for *TERT* and *AURKA* genes in our series, four of the five ALMs with negative results using the commercial four-color probe set showed amplifications. No nevi showed any alterations. Thus, including *TERT* and *AURKA* increased the sensitivity in differentiating ALM from AN to 97% (95% CI, 82.9%–99.8%) and maintained the specificity of 100% (95% CI, 82.8%–100%).

In our series, *CCND1*, *TERT*, and *AURKA* gene copy number gains were mutually exclusive. In a previous study, however, 11q13 and 5p15 amplifications were concurrently



**Figure 3** Example of an AN. **A:** Low-power magnification reveals non-atypical melanocytic proliferation, with evident maturation. H&E stain. **B:** A FISH image from the same case, hybridized with the commercial four-color probe set, illustrates a normal chromosomal profile. Original magnification:  $\times 40$  (A);  $\times 1000$  (B).

detected in the invasive portion of a few ALMs.<sup>14</sup> The 6p25 (*RREB1*) gain was the most frequent gene alteration in our series of ALMs; it was detected in 74% of cases, which is in accord with previously published studies on nonacral melanomas. The second most frequent gene alteration was 6q23 (*MYB*) loss, detected in 41% of cases. This finding supports the presence of a chromosome 6 imbalance as a very common event in the vast majority of melanomas,<sup>6</sup> including ALMs. *CCND1* and *TERT* copy number gains were both detected in an equal proportion of cases (24%), and *AURKA* copy number gains were detected in 6% of cases.

The 11q13 (*CCND1*) region amplification, which was first detected by comparative genomic hybridization, is considered a common and distinct event in ALM.<sup>12</sup> This finding

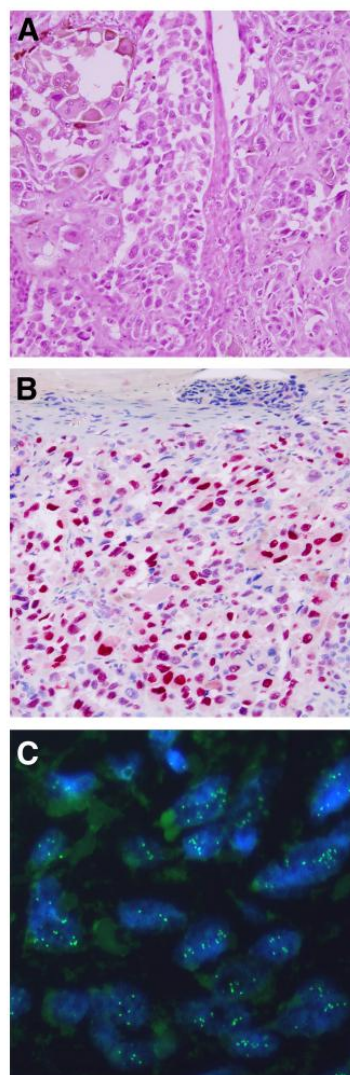
**Table 4** Immunohistochemical Results of ALM and AN

Protein	Nuclear positive cells [mean % (range)]		P
	ALM	AN	
CCND1	57.35 (30–95)	19.58 (5–40)	<0.001*
TERT	4.24 (0–20)	0.92 (0–10)	<0.001†
AURKA	2.65 (0–15)	0.50 (0–5)	0.001*

\*U-test.

†Student's t-test.

was subsequently supported by other studies, although the frequency of *CCND1* gene amplification in ALMs varies, ranging from 23% to 44%,<sup>23–25</sup> which is in accord with our findings. The variability in amplification rates could be accounted for by the different techniques and cutoffs used in its assessment. Puig-Butille et al,<sup>15</sup> using multiplex ligation-dependent probe amplification methodology on frozen samples, found a higher proportion of ALM cases with increased *CCND1*, *TERT*, and *AURKA* gene copy number 15. This discrepancy with our present results, based on FISH methodology on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue, could



**Figure 4** Example of an ALM with *CCND1* alteration (Case 9). **A:** Histology. H&E stain. **B:** Immunohistochemistry reveals *CCND1* protein overexpression. **C:** FISH analysis reveals *CCND1* gene (green signals) amplification. Original magnification:  $\times 200$  (A and B);  $\times 1000$  (C).

be accounted for by differences in techniques, cutoffs, and types of samples. Moreover, the low number of cases studied in this study is a major limitation.

Wang et al<sup>26</sup> recently showed that array-based comparative genomic hybridization has a higher sensitivity than FISH for detecting malignant melanomas, but correlation between the two techniques was good. Moreover, they suggest that the exploration of additional genes along with the commercial four-color FISH probe set enhances detection of melanoma,<sup>26</sup> which is in accord with our findings. *MYC*, located at 8q24, shows copy number gains in a subset of melanomas with distinctive clinicopathological characteristics,<sup>21</sup> and detection of *MYC* has recently been added to improve the differential diagnosis between malignant melanoma and nevi.<sup>10</sup> We, however, did not detect an increase in *MYC* copy number in any ALM, consistent with a previous FISH study involving a large number of melanomas from different anatomical sites, including 23 ALMs.<sup>23</sup>

In most cancers, including melanoma, gene amplifications have been linked to tumor progression, because they frequently occur at the later stages.<sup>27</sup> In contrast, and in accord with previous studies,<sup>12,28</sup> we detected similar levels of gene copy number gains, mainly amplifications, in ALMs in both the invasive and the *in situ* components. This suggests that gene amplifications might arise very early during tumorigenesis in this melanoma subset. Furthermore, we also identified *CCND1* and *TERT* gene copy number gains in isolated cells lying on histologically normal-appearing skin, far from the invasive and *in situ* portions. This particular finding has already been described for some genes, including *CCND1* and *TERT* in ALMs. Such cells have been referred to as *field cells*. It has been suggested that these field cells arise even before the phase of melanoma *in situ*, representing clonally related melanocytes in the seemingly nonlesional epidermis, and that they could explain local recurrences that take place even after an apparently complete melanoma excision.<sup>12,14</sup> This finding points to a distinctive biological behavior in ALMs.

*CCND1* is a proto-oncogene encoding cyclin D1, which plays an important role in the progression from the G1 to S phase and cell proliferation. Its amplification might alter cell cycle progression, thus contributing to tumorigenesis.<sup>29</sup> *TERT* encodes for the catalytic subunit of telomerase reverse transcriptase, which stabilizes telomeric length, which is essential for cellular proliferation. Increased telomerase activity has been reported in a majority of human tumor types, suggesting that telomeric stability maintenance plays a critical role in oncogenesis.<sup>19</sup> The existence of amplifications of these two genes in the earlier stages of ALM would represent severe genomic instability, thus clearly contributing to ALM oncogenesis.

In the present study, a significant correlation between gene copy number gains and protein overexpression was found only for *CCND1*. However, half of the ALMs without *CCND1* gene copy number gains also showed *CCND1* overexpression of *CCND1* protein. Protein overexpression of

cyclins is not always caused by gene amplification; other mechanisms could be involved in its post-transcriptional regulation, including translocations<sup>30</sup> or mutations in upstream genes of the mitogen-activated protein kinase pathway.<sup>9</sup> Additionally, *CCND1* expression was significantly lower in nevi than in melanomas. The literature yields conflicting data on *CCND1* expression in melanocytic tumors. Some studies have shown no differences in *CCND1* expression between benign and malignant lesions, but others have demonstrated clear *CCND1* overexpression in melanomas.<sup>5,31,32</sup> Interestingly, we also found a different *CCND1* expression pattern between nevi and melanomas. Nevi showed a clear zonal pattern, with a higher proportion of immunopositive cells near the dermal–epidermal junction, in accord with previous studies,<sup>32,33</sup> whereas melanomas showed a homogeneous pattern of immunostaining. We also observed a significantly higher expression of nuclear *TERT* and *AURKA* in melanomas than in nevi; however, expression was very low in both groups, and some nevi showed higher expression than some melanomas, which limits usefulness for differential diagnosis.

In conclusion, we have shown that the addition of FISH probes including *TERT* and *AURKA* genes to the commercial four-color probe set could improve sensitivity for the diagnosis of ALM, while maintaining 100% specificity. Future efforts should be focused on validating these results by the analysis of larger series, including histopathologically ambiguous lesions.

## Acknowledgments

We thank Elena Gonzalvo for performing the technical procedures and Marta Sánchez for secretarial assistance.

## References

1. Cerroni L, Bamhill R, Elder D, Gottlieb G, Heenan P, Kutzner H, LeBoit PE, Mihm M Jr., Rosai J, Kerl H: Melanocytic tumors of uncertain malignant potential: results of a tutorial held at the XXIX Symposium of the International Society of Dermatopathology in Graz, October 2008. *Am J Surg Pathol* 2010, 34:314–326
2. Bastian BC, Olshen AB, LeBoit PE, Pinkel D: Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol* 2003, 163:1765–1770
3. Gerami P, Jewell SS, Morrison LE, Blondin B, Schulz J, Ruffalo T, Matushek P, Legator M, Jacobson K, Dalton SR, Charzan S, Kolaitis NA, Guitart J, Lertsbarapa T, Boone S, LeBoit PE, Bastian BC: Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma [Erratum appeared in *Am J Surg Pathol* 2010, 34:688]. *Am J Surg Pathol* 2009, 33:1146–1156
4. Dalton SR, Gerami P, Kolaitis NA, Charzan S, Werling R, LeBoit PE, Bastian BC: Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to distinguish intranodal nevus from metastatic melanoma. *Am J Surg Pathol* 2010, 34:231–237
5. Díaz A, Valera A, Carrera C, Hakim S, Aguilera P, García A, Palou J, Puig S, Malveyh J, Alos L: Pigmented spindle cell nevus: clues for differentiating it from spindle cell malignant melanoma. A comprehensive survey including clinicopathologic, immunohistochemical, and FISH studies. *Am J Surg Pathol* 2011, 35:1733–1742

6. Gerami P, Mafee M, Lurtsbarapa T, Guitart J, Haghighat Z, Newman M: Sensitivity of fluorescence in situ hybridization for melanoma diagnosis using RREB1, MYB, Cep6, and 11q13 probes in melanoma subtypes. *Arch Dermatol* 2010, 146:273–278
7. Kutzner H, Metzler G, Argenyi Z, Requena L, Palmedo G, Mentzel T, Rutten A, Hantschke M, Paredes BE, Scharer L, Hesse B, El-Shabrawi-Caelen L, Fried I, Kerl H, Lorenzo C, Murali R, Wiesner T: Histological and genetic evidence for a variant of superficial spreading melanoma composed predominantly of large nests. *Mod Pathol* 2012, 25:838–845
8. Newman MD, Mirzabeigi M, Gerami P: Chromosomal copy number changes supporting the classification of lentiginous junctional melanoma of the elderly as a subtype of melanoma. *Mod Pathol* 2009, 22:1258–1262
9. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, Cho KH, Aiba S, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D, Bastian BC: Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005, 353:2135–2147
10. Gerami P, Li G, Pouryazdanparast P, Blondin B, Beilfuss B, Slenk C, Du J, Guitart J, Jewell S, Pestova K: A highly specific and discriminatory FISH assay for distinguishing between benign and malignant melanocytic neoplasms. *Am J Surg Pathol* 2012, 36:808–817
11. Tokura Y, Bastian BC, Duncan L: *Acral-lentiginous melanoma. Pathology and Genetics of Skin Tumours*. Edited by PE LeBoit, G Burg, D Weedon, A Sarasain. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, IARC Press, 2006, pp 73–75
12. Bastian BC, Kashani-Sabet M, Hamm H, Godfrey T, Moore DH 2nd, Bröcker EB, LeBoit PE, Pinkel D: Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res* 2000, 60:1968–1973
13. Bastian BC, LeBoit PE, Hamm H, Bröcker EB, Pinkel D: Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* 1998, 58:2170–2175
14. North JP, Kageshita T, Pinkel D, LeBoit PE, Bastian BC: Distribution and significance of occult intraepidermal tumor cells surrounding primary melanoma. *J Invest Dermatol* 2008, 128:2024–2030
15. Puig-Butillé JA, Badenas C, Ogbah Z, Carrera C, Aguilera P, Malvey J, Puig S: Genetic alterations in RAS-regulated pathway in acral lentiginous melanoma. *Exp Dermatol* 2013, 22:148–150
16. Gaiser T, Kutzner H, Palmedo G, Siegelin MD, Wiesner T, Bruckner T, Hartschuh W, Enk AH, Becker MR: Classifying ambiguous melanocytic lesions with FISH and correlation with clinical long-term follow up. *Mod Pathol* 2010, 23:413–419
17. Morey AL, Murali R, McCarthy SW, Mann GJ, Scolyer RA: Diagnosis of cutaneous melanocytic tumours by four-colour fluorescence in situ hybridisation. *Pathology* 2009, 41:383–387
18. Hosler GA, Moresi JM, Barrett TL: Nevi with site-related atypia: a review of melanocytic nevi with atypical histologic features based on anatomic site. *J Cutan Pathol* 2008, 35:889–898
19. Shay JW, Wright WE: Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new directions. *Nat Rev Drug Discov* 2006, 5:577–584
20. Fu J, Bian M, Jiang Q, Zhang C: Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res* 2007, 5:1–10
21. Pouryazdanparast P, Cowen DP, Beilfuss BA, Haghighat Z, Guitart J, Rademaker A, Gerami P: Distinctive clinical and histologic features in cutaneous melanoma with copy number gains in 8q24. *Am J Surg Pathol* 2012, 36:253–264
22. Zhu CQ, Cutz JC, Liu N, Lau D, Shepherd FA, Squire JA, Tsao MS: Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2006, 94:1452–1459
23. Glatz-Krieger K, Pache M, Tapia C, Fuchs A, Savic S, Glatz D, Mihatsch M, Meyer P: Anatomic site-specific patterns of gene copy number gains in skin, mucosal, and uveal melanomas detected by fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch* 2006, 449:328–333
24. Sauter ER, Yeo UC, von Stemm A, Zhu W, Litwin S, Tichansky DS, Pistrutto G, Nesbit M, Pinkel D, Herlyn M, Bastian BC: Cyclin D1 is a candidate oncogene in cutaneous melanoma. *Cancer Res* 2002, 62:3200–3206
25. Takata M, Goto Y, Ichii N, Yamaura M, Murata H, Koga H, Fujimoto A, Saida T: Constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in acral melanomas. *J Invest Dermatol* 2005, 125:318–322
26. Wang L, Rao M, Fang Y, Hameed M, Viale A, Busam K, Jhanwar SC: A Genome-wide high-resolution array-CGH analysis of cutaneous melanoma and comparison of array-CGH to FISH in diagnostic evaluation. *J Mol Diagn* 2013, 15:581–591
27. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998, 396:643–649
28. Yamaura M, Takata M, Miyazaki A, Saida T: Specific dermoscopy patterns and amplifications of the cyclin D1 gene to define histopathologically unrecognizable early lesions of acral melanoma in situ. *Arch Dermatol* 2005, 141:1413–1418
29. Musgrove EA, Caldon CE, Barraclough J, Stone A, Sutherland RL: Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* 2011, 11:558–572
30. Bondi J, Husdal A, Bukholm G, Nesland JM, Bakka A, Bukholm IR: Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome. *J Clin Pathol* 2005, 58:509–514
31. Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D: Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 2001, 54:229–235
32. Ramirez JA, Guitart J, Rao MS, Diaz LK: Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. *Ann Diagn Pathol* 2005, 9:185–188
33. Nagasaka T, Lai R, Medeiros LJ, Brynes RK, McCoury A, Harada T, Saddik M: Cyclin D1 overexpression in Spitz nevi: an immunohistochemical study. *Am J Dermatopathol* 1999, 21:115–120



# **V. Tercer treball**





## ***Tercer treball***

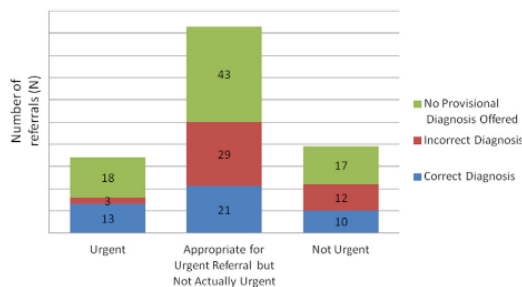
### ***TERT* gene amplification is associated with poor outcome in acral lentiginous melanoma**

Diaz A, Puig-Butillé JA, Muñoz C, Costa D, Díez A, García-Herrera A, Carrera C, Badenas C, Solé F, Malveyh J, Puig S, Alos L

*J Am Acad Dermatol* 2014; 71: 839-841

Les amplificacions gèniques són un mecanisme clau d'activació oncogènica en les neoplàsies. Els melanomes lentiginosos acrals es caracteritzen per mostrar amplificacions en múltiples locus cromosòmics. Prèviament havíem detectat amplificacions en diferents gens lligats amb l'agressivitat tumoral en melanomes lentiginosos acrals com són *CCND1* (localitzat a 11q13) i *TERT* (localitzat a 5p15.33). En aquest treball vàrem estudiar l'estat dels gens *CCND1* i *TERT* mitjançant FISH en una sèrie de 43 melanomes acrals i vàrem correlacionar els resultats amb una sèrie de paràmetres clinicopatològics, incloent l'evolució dels pacients. Les amplificacions de *CCND1* es van detectar en 10 casos (23.3%) mentre que les amplificacions de *TERT* en 9 casos (20.9%). Ambdues amplificacions eren mutualment excloents. L'amplificació de *TERT* s'associava a una pitjor supervivència global, inclús després de realitzar l'anàlisi multivariant (HR=4.63,  $P=0.019$ ). Vam concloure que l'estudi de les amplificacions de *TERT* mitjanant FISH en els melanomes lentiginosos acrals podria ser útil a l'hora d'estratificar pacients amb diferents pronòstics.

## ***Tercer treball***



**Fig 1.** Urgency rating by urgent access clinic attending dermatologist categorized by diagnostic accuracy of referring providers.

( $\chi^2 = 7.712$ , degrees of freedom [df] = 2,  $P = .02$ ) (Fig 1). Urgency level did not affect the proportion of referring providers who offered a diagnosis. ( $\chi^2 = 3.095$ , df = 2,  $P = .212$ ) (Fig 1).

Our findings corroborate previous literature, which has shown that diagnostic accuracy of referrals made by general practitioners to dermatologists is approximately 50%.<sup>1</sup> Our data suggest that in an UAC managed through an electronic referral system, the majority of referrals may be nonurgent in nature. However, recognizing that consultations may be requested to establish a diagnosis or treatment plan outside the scope of training or experience of the referring provider and therefore the initial urgency may be unclear, we designed the study to report on whether dermatologists thought these referrals were appropriate for UAC even if ultimately nonurgent in nature. The majority of the nonurgent referrals fell into this category. Furthermore, this process resulted in improved referrer satisfaction: in an unrelated survey, 71.7% of referring providers in our institution in 2012 agreed that patients were able to obtain timely access to care in dermatology if they thought it was medically necessary compared with 53.9% in 2010 (response rates of 92% and 93%, respectively). Similarly, a recent study found that in one UAC at a large tertiary care center the vast majority of referring providers were satisfied with an UAC model and perceived it to have a significant benefit to patient health.<sup>2</sup>

Limitations of the study include the use of a nonvalidated survey and the generalizability of a single-institution model at a large tertiary referral center.

The establishment of urgent referral clinics appears to be an important potential intervention addressing the mismatch of the supply of and demand for dermatologic expertise. Determining the most appropriate and efficient way to triage these patients is critical, however, to optimally

allocate the scarce resources of urgent appointments, decrease administrative burden for referrers, and minimize the costs of double review of these cases by both nurses and physicians.

Julia Sblyankevich, MD,<sup>a,b</sup> Kristen C. Corey, MD,<sup>c</sup> Marisa K. Garsbick, MD,<sup>d</sup> Ellen K. Rob, MD,<sup>b,e</sup> and Alexandra B. Kimball, MD, MPH<sup>a,b,e</sup>

Clinical Unit for Research Trials and Outcomes in Skin<sup>a</sup> and Department of Dermatology,<sup>b</sup> Massachusetts General Hospital, Boston; Department of Dermatology, University of Massachusetts, Worcester<sup>c</sup>; Department of Dermatology, Weill Cornell Medical College, New York<sup>d</sup>; and Harvard Medical School, Boston<sup>e</sup>

Funding sources: None.

Conflicts of interest: None declared.

Correspondence to: Alexandra B. Kimball, MD, MPH, Department of Dermatology, Massachusetts General Hospital, 50 Staniford St, Suite 240, Boston, MA 02114

E-mail: [harvardskinstudies@partners.org](mailto:harvardskinstudies@partners.org)

#### REFERENCES

1. Stanway A, Oakley A, Rademaker M, Duffill M. Audit of acute referrals to the department of dermatology at Waikato Hospital: comparison with national access criteria for first specialist appointment. *N Z Med J* 2004;117:U849.
2. Rosenbach M, Kagan S, Leventhal S. Dermatology urgent care clinic: a survey of referring physician satisfaction. *J Am Acad Dermatol* 2013;69:1067-9.e1.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2014.05.024>

#### **TERT gene amplification is associated with poor outcome in acral lentiginous melanoma**

*To the Editor:* The current World Health Organization classification of melanocytic tumors recognizes four major melanoma subtypes based on clinicopathologic features but with a very little prognostic relevance. Among them, acral lentiginous melanoma (ALM) has distinct epidemiologic and clinicopathologic features. Studies with comparative genomic hybridization have demonstrated that ALMs are characterized as having a high frequency of amplifications in small genomic regions.<sup>1</sup> Some of these amplifications contain genes involved in oncogenesis and tumor progression, such as cyclin D1 (*CCND1*) at 11q13 and telomerase reverse transcriptase (*TERT*) at 5p15.33.<sup>2</sup>

In a series of 43 formalin-fixed and paraffin-embedded samples of infiltrating ALM, we have studied *CCND1* and *TERT* gene status by fluorescence in situ hybridization (FISH). For *CCND1*, the

**Table I.** Main clinicopathologic and molecular characteristics of the cohort and their relation with overall survival

Characteristics	Value	Log rank P value for OS*
n	43	
Sex, male/female	21/22	.420
Age, years Median (range)	71 (39-95)	.419
Breslow index, mm Median (range)	3.2 (0.4-15)	<b>.003</b>
Ulceration, n (%)	22 (51.2)	<b>.002</b>
Mitosis, rate/mm <sup>2</sup> Median (range)	4 (0-18)	<b>.049</b>
<i>TERT</i> amplifications, n (%)	9 (20.9)	<b>.025</b>
<i>CCND1</i> amplifications, n (%)	10 (23.3)	.894

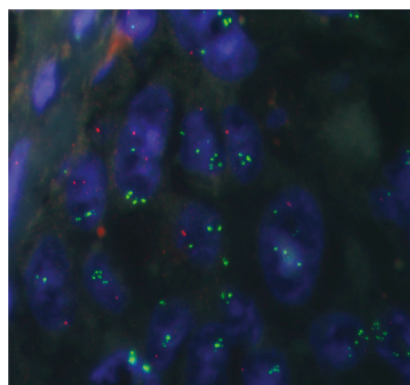
P value in bold if statistically significant.

\*Overall survival.

commercially available probe LSI *Cyclin D1*/CEP 11 (Vysis; Abbott Molecular, Des Plaines, IL) was used. For *TERT*, noncommercial FISH probes using bacterial artificial chromosomes were developed and *MCTP1* gene was used as chromosome control, as previously described.<sup>5</sup> Gene amplifications were considered when the ratio between gene copy number and centromere or chromosome control copy number was greater than 2. FISH results were correlated with clinicopathologic parameters.

The main clinicopathologic features of the cohort collected at diagnosis and their relationship with overall survival (OS) are expressed in Table I. Overall, the median follow-up period was 30 months (mean: 33.98; range: 1-161). *CCND1* gene amplifications were found in 10 cases (23.3%) with a median *CCND1*-to-CEP11 ratio of 4.16 and *TERT* gene amplifications were detected in 9 cases (20.9%), with a median *TERT*-to-*MCTP1* ratio of 3.10. *CCND1* and *TERT* amplifications were mutually exclusive. Fig 1 shows a FISH image of an ALM harboring *TERT* gene amplification. In univariate survival analysis, *TERT* amplifications significantly reduced OS ( $P = .025$ ), while the patients with *CCND1* amplifications had no significant differences in OS ( $P = .987$ ) (see Table I). In multivariate survival analysis, Breslow index and *TERT* amplifications retained significance for OS ( $P = .006$ ; hazard ratio [HR] 9.20; 95% confidence interval [CI] 1.90-44.59 and  $P = .019$ ; HR 4.63; 95% CI 1.29-16.62, respectively).

In this preliminary study, we are reporting the prognostic value of *TERT* gene amplification evaluated by FISH in a series of ALMs. *TERT* is a gene encoding for the catalytic subunit of telomerase reverse transcriptase. Gene amplification is the most frequent mechanism for *TERT* activation, promoting cell survival and proliferation. However, the



**Fig 1.** FISH picture of an acral lentiginous melanoma harboring *TERT* amplification. It shows a higher number of *TERT* copies (green signals) when compared to the control gene *MCTP1* (red signals) (Original magnification:  $\times 1000$ .)

prognostic relevance of *TERT* amplification has only been proved in non-small cell lung carcinomas, to date.<sup>4</sup> Recently, recurrent somatic mutations in the *TERT* promoter region have been described in some cancers, including melanomas. They could represent an additional potential mechanism of *TERT* activation, different from the well-recognized *TERT* copy number gains. In fact, a more recent study has demonstrated that *TERT* promoter mutations are uncommon in ALMs.<sup>5</sup> These results are consistent with the supposed relation of these mutations with the UV light exposure and supports the evidence that melanomas may show different pathogenesis depending on body site and levels of sun exposure.<sup>1</sup> Interestingly, we found *TERT* and *CCND1* gene amplifications in different ALM subsets, and they were mutually exclusive in accordance with previous studies.<sup>2</sup> This fact suggests that ALM may have different pathways of oncogenesis. Further studies including a larger number of cases are needed to confirm our results.

Alba Diaz, MD,<sup>a</sup> Joan Anton Puig-Butillé, PhD,<sup>b,f</sup> Concha Muñoz,<sup>a</sup> Dolors Costa, PhD,<sup>a</sup> Anna Díez, MSc,<sup>c</sup> Adriana Garcia-Herrera, MD, PhD,<sup>a</sup> Cristina Carrera, MD, PhD,<sup>d,f</sup> Celia Badenas, PhD,<sup>b,f</sup> Francesc Solé, PhD,<sup>e</sup> Josep Malvehy, MD, PhD,<sup>d,f</sup> Susana Puig, MD, PhD,<sup>d,f</sup> and Lluçia Alos, MD, PhD<sup>a</sup>

Department of Pathology,<sup>a</sup> Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Spain; Department of Biochemical and Molecular Genetics,<sup>b</sup> Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Spain; Institute of Predictive and Personalized Medicine of Cancer (IMPPC),<sup>c</sup> Badalona, Spain; Melanoma Unit, Department

of Dermatology,<sup>d</sup> Hospital Clínic, IDIBAPS, University of Barcelona, Spain; Institut de Recerca contra la Leucèmia Josep Carreras,<sup>e</sup> Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, Badalona, Spain; Centro Investigación Biomédica en Enfermedades Raras (CIBERER),<sup>f</sup> Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Barcelona, Spain

**Funding sources:** This study was supported by a grant from Hospital Clínic de Barcelona (Ajut a la recerca "Josep Font") and Red Temàtica de Investigación Cooperativa en Cáncer (RTICC, FEDER) (RD07/0020/2004 and RD12/0036/0044). The research at the Melanoma Unit in Barcelona is partially funded by Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias grant 09/01393; CIBER de Enfermedades Raras of the Instituto de Salud Carlos III, Spain; AGAUR 2009 SGR 1337 of the Catalan Government, Spain; European Commission under the 6th Framework Programme, Contract No. LSHC-CT-2006-018702 (GenoMEL) and National Cancer Institute (NCI grant number CA83115) of the US National Institutes of Health (NIH) (CA83115).

**Conflicts of interest:** None declared.

**Correspondence to:** Lluçia Alos, MD, PhD, Department of Pathology, Hospital Clínic, Villarroel 170, Barcelona, Spain

**E-mail:** [lalos@clinic.ub.es](mailto:lalos@clinic.ub.es)

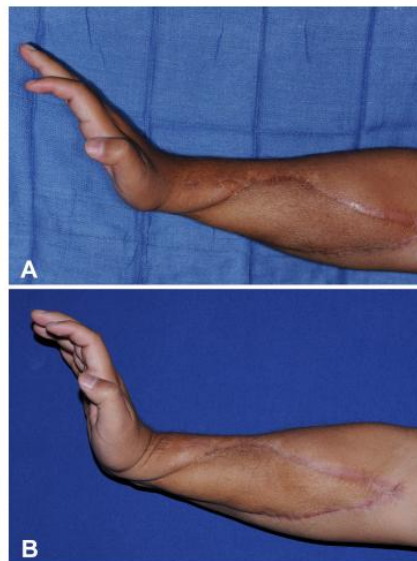
**REFERENCES**

1. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353:2135-47.
2. Puig-Butillé JA, Badenas C, Ogbah Z, Carrera C, Aguilera P, Malvehy J, et al. Genetic alterations in RAS-regulated pathway in acral lentiginous melanoma. *Exp Dermatol* 2013;22:148-50.
3. Diaz A, Puig-Butillé JA, Valera A, Muñoz C, Costa D, Garcia-Herrera A, et al. *TERT* and *AURKA* gene copy number gains enhance the detection of acral lentiginous melanomas by fluorescence in situ hybridization. *J Mol Diagn* 2014;16:198-206.
4. Zhu CQ, Cutz JC, Liu N, Lau D, Shepherd FA, Squire JA, et al. Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2006;94:1452-9.
5. Liao JY, Tsai JH, Jeng YM, Chu CY, Kuo KT, Liang CW. *TERT* promoter mutation is uncommon in acral lentiginous melanoma. *J Cutan Pathol* 2014;41:504-8.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2014.05.035>

**Ablative fractional photothermolysis in the treatment of scar contractures of the wrists and forearms: A retrospective data analysis**

**To the Editor:** Since its introduction in 2007, ablative fractional photothermolysis (AFP) has been reported



**Fig 1.** A, Musclocutaneous flap on ventral aspect of forearm after a blast injury. B, Restricted wrist and finger extension at baseline improved after 2 laser treatments.

to be effective in improving appearance and texture in a broad array of skin conditions, including surgical, acne, and traumatic scars.<sup>1,2</sup> A growing number of anecdotal reports have suggested that this laser modality can safely and effectively improve function in patients with debilitating scar contractures.<sup>3-5</sup> However, to our knowledge there has not previously been a systematic evaluation of efficacy specifically related to function.

In an institutional review board–approved retrospective review, we incorporated data from surgical, dermatologic, and occupational therapy records of patients who received AFP treatments to the forearm and wrist for scar contractures between October 1, 2009, and October 1, 2012. Our goal was to assess for statistically significant improvements in range of motion (ROM) after a course of AFP (Fig 1).

Thirteen patients were identified with directly comparable ROM measurements before and after laser treatment. Mechanisms of injury included blasts from improvised explosive devices, burns, tumor extirpation, and sports accidents. Reconstructive techniques were variable and included open reduction and internal fixation, fasciotomy, flaps, and full and split-thickness skin grafts. The average age of eligible patients was 34 years. Median time to initial laser treatment after the injury or final surgery was 6.7 months. The average number of treatments per patient was 3.68 at an interval of 6 to 8 weeks. All treatments were performed with an ablative



# **VI. Discussió**





## Discussió

L'estudi histopatològic és considerat actualment el *gold standard* per al diagnòstic de melanoma i per al seu diagnòstic diferencial, principalment amb lesions melanocítiques benignes (nevus). Aquest, però, mostra moltes limitacions i contextos clars de dificultat diagnòstica són les neoplàsies melanocítiques fusocel·lulars i les neoplàsies melanocítiques acrals.

En el primer treball, realitzat en una sèrie de 46 tumors melanocítics incloent nevus fusocel·lulars pigmentats (nevus de Reed) i melanomes amb cel·lularitat fusiforme, vàrem trobar dades clíniques i histològiques que correlacionaven significativament amb el diagnòstic de lesió benigna o maligna. Des del punt de vista clínic, els nevus solien presentar-se en individus més joves, predominantment en dones, i sobretot a les extremitats inferiors, mesurant menys de 7 mm de diàmetre. Aquestes característiques clíniques s'han de tenir en compte a l'hora d'evaluar aquestes lesions i de fet ja s'havia remarcat amb anterioritat que el diagnòstic correcte dels nevus de Reed està clarament relacionat amb l'accés a una bona informació clínica.<sup>221</sup> També vàrem definir una sèrie de característiques histològiques que afavoririen el diagnòstic d'una lesió benigna, tant arquitecturals (simetria, bona delimitació lateral, uniformitat dels nius i hiperplàsia epidèrmica) com citològiques (pigmentació difusa i homogènia de les cèl·lules, absència d'atípia marcada i difusa i un baix índex mitòtic). Contràriament, es van definir també criteris histològics a favor de melanoma com ara la falta d'uniformitat dels nius tumorals, el creixement lentiginós, una pigmentació irregular, la presència d'atípia cel·lular difusa i un alt índex mitòtic així com també canvis dèrmics consistents en presència d'un infiltrat inflamatori que contingui cèl·lules plasmàtiques o l'elastosi i la regressió. De forma interessant, tant l'extensió annexial com pagetoide (característiques que normalment fan preocupar en l'estudi histològic de les lesions melanocítiques) es veien freqüentment tant en els nevus com en els melanomes.

Fins al dia d'avui la utilitat de la sonda de FISH per als gens *RREB1/MYB/CCND1* s'ha estudiat en diferents contextos de les proliferacions melanocítiques, amb diferents resultats.<sup>144,200-202</sup> En el primer estudi nosaltres vàrem testar per primera vegada aquesta sonda en una sèrie de lesions

## Discussió

melanocítiques fusocel·lulars. Quatre dels melanomes van resultar negatius per FISH, tres d'ells melanomes d'extensió superficial i un melanoma tipus lentígen maligne. Aquests resultats es corresponien amb una sensibilitat del 73%. De forma interessant, aquests melanomes eren *in situ* o primis. Una sensibilitat baixa al voltant del 70% ja s'ha descrit prèviament en altres tipus de melanoma *in situ*,<sup>222</sup> mentre que en els melanomes en fase de creixement vertical o en les metàstasis la sensibilitat varia entre el 83% i el 90%.<sup>144,190,200,202</sup> També vàrem detectar un fals positiu: un dels nevus de Reed complia un dels quatre criteris (increment en el número de còpies de *RREB1*, mentre que la relació de *RREB1* amb el centròmer era normal). Alguns resultats falsos positius ja s'han observat amb anterioritat en nevus de diferents tipus, incloent alguns nevus de Spitz.<sup>190</sup>

En el segon treball vàrem estudiar per primera vegada una sèrie de 58 lesions melanocítiques acrals amb la sonda de FISH multicolor incloent tant lesions benignes com malignes, donat que molt poques lesions acrals havien estat estudiades abans.<sup>192,198,223,224</sup> Aquesta multisonda va ser capaç de detectar 29 dels 43 melanomes lentiginosos acrals (MLAs), mentre que tots el nevus acrals van ser negatius. Aquests resultats concordaven amb una sensibilitat del 85.3% i una especificitat del 100%, resultats similars als d'estudis previs. De totes maneres s'han reportat diferents sensibilitats, d'entre el 40% i el 100%, sobretot depenent del subtipus de melanoma estudiat.<sup>202,223,225,226</sup> El criteri de guany de *RREB1* va resultar l'alteració genètica més freqüentment detectada, en un 73.5% dels casos, en concordància amb estudis previs en melanomes no acrals. La segona alteració en freqüència va ser la pèrdua de *MYB*, que vam detectar en un 41.2% dels casos. Aquest resultat reforça el concepte de que la presència d'un desequilibri del cromosoma 6 és un fet molt comú en la gran majoria de melanomes,<sup>223</sup> incloent els MLAs.

Cada cop existeixen més evidències de que els melanomes són molt heterogenis a nivell molecular i que subtipus específics poden presentar alteracions genòmiques diferents i distintives.<sup>86</sup> De fet recentment es va proposar afegir a la sonda comercial l'estudi dels gens *MYC* (8q24) i *CDKN2A* (9p21), per tal de millorar significativament la detecció dels melanomes,

## Discussió

incloent els melanomes spitzoides.<sup>198</sup> *MYC* mostra guanys en el número de còpies en un subgrup de melanomes amb característiques clinicopatològiques distintives.<sup>208</sup> En la nostra sèrie de neoplàsies acrals no vam detectar guanys de *MYC* en cap dels ALMs, en concordància amb un treball previ en què un gran nombre de melanomes de diferents subtipus, incloent 23 ALMs, es van estudiar per FISH.<sup>227</sup>

Se sap que els melanomes lentiginosos acrals presenten de forma característica guanys en el número de còpies de regions genòmiques petites, com ara gens lligats a l'oncogènesi i la progressió tumoral com són *CCND1* (11q13), *TERT* (5p15) i *AURKA* (20q13).<sup>86,113,116-118,183</sup> Per aquesta raó en el segon treball vàrem desenvolupar sondes de FISH específiques per a aquests gens, mitjançant BACs, per tal d'estudiar la seva utilitat en el diagnòstic diferencial. Vàrem poder confirmar que aquests gens no mostraven guanys en cap nevus acral i que per tant podrien ser gens promotors a l'hora d'ajudar en el diagnòstic diferencial entre tumors melanocítics acrals benignes i malignes. Quan vàrem afegir els seus resultats als de la sonda comercial, s'incrementava la sensibilitat del 85.3% al 97%, mantenint una especificitat del 100%. A més, i de forma interessant, els guanys en el número de còpies dels gens *CCND1*, *TERT* i *AURKA* eren mutualment excloents. De totes formes, en un estudi previ les amplificacions de 11q13 i 5p15 es van detectar de forma concurrent en la porció invasiva d'uns pocs MLAs.<sup>118</sup>

En la majoria de càncers, incloent el melanoma, les amplificacions gèniques s'han associat clàssicament amb la progressió tumoral ja que solen ocórrer en estadis avançats de la malaltia.<sup>228</sup> En contrast, i alhora amb acord amb estudis previs,<sup>116,229</sup> nosaltres vam detectar guanys en el número de còpies (i especialment amplificacions) tant en la porció invasiva com en el component *in situ* dels MLAs, en nivells similars. Aquest fet suggeriria que en aquest subtipus de melanoma les amplificacions gèniques apareixerien ja en fases precoces del desenvolupament tumoral. A més, també vam detectar guanys en el número de còpies de *TERT* i *CCND1* en cèl·lules aïllades de l'epidermis adjacent aparentment normal a l'histologia, lluny del melanoma. Aquesta troballa ja s'havia descrit anteriorment en els MLAs per a alguns gens

## Discussió

com *CCND1* i *TERT*. Aquestes cèl·lules s'han anomenat "cèl·lules de camp". S'ha suggerit que aquestes cèl·lules apareixerien inclús abans que la fase de melanoma *in situ*, representant doncs melanòcits clonals en l'epidermis aparentment no lesional i que per tant explicarien les freqüents recidives locals que es donen inclús després d'excisions aparentment completes en aquest subtipus de melanomes.<sup>116,118</sup>

La immunohistoquímica és la tècnica complementària més utilitzada en l'avaluació de les lesions melanocítiques, si bé fins al moment no disposem de cap marcador capaç de distingir entre lesions benignes i malignes. Freqüentment s'utilitzen marcadors de diferenciació melanocítica o de proliferació, si bé és important remarcar que no tant sols és important el seu grau de positivitat sinó també el seu patró d'expressió i distribució.<sup>137</sup>

En el primer estudi vàrem estudiar marcadors de diferenciació (HMB45) així com proteïnes de cicle cel·lular (Ki67, ciclina D1, p16INK4a, p27KIP1 i p53) i inhibidors de l'apoptosi (survivina). HMB45 es perdia en el component dèrmic dels nevus compostos mentre que era positiu en el component infiltrant de la majoria de melanomes, en acord amb estudis previs.<sup>147</sup> També va resultar útil a l'hora de ressaltar el creixement pagetoide i l'extensió annexial, així com per valorar el patró de creixement lentiginós. L'índex de proliferació, mesurat a través de l'expressió proteica de Ki67, va resultar significativament menor en els nevus de Reed. La utilitat de la tinció de Ki67 en el diagnòstic diferencial de les lesions melanocítiques ja s'ha publicat anteriorment<sup>160,161</sup> però també cal remarcar que un resultat negatiu o un índex de proliferació baix no assegura el diagnòstic de lesió benigna. La immunoexpressió de ciclina D1 va resultar també significativament menor en el nevus de Reed en comparació amb els melanomes (mitja de 12,4% versus 41.5%). De totes formes, l'expressió era variable entre casos i alguns nevus de Reed van mostrar una major expressió que alguns melanomes fusocel·lulars. A pesar de que una expressió elevada de ciclina D1 s'ha relacionat amb la transformació maligna dels tumors melanocítics, una expressió variable o inclús elevada s'ha observat també en alguns subtipus de nevus, com els nevus de Spitz i els nevus displàstics, en contraposició amb els nevus adquirits comuns o els nevus congènits que

## Discussió

generalment mostren una baixa expressió d'aquest marcador.<sup>163,165,166</sup> Tant la p16INK4a com la p27KIP1, inhibidors de les quinases dependents de ciclina i per tant supressors de la progressió del cicle cel·lular, solen expressar-se en les fases inicials del creixement tumoral dels melanomes però solen perdre's en les fases més avançades.<sup>169,170</sup> En la nostra sèrie p16INK4a s'expressava de forma similar en nevus i melanomes, mentre que p27KIP1 mostrava una tendència a presentar una major expressió en els nevus de Reed. Si bé inicialment s'havia proposat que la p16INK4a era molt útil per diferenciar entre nevus de Spitz i melanomes,<sup>169,204,230</sup> estudis posteriors al nostre primer treball han corroborat també que existeixen melanomes que poden expressar aquesta proteïna a nivells similars als dels nevus.<sup>231,232</sup> La survivina és una proteïna que actua bloquejant l'apoptosi induïda pels mitocondris i que alhora juga un paper important com a regulador de diverses fases de la mitosi.<sup>233</sup> S'observa expressió de survivina durant el desenvolupament embrionari i fetal mentre que és pràcticament indetectable en teixits adults amb diferenciació terminal. També s'expressa en la gran majoria de tumors humans.<sup>180</sup> Anteriorment s'havia descrit una major expressió nuclear de survivina en els melanomes, en contrast amb els nevus, mitjançant immunohistoquímica.<sup>165,179,181</sup> En el nostre estudi els nevus de Reed no expressaven aquesta proteïna mentre que els melanomes mostraven una expressió baixa tot i que significativament major que els nevus. De totes formes, la tinció nuclear per survivina era molt baixa en els melanomes positius, fet que dificultava la seva interpretació i que per tant limitaria la seva utilitat amb propòsits de diagnòstic diferencial. De forma interessant també vàrem poder correlacionar l'expressió proteica amb l'activitat proliferativa dels tumors, ja que vàrem trobar una correlació positiva estadísticament significativa entre l'índex mitòtic i l'expressió de Ki-67, ciclina D1 i survivina en els melanomes fusocel·lulars.

En el segon estudi vam correlacionar també l'estat dels gens anteriorment mencionats amb la seva expressió proteica, avaluada mitjançant immunohistoquímica. Vàrem trobar una correlació significativa entre els guanys en el número de còpies i la sobreexpressió proteica pel què fa a la CCND1. De totes formes, la meitat dels MLAs sense guanys també mostraven una

## Discussió

sobreexpressió proteica. De fet, la sobreexpressió proteica de les ciclines no és sempre deguda a una amplificació del gen, sinó que existeixen altres mecanismes involucrats en la seva regulació post-transcripcional, com ara les translocacions<sup>234</sup> o mutacions en altres gens de la via MAPK.<sup>86</sup> A més, l'expressió de CCND1, TERT i AURKA era significativament més baixa en els nevus en comparació amb els melanomes. De totes formes, l'expressió de TERT i AURKA era molt baixa en ambdós grups i alguns nevus mostraven inclús una major expressió que molts melanomes, fets que limitarien la seva utilitat amb propòsits de diagnòstic diferencial.

La classificació actual de la OMS dels tumors melanocítics reconeix 4 subtipus principals de melanoma basant-se en característiques clinicopatològiques però amb molt poca rellevància en el pronòstic. En el tercer treball vàrem reportar el valor pronòstic de l'amplificació de *TERT* evaluada mitjançant FISH en els MLAs. Els MLAs amb amplificació de *TERT* mostraven un pitjor pronòstic inclús després de l'anàlisi multivariat. *TERT* és un gen que codifica per a la subunitat catalítica de la transcriptasa inversa de la telomerasa. La seva amplificació gènica és el mecanisme més freqüent per a la seva activació, promocionant la supervivència cel·lular i la proliferació. De totes formes, fins a dia d'avui el paper pronòstic de les amplificacions de *TERT* només s'havia demostrat en carcinomes pulmonars de cèl·lula no petita.<sup>235</sup> Recentment s'han descrit mutacions somàtiques recurrents en la regió del promotor de *TERT* en alguns càncers, incloent el melanoma.<sup>236</sup> Podrien representar un mecanisme potencial d'activació addicional, diferent dels ja reconeguts guanys en el número de còpies. De fet un estudi més recent ha mostrat que aquestes mutacions són infreqüents en els MLAs.<sup>237</sup> Aquests resultats serien consistents amb la suposada relació d'aquestes mutacions amb l'exposició a les RUV i alhora recolzaria l'evidència de que els melanomes presenten diferents vies patogèniques depenent de la localització i del grau d'exposició solar.<sup>86</sup> Tanmateix, en melanomes no acrals aquestes mutacions del promotor de *TERT* s'han relacionat amb un pitjor pronòstic.<sup>238</sup>

# **VII. Conclusions**





## Conclusions

1.- En l'avaluació de les neoplàsies melanocítiques fusocel·lulars la integració de la informació clínica i histològica és essencial. Els nevus de Reed apareixen més freqüentment en les extremitats inferiors de dones joves i solen ser lesions petites, de menys de 7 mm de diàmetre.

2.- Una sèrie de característiques histològiques arquitecturals i citològiques diferencien significativament les neoplàsies melanocítiques fusocel·lulars benignes i malignes, si bé característiques preocupants en altres contextos com són el creixement pagetoide i la extensió annexial poden presentar-se en els nevus de Reed.

3.- L'estudi immunohistoquímic de Ki-67, CCND1 i survivina pot ser una tècnica addicional útil en el diagnòstic diferencial entre nevus de Reed i melanomes fusocel·lulars. Hi ha una correlació positiva entre l'índex mitòtic i l'expressió d'aquestes proteïnes en els melanomes fusocel·lulars.

4.- L'estudi de les neoplàsies melanocítiques fusocel·lulars mitjançant FISH amb les sondes específiques per a *REEB1*, *MYB* i *CCND1* mostra una sensibilitat del 73% i especificitat del 93% pel diagnòstic diferencial nevus-melanoma. Els falsos negatius corresponen a melanomes *in situ* o melanomes primis.

5.- L'estudi de les neoplàsies melanocítiques acrals mitjançant FISH amb les sondes específiques per a *REEB1*, *MYB* i *CCND1* mostra una sensibilitat del 85.3% i especificitat del 100% per al diagnòstic diferencial nevus-melanoma. **No s'han detectat guanys en el número de còpies del gen *MYC* en cap cas.**

6.- L'addició de sondes específiques per als gens *TERT* i *AURKA* a les sondes de FISH previament mencionades augmenta significativament la sensibilitat en la detecció dels MLAs, que esdevé del 97%, mantenint l'especificitat del 100%.

## Conclusions

7.- En els MLAs les amplificacions de *CCND1* i *TERT* ja són presents en estadis molt inicials del desenvolupament tumoral, ja que no només es detecten en el component *in situ* sinó també en cèl·lules aïllades de l'epidermis adjacent aparentment normal ("cèl·lules de camp"), a nivells similars als del component invasiu.

8.- En els MLAs existeix una correlació significativament positiva entre els guanys en el número de còpies de *CCND1* i la sobreexpressió proteica. No hem trobat correlació significativa entre el número de còpies dels gens *TERT* o *AURKA* i la seva expressió proteica.

9.- En els MLAs les amplificacions de *CCND1*, *TERT* i *AURKA* són mutualment excloents, fet que suggereix que aquests melanomes presenten diferents vies oncogèniques.

10. Les amplificacions de *TERT* detectades mitjançant FISH en els MLAs s'associen a una pitjor supervivència global, inclús després de l'anàlisi multivariant.

## **VIII. Bibliografia**



1. Garibyan, L. & Fisher, D.E. How sunlight causes melanoma. *Curr Oncol Rep* **12**, 319-26 (2010).
2. Bald, T. *et al.* Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiogenesis and metastasis in melanoma. *Nature* **507**, 109-13 (2014).
3. Zaidi, M.R. *et al.* Interferon-gamma links ultraviolet radiation to melanomagenesis in mice. *Nature* **469**, 548-53 (2011).
4. Whiteman, D.C., Whiteman, C.A. & Green, A.C. Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control* **12**, 69-82 (2001).
5. Gallagher, R.P., Spinelli, J.J. & Lee, T.K. Tanning beds, sunlamps, and risk of cutaneous malignant melanoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 562-6 (2005).
6. International Agency for Research on Cancer Working Group on artificial ultraviolet, I. & skin, C. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer* **120**, 1116-22 (2007).
7. Fitzpatrick, T.B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. *Arch Dermatol* **124**, 869-71 (1988).
8. Gandini, S. *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* **41**, 45-60 (2005).
9. Olsen, C.M., Carroll, H.J. & Whiteman, D.C. Estimating the attributable fraction for cancer: A meta-analysis of nevi and melanoma. *Cancer Prev Res (Phila)* **3**, 233-45 (2010).
10. Caini, S. *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. *Eur J Cancer* **45**, 3054-63 (2009).
11. Watts, C.G. *et al.* Clinical practice guidelines for identification, screening and follow-up of individuals at high risk of primary cutaneous melanoma: a systematic review. *Br J Dermatol* **172**, 33-47 (2015).
12. Florell, S.R. *et al.* Population-based analysis of prognostic factors and survival in familial melanoma. *J Clin Oncol* **23**, 7168-77 (2005).
13. Rivers, J.K. Melanoma. *Lancet* **347**, 803-6 (1996).
14. Haluska, F.G. & Hodi, F.S. Molecular genetics of familial cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* **16**, 670-82 (1998).
15. Wiesner, T. *et al.* Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet* **43**, 1018-21 (2011).
16. Zuo, L. *et al.* Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* **12**, 97-9 (1996).
17. Serrano, M., Gomez-Lahoz, E., DePinho, R.A., Beach, D. & Bar-Sagi, D. Inhibition of ras-induced proliferation and cellular transformation by p16INK4. *Science* **267**, 249-52 (1995).
18. Pomerantz, J. *et al.* The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-23 (1998).
19. Zhang, Y., Xiong, Y. & Yarbrough, W.G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* **92**, 725-34 (1998).

20. Goldstein, A.M. *et al.* High-risk melanoma susceptibility genes and pancreatic cancer, neural system tumors, and uveal melanoma across GenoMEL. *Cancer Res* **66**, 9818-28 (2006).
21. Newton Bishop, J.A. & Gruis, N.A. Genetics: what advice for patients who present with a family history of melanoma? *Semin Oncol* **34**, 452-9 (2007).
22. Garbe, C. & Leiter, U. Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* **27**, 3-9 (2009).
23. Jemal, A. *et al.* Recent trends in cutaneous melanoma incidence and death rates in the United States, 1992-2006. *J Am Acad Dermatol* **65**, S17-25 e1-3 (2011).
24. Broekaert, E., Autrique, M., Vanderplasschen, W. & Colpaert, K. 'The human prerogative': a critical analysis of evidence-based and other paradigms of care in substance abuse treatment. *Psychiatr Q* **81**, 227-38 (2010).
25. Abbasi, N.R. *et al.* Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA* **292**, 2771-6 (2004).
26. Bichakjian, C.K. *et al.* Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. American Academy of Dermatology. *J Am Acad Dermatol* **65**, 1032-47 (2011).
27. Rivers, J.K. & Wulkan, S. The case for early detection of melanoma. *J Cutan Med Surg* **14**, 24-9 (2010).
28. Marghoob, A.A. *et al.* Instruments and new technologies for the in vivo diagnosis of melanoma. *J Am Acad Dermatol* **49**, 777-97; quiz 798-9 (2003).
29. Busam, K.J. *et al.* Detection of intraepidermal malignant melanoma in vivo by confocal scanning laser microscopy. *Melanoma Res* **12**, 349-55 (2002).
30. Ferrara, G. *et al.* Dermoscopic and histopathologic diagnosis of equivocal melanocytic skin lesions: an interdisciplinary study on 107 cases. *Cancer* **95**, 1094-100 (2002).
31. Farmer, E.R., Gonin, R. & Hanna, M.P. Discordance in the histopathologic diagnosis of melanoma and melanocytic nevi between expert pathologists. *Hum Pathol* **27**, 528-31 (1996).
32. Brochez, L. *et al.* Inter-observer variation in the histopathological diagnosis of clinically suspicious pigmented skin lesions. *J Pathol* **196**, 459-66 (2002).
33. Ackerman, A.B. Discordance among expert pathologists in diagnosis of melanocytic neoplasms. *Hum Pathol* **27**, 1115-6 (1996).
34. Troxel, D.B. Medicolegal aspects of error in pathology. *Arch Pathol Lab Med* **130**, 617-9 (2006).
35. Troxel, D.B. Pitfalls in the diagnosis of malignant melanoma: findings of a risk management panel study. *Am J Surg Pathol* **27**, 1278-83 (2003).
36. Jackson, R. Malignant melanoma: a review of 75 malpractice cases. *Int J Dermatol* **36**, 497-8 (1997).
37. Ferrara, G., Senetta, R., Paglierani, M. & Massi, D. Main clues in the pathologic diagnosis of melanoma: is molecular genetics helping? *Dermatol Ther* **25**, 423-31 (2012).
38. Barnhill, R.L. The spitzoid lesion: the importance of atypical variants and risk assessment. *Am J Dermatopathol* **28**, 75-83 (2006).
39. Barnhill, R.L. *et al.* Atypical Spitz nevi/tumors: lack of consensus for diagnosis, discrimination from melanoma, and prediction of outcome. *Hum Pathol* **30**, 513-20 (1999).

40. Cerroni, L. *et al.* Melanocytic tumors of uncertain malignant potential: results of a tutorial held at the XXIX Symposium of the International Society of Dermatopathology in Graz, October 2008. *Am J Surg Pathol* **34**, 314-26 (2010).
41. Elder, D.E. & Xu, X. The approach to the patient with a difficult melanocytic lesion. *Pathology* **36**, 428-34 (2004).
42. Barnhill, R.L. The Spitzoid lesion: rethinking Spitz tumors, atypical variants, 'Spitzoid melanoma' and risk assessment. *Mod Pathol* **19 Suppl 2**, S21-33 (2006).
43. Cerroni, L. Spitzoid tumors: a matter of perspective? *Am J Dermatopathol* **26**, 1-3 (2004).
44. Ludgate, M.W. *et al.* The atypical Spitz tumor of uncertain biologic potential: a series of 67 patients from a single institution. *Cancer* **115**, 631-41 (2009).
45. Gamblin, T.C., Edington, H., Kirkwood, J.M. & Rao, U.N. Sentinel lymph node biopsy for atypical melanocytic lesions with spitzoid features. *Ann Surg Oncol* **13**, 1664-70 (2006).
46. Massi, D. *et al.* Atypical Spitzoid melanocytic tumors: a morphological, mutational, and FISH analysis. *J Am Acad Dermatol* **64**, 919-35 (2011).
47. Murali, R. *et al.* Sentinel lymph node biopsy in histologically ambiguous melanocytic tumors with spitzoid features (so-called atypical spitzoid tumors). *Ann Surg Oncol* **15**, 302-9 (2008).
48. Urso, C. *et al.* Sentinel lymph node biopsy in patients with "atypical Spitz tumors." A report on 12 cases. *Hum Pathol* **37**, 816-23 (2006).
49. LeBoit P.E., B.G., Weedon D, Sarasain A (ed.) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours.* , (IARC Press, Lyon, 2006).
50. Balch, C.M. Cutaneous melanoma: prognosis and treatment results worldwide. *Semin Surg Oncol* **8**, 400-14 (1992).
51. Balch, C.M. *et al.* A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *Cancer* **88**, 1484-91 (2000).
52. Balch, C.M. *et al.* Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* **27**, 6199-206 (2009).
53. Thompson, J.F. *et al.* Prognostic significance of mitotic rate in localized primary cutaneous melanoma: an analysis of patients in the multi-institutional American Joint Committee on Cancer melanoma staging database. *J Clin Oncol* **29**, 2199-205 (2011).
54. Joosse, A. *et al.* Superior outcome of women with stage I/II cutaneous melanoma: pooled analysis of four European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trials. *J Clin Oncol* **30**, 2240-7 (2012).
55. Balch, C.M. *et al.* Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* **19**, 3622-34 (2001).
56. Unger, J.M., Flaherty, L.E., Liu, P.Y., Albain, K.S. & Sondak, V.K. Gender and other survival predictors in patients with metastatic melanoma on Southwest Oncology Group trials. *Cancer* **91**, 1148-55 (2001).
57. Callender, G.G. *et al.* Prognostic implications of anatomic location of primary cutaneous melanoma of 1 mm or thicker. *Am J Surg* **202**, 659-64; discussion 664-5 (2011).



58. Lefevre, M. *et al.* Relevance of vertical growth pattern in thin level II cutaneous superficial spreading melanomas. *Am J Surg Pathol* **27**, 717-24 (2003).
59. Ronan, S.G., Eng, A.M., Briele, H.A., Shioura, N.N. & Das Gupta, T.K. Thin malignant melanomas with regression and metastases. *Arch Dermatol* **123**, 1326-30 (1987).
60. Kelly, J.W., Sagebiel, R.W. & Blois, M.S. Regression in malignant melanoma. A histologic feature without independent prognostic significance. *Cancer* **56**, 2287-91 (1985).
61. Byers, H.R. & Bhawan, J. Pathologic parameters in the diagnosis and prognosis of primary cutaneous melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* **12**, 717-35 (1998).
62. Dadras, S.S. *et al.* Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* **162**, 1951-60 (2003).
63. Nagore, E. *et al.* Prognostic factors in localized invasive cutaneous melanoma: high value of mitotic rate, vascular invasion and microscopic satellitosis. *Melanoma Res* **15**, 169-77 (2005).
64. Massi, D. *et al.* Thick cutaneous malignant melanoma: a reappraisal of prognostic factors. *Melanoma Res* **10**, 153-64 (2000).
65. Clark, W.H., Jr. *et al.* Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst* **81**, 1893-904 (1989).
66. Baer, S.C., Schultz, D., Synnestvedt, M. & Elder, D.E. Desmoplasia and neurotropism. Prognostic variables in patients with stage I melanoma. *Cancer* **76**, 2242-7 (1995).
67. Clemente, C.G. *et al.* Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* **77**, 1303-10 (1996).
68. Tuthill, R.J., Unger, J.M., Liu, P.Y., Flaherty, L.E. & Sondak, V.K. Risk assessment in localized primary cutaneous melanoma: a Southwest Oncology Group study evaluating nine factors and a test of the Clark logistic regression prediction model. *Am J Clin Pathol* **118**, 504-11 (2002).
69. Balch, C.M. Microscopic satellites around a primary melanoma: another piece of the puzzle in melanoma staging. *Ann Surg Oncol* **16**, 1092-4 (2009).
70. Banerjee, S.S. & Harris, M. Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. *Histopathology* **36**, 387-402 (2000).
71. Sade, S., Al Habeeb, A. & Ghazarian, D. Spindle cell melanocytic lesions--part I: an approach to compound naevoidal pattern lesions with spindle cell morphology and Spitzoid pattern lesions. *J Clin Pathol* **63**, 296-321 (2010).
72. Reed, R.J., Ichinose, H., Clark, W.H., Jr. & Mihm, M.C., Jr. Common and uncommon melanocytic nevi and borderline melanomas. *Semin Oncol* **2**, 119-47 (1975).
73. Smith, N.P. The pigmented spindle cell tumor of Reed: an underdiagnosed lesion. *Semin Diagn Pathol* **4**, 75-87 (1987).
74. Cook, M.G. Benign melanocytic lesions mimicking melanomas. *Pathology* **36**, 414-8 (2004).
75. Barnhill, R.L. & Mihm, M.C., Jr. Pigmented spindle cell naevus and its variants: distinction from melanoma. *Br J Dermatol* **121**, 717-25 (1989).
76. Requena, L. & Sanchez Yus, E. Pigmented spindle cell naevus. *Br J Dermatol* **123**, 757-63 (1990).

77. Barnhill, R.L., Barnhill, M.A., Berwick, M. & Mihm, M.C., Jr. The histologic spectrum of pigmented spindle cell nevus: a review of 120 cases with emphasis on atypical variants. *Hum Pathol* **22**, 52-8 (1991).
78. Fabrizi, G. & Massi, G. Spitzoid malignant melanoma in teenagers: an entity with no better prognosis than that of other forms of melanoma. *Histopathology* **38**, 448-53 (2001).
79. Massi, G.a.L.P. *Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma*, (Germany, 2004).
80. Hosler, G.A., Moresi, J.M. & Barrett, T.L. Nevi with site-related atypia: a review of melanocytic nevi with atypical histologic features based on anatomic site. *J Cutan Pathol* **35**, 889-98 (2008).
81. Boyd, A.S. & Rapini, R.P. Acral melanocytic neoplasms: a histologic analysis of 158 lesions. *J Am Acad Dermatol* **31**, 740-5 (1994).
82. Elder, D.E. Precursors to melanoma and their mimics: nevi of special sites. *Mod Pathol* **19 Suppl 2**, S4-20 (2006).
83. Russo, A.E. *et al.* Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review). *Int J Oncol* **34**, 1481-9 (2009).
84. Fecher, L.A., Cummings, S.D., Keefe, M.J. & Alani, R.M. Toward a molecular classification of melanoma. *J Clin Oncol* **25**, 1606-20 (2007).
85. Cohen, C. *et al.* Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* **8**, 3728-33 (2002).
86. Curtin, J.A. *et al.* Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* **353**, 2135-47 (2005).
87. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**, 949-54 (2002).
88. Ball, N.J. *et al.* Ras mutations in human melanoma: a marker of malignant progression. *J Invest Dermatol* **102**, 285-90 (1994).
89. Platz, A., Ringborg, U., Brahme, E.M. & Lagerlof, B. Melanoma metastases from patients with hereditary cutaneous malignant melanoma contain a high frequency of N-ras activating mutations. *Melanoma Res* **4**, 169-77 (1994).
90. van 't Veer, L.J. *et al.* N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites. *Mol Cell Biol* **9**, 3114-6 (1989).
91. Libra, M. *et al.* Analysis of BRAF mutation in primary and metastatic melanoma. *Cell Cycle* **4**, 1382-4 (2005).
92. Goel, V.K., Lazar, A.J., Warneke, C.L., Redston, M.S. & Haluska, F.G. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* **126**, 154-60 (2006).
93. Pollock, P.M. *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* **33**, 19-20 (2003).
94. Chapman, P.B. *et al.* Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* **364**, 2507-16 (2011).
95. Albino, A.P., Le Strange, R., Oliff, A.I., Furth, M.E. & Old, L.J. Transforming ras genes from human melanoma: a manifestation of tumour heterogeneity? *Nature* **308**, 69-72 (1984).
96. Bucheit, A.D. *et al.* Clinical characteristics and outcomes with specific BRAF and NRAS mutations in patients with metastatic melanoma. *Cancer* **119**, 3821-9 (2013).

97. Ekedahl, H. *et al.* The clinical significance of BRAF and NRAS mutations in a clinic-based metastatic melanoma cohort. *Br J Dermatol* **169**, 1049-55 (2013).
98. Curtin, J.A., Busam, K., Pinkel, D. & Bastian, B.C. Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* **24**, 4340-6 (2006).
99. Beadling, C. *et al.* KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res* **14**, 6821-8 (2008).
100. Carvajal, R.D. *et al.* KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma. *JAMA* **305**, 2327-34 (2011).
101. Van Raamsdonk, C.D. *et al.* Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med* **363**, 2191-9 (2010).
102. Harbour, J.W. The genetics of uveal melanoma: an emerging framework for targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res* **25**, 171-81 (2012).
103. Romano, E., Schwartz, G.K., Chapman, P.B., Wolchock, J.D. & Carvajal, R.D. Treatment implications of the emerging molecular classification system for melanoma. *Lancet Oncol* **12**, 913-22 (2011).
104. Cannon-Albright, L.A. *et al.* Penetrance and expressivity of the chromosome 9p melanoma susceptibility locus (MLM). *Cancer Res* **54**, 6041-4 (1994).
105. Hussussian, C.J. *et al.* Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* **8**, 15-21 (1994).
106. Nishikawa, H. *et al.* BRCA1-associated protein 1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity. *Cancer Res* **69**, 111-9 (2009).
107. Kakati, S., Song, S.Y. & Sandberg, A.A. Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXII. Karyotypic changes in malignant melanoma. *Cancer* **40**, 1173-81 (1977).
108. Thompson, F.H. *et al.* Cytogenetics of 158 patients with regional or disseminated melanoma. Subset analysis of near-diploid and simple karyotypes. *Cancer Genet Cytogenet* **83**, 93-104 (1995).
109. Kallioniemi, A. *et al.* Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**, 818-21 (1992).
110. Mertens, F., Johansson, B., Hoglund, M. & Mitelman, F. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* **57**, 2765-80 (1997).
111. Trent, J.M. Cytogenetics of human malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* **10**, 103-13 (1991).
112. Pinkel, D. *et al.* High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* **20**, 207-11 (1998).
113. Bastian, B.C., Olshen, A.B., LeBoit, P.E. & Pinkel, D. Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes. *Am J Pathol* **163**, 1765-70 (2003).
114. Bastian, B.C., Wesselmann, U., Pinkel, D. & Leboit, P.E. Molecular cytogenetic analysis of Spitz nevi shows clear differences to melanoma. *J Invest Dermatol* **113**, 1065-9 (1999).
115. Maldonado, J.L., Timmerman, L., Fridlyand, J. & Bastian, B.C. Mechanisms of cell-cycle arrest in Spitz nevi with constitutive activation of the MAP-kinase pathway. *Am J Pathol* **164**, 1783-7 (2004).
116. Bastian, B.C. *et al.* Gene amplifications characterize acral melanoma and permit the detection of occult tumor cells in the surrounding skin. *Cancer Res* **60**, 1968-73 (2000).

117. Bastian, B.C., LeBoit, P.E., Hamm, H., Brocker, E.B. & Pinkel, D. Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res* **58**, 2170-5 (1998).
118. North, J.P., Kageshita, T., Pinkel, D., LeBoit, P.E. & Bastian, B.C. Distribution and significance of occult intraepidermal tumor cells surrounding primary melanoma. *J Invest Dermatol* **128**, 2024-30 (2008).
119. Viros, A. *et al.* Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. *PLoS Med* **5**, e120 (2008).
120. Broekaert, S.M. *et al.* Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**, 763-70 (2010).
121. Maldonado, J.L. *et al.* Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. *J Natl Cancer Inst* **95**, 1878-90 (2003).
122. Edlundh-Rose, E. *et al.* NRAS and BRAF mutations in melanoma tumours in relation to clinical characteristics: a study based on mutation screening by pyrosequencing. *Melanoma Res* **16**, 471-8 (2006).
123. Lee, J.H., Choi, J.W. & Kim, Y.S. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol* **164**, 776-84 (2011).
124. Devitt, B. *et al.* Clinical outcome and pathological features associated with NRAS mutation in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* **24**, 666-72 (2011).
125. Alexeev, V. & Yoon, K. Distinctive role of the cKit receptor tyrosine kinase signaling in mammalian melanocytes. *J Invest Dermatol* **126**, 1102-10 (2006).
126. van Dijk, M. *et al.* Distinct chromosomal aberrations in sinonasal mucosal melanoma as detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **36**, 151-8 (2003).
127. Albertson, D.G. Gene amplification in cancer. *Trends Genet* **22**, 447-55 (2006).
128. Flaherty, K.T., Hodi, F.S. & Bastian, B.C. Mutation-driven drug development in melanoma. *Curr Opin Oncol* **22**, 178-83 (2010).
129. Flaherty, K.T. *et al.* Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med* **363**, 809-19 (2010).
130. Garrido, M.C. & Bastian, B.C. KIT as a therapeutic target in melanoma. *J Invest Dermatol* **130**, 20-7 (2010).
131. Hauschild, A. *et al.* Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **380**, 358-65 (2012).
132. Sosman, J.A. *et al.* Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med* **366**, 707-14 (2012).
133. Flaherty, K.T. *et al.* Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* **367**, 107-14 (2012).
134. Guo, J. *et al.* Phase II, open-label, single-arm trial of imatinib mesylate in patients with metastatic melanoma harboring c-Kit mutation or amplification. *J Clin Oncol* **29**, 2904-9 (2011).
135. Busam, K.J. The use and application of special techniques in assessing melanocytic tumours. *Pathology* **36**, 462-9 (2004).
136. Prieto, V.G. & Shea, C.R. Use of immunohistochemistry in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol* **35 Suppl 2**, 1-10 (2008).

137. Prieto, V.G. & Shea, C.R. Immunohistochemistry of melanocytic proliferations. *Arch Pathol Lab Med* **135**, 853-9 (2011).
138. Healy, E. *et al.* Allelotypes of primary cutaneous melanoma and benign melanocytic nevi. *Cancer Res* **56**, 589-93 (1996).
139. van Dijk, M.C. *et al.* Allelic imbalance in the diagnosis of benign, atypical and malignant Spitz tumours. *J Pathol* **197**, 170-8 (2002).
140. Takata, M. & Saida, T. Genetic alterations in melanocytic tumors. *J Dermatol Sci* **43**, 1-10 (2006).
141. Takata, M. *et al.* Genetic and epigenetic alterations in the differential diagnosis of malignant melanoma and spitzoid lesion. *Br J Dermatol* **156**, 1287-94 (2007).
142. van Dijk, M.C. *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification for the detection of chromosomal gains and losses in formalin-fixed tissue. *Diagn Mol Pathol* **14**, 9-16 (2005).
143. Bauer, J. & Bastian, B.C. Distinguishing melanocytic nevi from melanoma by DNA copy number changes: comparative genomic hybridization as a research and diagnostic tool. *Dermatol Ther* **19**, 40-9 (2006).
144. Gerami, P. *et al.* Fluorescence in situ hybridization for distinguishing nevoid melanomas from mitotically active nevi. *Am J Surg Pathol* **33**, 1783-8 (2009).
145. Gown, A.M., Vogel, A.M., Hoak, D., Gough, F. & McNutt, M.A. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am J Pathol* **123**, 195-203 (1986).
146. McNutt, N.S. "Triggered trap": nevoid malignant melanoma. *Semin Diagn Pathol* **15**, 203-9 (1998).
147. Bergman, R., Dromi, R., Trau, H., Cohen, I. & Lichtig, C. The pattern of HMB-45 antibody staining in compound Spitz nevi. *Am J Dermatopathol* **17**, 542-6 (1995).
148. Diaz, A. *et al.* Pigmented spindle cell nevus: clues for differentiating it from spindle cell malignant melanoma. A comprehensive survey including clinicopathologic, immunohistochemical, and FISH studies. *Am J Surg Pathol* **35**, 1733-42 (2011).
149. Busam, K.J. *et al.* Expression of melan-A (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Surg Pathol* **22**, 976-82 (1998).
150. Jungbluth, A.A. *et al.* A103: An anti-melan-a monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol* **22**, 595-602 (1998).
151. Wiltz, K.L., Qureshi, H., Patterson, J.W., Mayes, D.C. & Wick, M.R. Immunostaining for MART-1 in the interpretation of problematic intra-epidermal pigmented lesions. *J Cutan Pathol* **34**, 601-5 (2007).
152. Nielsen, P.S., Riber-Hansen, R. & Steiniche, T. Immunohistochemical double stains against Ki67/MART1 and HMB45/MITF: promising diagnostic tools in melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* **33**, 361-70 (2011).
153. Nonaka, D., Chiriboga, L. & Rubin, B.P. Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker. *Am J Surg Pathol* **32**, 1291-8 (2008).
154. Agnarsdottir, M. *et al.* SOX10 expression in superficial spreading and nodular malignant melanomas. *Melanoma Res* **20**, 468-78 (2010).

155. Blochin, E. & Nonaka, D. Diagnostic value of Sox10 immunohistochemical staining for the detection of metastatic melanoma in sentinel lymph nodes. *Histopathology* **55**, 626-8 (2009).
156. Jennings, C. & Kim, J. Identification of nodal metastases in melanoma using sox-10. *Am J Dermatopathol* **33**, 474-82 (2011).
157. Stefanaki, C. *et al.* G1 cell cycle regulators in congenital melanocytic nevi. Comparison with acquired nevi and melanomas. *J Cutan Pathol* **35**, 799-808 (2008).
158. Rudolph, P., Schubert, C., Schubert, B. & Parwaresch, R. Proliferation marker Ki-S5 as a diagnostic tool in melanocytic lesions. *J Am Acad Dermatol* **37**, 169-78 (1997).
159. Li, L.X., Crotty, K.A., McCarthy, S.W., Palmer, A.A. & Kril, J.J. A zonal comparison of MIB1-Ki67 immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* **22**, 489-95 (2000).
160. Kaleem, Z. *et al.* Concurrent Ki-67 and p53 immunolabeling in cutaneous melanocytic neoplasms: an adjunct for recognition of the vertical growth phase in malignant melanomas? *Mod Pathol* **13**, 217-22 (2000).
161. Kapur, P. *et al.* Spitz nevi and atypical Spitz nevi/tumors: a histologic and immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* **18**, 197-204 (2005).
162. Sherr, C.J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* **60**, 3689-95 (2000).
163. Alonso, S.R. *et al.* Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol* **164**, 193-203 (2004).
164. Florenes, V.A., Faye, R.S., Maelandsmo, G.M., Nesland, J.M. & Holm, R. Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma: deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. *Clin Cancer Res* **6**, 3614-20 (2000).
165. Garrido-Ruiz, M.C. *et al.* The immunohistochemical profile of Spitz nevi and conventional (non-Spitzoid) melanomas: a baseline study. *Mod Pathol* **23**, 1215-24 (2010).
166. Nagasaka, T. *et al.* Cyclin D1 overexpression in Spitz nevi: an immunohistochemical study. *Am J Dermatopathol* **21**, 115-20 (1999).
167. Georgieva, J., Sinha, P. & Schadendorf, D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* **54**, 229-35 (2001).
168. Ramirez, J.A., Guitart, J., Rao, M.S. & Diaz, L.K. Cyclin D1 expression in melanocytic lesions of the skin. *Ann Diagn Pathol* **9**, 185-8 (2005).
169. George, E., Polissar, N.L. & Wick, M. Immunohistochemical evaluation of p16INK4A, E-cadherin, and cyclin D1 expression in melanoma and Spitz tumors. *Am J Clin Pathol* **133**, 370-9 (2010).
170. Reed, J.A. *et al.* Loss of expression of the p16/cyclin-dependent kinase inhibitor 2 tumor suppressor gene in melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression. *Cancer Res* **55**, 2713-8 (1995).
171. Keller-Melchior, R., Schmidt, R. & Piepkorn, M. Expression of the tumor suppressor gene product p16INK4 in benign and malignant melanocytic lesions. *J Invest Dermatol* **110**, 932-8 (1998).

172. Ivan, D., Diwan, A.H., Esteva, F.J. & Prieto, V.G. Expression of cell cycle inhibitor p27Kip1 and its inactivator Jab1 in melanocytic lesions. *Mod Pathol* **17**, 811-8 (2004).
173. Stefanaki, C. *et al.* Expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip-1) in benign naevi and correlation with Ki-67 proliferative index. *Br J Dermatol* **152**, 373-4 (2005).
174. Sparrow, L.E., Eldon, M.J., English, D.R. & Heenan, P.J. p16 and p21WAF1 protein expression in melanocytic tumors by immunohistochemistry. *Am J Dermatopathol* **20**, 255-61 (1998).
175. Urano, Y. *et al.* Immunohistological analysis of P53 expression in human skin tumors. *J Dermatol Sci* **4**, 69-75 (1992).
176. Schimming, T.T. *et al.* pHH3 immunostaining improves interobserver agreement of mitotic index in thin melanomas. *Am J Dermatopathol* **34**, 266-9 (2012).
177. Hale, C.S. *et al.* Mitotic Rate in Melanoma: Prognostic Value of Immunostaining and Computer-assisted Image Analysis. *Am J Surg Pathol* **37**, 882-9 (2013).
178. Tetzlaff, M.T. *et al.* Immunodetection of phosphohistone H3 as a surrogate of mitotic figure count and clinical outcome in cutaneous melanoma. *Mod Pathol* (2013).
179. Nasr, M.R. & El-Zammar, O. Comparison of pHH3, Ki-67, and survivin immunoreactivity in benign and malignant melanocytic lesions. *Am J Dermatopathol* **30**, 117-22 (2008).
180. Liu, T., Brouha, B. & Grossman, D. Rapid induction of mitochondrial events and caspase-independent apoptosis in Survivin-targeted melanoma cells. *Oncogene* **23**, 39-48 (2004).
181. Ding, Y. *et al.* Nuclear expression of the antiapoptotic protein survivin in malignant melanoma. *Cancer* **106**, 1123-9 (2006).
182. Takata, M. *et al.* Genome profiling of melanocytic tumors using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA): Its usefulness as an adjunctive diagnostic tool for melanocytic tumors. *J Dermatol Sci* **40**, 51-7 (2005).
183. Puig-Butille, J.A. *et al.* Genetic alterations in RAS-regulated pathway in acral lentiginous melanoma. *Exp Dermatol* **22**, 148-50 (2013).
184. Vaarwater, J. *et al.* Multiplex ligation-dependent probe amplification equals fluorescence in-situ hybridization for the identification of patients at risk for metastatic disease in uveal melanoma. *Melanoma Res* **22**, 30-7 (2012).
185. Blokkx, W.A., van Dijk, M.C. & Ruiter, D.J. Molecular cytogenetics of cutaneous melanocytic lesions - diagnostic, prognostic and therapeutic aspects. *Histopathology* **56**, 121-32 (2010).
186. Jeuken, J.W., Sprenger, S.H. & Wesseling, P. Comparative genomic hybridization: practical guidelines. *Diagn Mol Pathol* **11**, 193-203 (2002).
187. Sandberg, A.A. Cytogenetics and molecular genetics of bone and soft-tissue tumors. *Am J Med Genet* **115**, 189-93 (2002).
188. Ball, K.D. & Trevors, J.T. Bacterial genomics: the use of DNA microarrays and bacterial artificial chromosomes. *J Microbiol Methods* **49**, 275-84 (2002).
189. Sugimura, H. *et al.* Fluorescence in situ hybridization analysis with a tissue microarray: 'FISH and chips' analysis of pathology archives. *Pathol Int* **60**, 543-50 (2010).

190. Gerami, P. *et al.* Fluorescence in situ hybridization (FISH) as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Am J Surg Pathol* **33**, 1146-56 (2009).
191. Senetta, R., Paglierani, M. & Massi, D. Fluorescence in-situ hybridization analysis for melanoma diagnosis. *Histopathology* **60**, 706-14 (2012).
192. Gaiser, T. *et al.* Classifying ambiguous melanocytic lesions with FISH and correlation with clinical long-term follow up. *Mod Pathol* **23**, 413-9 (2010).
193. Vergier, B. *et al.* Fluorescence in situ hybridization, a diagnostic aid in ambiguous melanocytic tumors: European study of 113 cases. *Mod Pathol* **24**, 613-23 (2011).
194. Gammon, B., Beilfuss, B., Guitart, J. & Gerami, P. Enhanced detection of spitzoid melanomas using fluorescence in situ hybridization with 9p21 as an adjunctive probe. *Am J Surg Pathol* **36**, 81-8 (2012).
195. McCalmont, T.H. Fillet of FISH. *J Cutan Pathol* **38**, 327-8 (2011).
196. Isaac, A.K. *et al.* Polyploidy in spitz nevi: a not uncommon karyotypic abnormality identifiable by fluorescence in situ hybridization. *Am J Dermatopathol* **32**, 144-8 (2010).
197. Pouryazdanparast, P., Haghghat, Z., Beilfuss, B.A., Guitart, J. & Gerami, P. Melanocytic nevi with an atypical epithelioid cell component: clinical, histopathologic, and fluorescence in situ hybridization findings. *Am J Surg Pathol* **35**, 1405-12 (2011).
198. Gerami, P. *et al.* A highly specific and discriminatory FISH assay for distinguishing between benign and malignant melanocytic neoplasms. *Am J Surg Pathol* **36**, 808-17 (2012).
199. Gerami, P. *et al.* Fluorescence in situ hybridization as an ancillary method for the distinction of desmoplastic melanomas from sclerosing melanocytic nevi. *J Cutan Pathol* **38**, 329-34 (2011).
200. Pouryazdanparast, P. *et al.* Distinguishing epithelioid blue nevus from blue nevus-like cutaneous melanoma metastasis using fluorescence in situ hybridization. *Am J Surg Pathol* **33**, 1396-400 (2009).
201. Busam, K.J. *et al.* Distinction of conjunctival melanocytic nevi from melanomas by fluorescence in situ hybridization. *J Cutan Pathol* **37**, 196-203 (2010).
202. Dalton, S.R. *et al.* Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to distinguish intranodal nevus from metastatic melanoma. *Am J Surg Pathol* **34**, 231-7 (2010).
203. Newman, M.D. *et al.* Fluorescence in situ hybridization as a tool for microstaging in malignant melanoma. *Mod Pathol* **22**, 989-95 (2009).
204. Hilliard, N.J., Krahl, D. & Sellheyer, K. p16 expression differentiates between desmoplastic Spitz nevus and desmoplastic melanoma. *J Cutan Pathol* **36**, 753-9 (2009).
205. Bogdan, I., Burg, G. & Boni, R. Spitz nevi display allelic deletions. *Arch Dermatol* **137**, 1417-20 (2001).
206. Sini, M.C. *et al.* Molecular alterations at chromosome 9p21 in melanocytic naevi and melanoma. *Br J Dermatol* **158**, 243-50 (2008).
207. Tran, T.P., Titus-Ernstoff, L., Perry, A.E., Ernstoff, M.S. & Newsham, I.F. Alteration of chromosome 9p21 and/or p16 in benign and dysplastic nevi suggests a role in early melanoma progression (United States). *Cancer Causes Control* **13**, 675-82 (2002).



208. Pouryazdanparast, P. *et al.* Distinctive clinical and histologic features in cutaneous melanoma with copy number gains in 8q24. *Am J Surg Pathol* **36**, 253-64 (2012).
209. Gerami, P. *et al.* Copy number gains in 11q13 and 8q24 [corrected] are highly linked to prognosis in cutaneous malignant melanoma. *J Mol Diagn* **13**, 352-8 (2011).
210. Moore, D.A., Pringle, J.H. & Saldanha, G.S. Prognostic tissue markers in melanoma. *Histopathology* **60**, 679-89 (2012).
211. Gimotty, P.A. *et al.* Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* **23**, 8048-56 (2005).
212. Frahm, S.O., Schubert, C., Parwaresch, R. & Rudolph, P. High proliferative activity may predict early metastasis of thin melanomas. *Hum Pathol* **32**, 1376-81 (2001).
213. Salti, G.I. *et al.* Microphthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res* **60**, 5012-6 (2000).
214. Gould Rothberg, B.E. *et al.* Melanoma prognostic model using tissue microarrays and genetic algorithms. *J Clin Oncol* **27**, 5772-80 (2009).
215. Rakosy, Z. *et al.* EGFR gene copy number alterations in primary cutaneous malignant melanomas are associated with poor prognosis. *Int J Cancer* **121**, 1729-37 (2007).
216. Garraway, L.A. *et al.* Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* **436**, 117-22 (2005).
217. Ugurel, S. *et al.* Microphthalmia-associated transcription factor gene amplification in metastatic melanoma is a prognostic marker for patient survival, but not a predictive marker for chemosensitivity and chemotherapy response. *Clin Cancer Res* **13**, 6344-50 (2007).
218. Ryan, D. *et al.* Topoisomerase I amplification in melanoma is associated with more advanced tumours and poor prognosis. *Pigment Cell Melanoma Res* **23**, 542-53 (2010).
219. North, J.P. *et al.* Assessment of copy number status of chromosomes 6 and 11 by FISH provides independent prognostic information in primary melanoma. *Am J Surg Pathol* **35**, 1146-50 (2011).
220. Gammon, B., Ali, L., Guitart, J. & Gerami, P. Homogeneous staining regions for cyclin D1, a marker of poor prognosis in malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* **34**, 487-90 (2012).
221. Ferrara, G. *et al.* The influence of clinical information in the histopathologic diagnosis of melanocytic skin neoplasms. *PLoS One* **4**, e5375 (2009).
222. Gerami, P. *et al.* Superficial melanocytic neoplasms with pagetoid melanocytosis: a study of interobserver concordance and correlation with FISH. *Am J Surg Pathol* **34**, 816-21 (2010).
223. Gerami, P. *et al.* Sensitivity of fluorescence in situ hybridization for melanoma diagnosis using RREB1, MYB, Cep6, and 11q13 probes in melanoma subtypes. *Arch Dermatol* **146**, 273-8 (2010).

224. Morey, A.L., Murali, R., McCarthy, S.W., Mann, G.J. & Scolyer, R.A. Diagnosis of cutaneous melanocytic tumours by four-colour fluorescence in situ hybridisation. *Pathology* **41**, 383-7 (2009).
225. Kutzner, H. *et al.* Histological and genetic evidence for a variant of superficial spreading melanoma composed predominantly of large nests. *Mod Pathol* **25**, 838-45 (2012).
226. Newman, M.D., Mirzabeigi, M. & Gerami, P. Chromosomal copy number changes supporting the classification of lentiginous junctional melanoma of the elderly as a subtype of melanoma. *Mod Pathol* **22**, 1258-62 (2009).
227. Glatz-Krieger, K. *et al.* Anatomic site-specific patterns of gene copy number gains in skin, mucosal, and uveal melanomas detected by fluorescence in situ hybridization. *Virchows Arch* **449**, 328-33 (2006).
228. Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643-9 (1998).
229. Yamaura, M., Takata, M., Miyazaki, A. & Saida, T. Specific dermoscopy patterns and amplifications of the cyclin D1 gene to define histopathologically unrecognizable early lesions of acral melanoma in situ. *Arch Dermatol* **141**, 1413-8 (2005).
230. Al Dhaybi, R. *et al.* p16 expression: a marker of differentiation between childhood malignant melanomas and Spitz nevi. *J Am Acad Dermatol* **65**, 357-63 (2011).
231. Mason, A., Wititsuwannakul, J., Klump, V.R., Lott, J. & Lazova, R. Expression of p16 alone does not differentiate between Spitz nevi and Spitzoid melanoma. *J Cutan Pathol* **39**, 1062-74 (2012).
232. Tran, S.L. *et al.* Absence of distinguishing senescence traits in human melanocytic nevi. *J Invest Dermatol* **132**, 2226-34 (2012).
233. Altieri, D.C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer. *Oncogene* **22**, 8581-9 (2003).
234. Bondi, J. *et al.* Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome. *J Clin Pathol* **58**, 509-14 (2005).
235. Zhu, C.Q. *et al.* Amplification of telomerase (hTERT) gene is a poor prognostic marker in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* **94**, 1452-9 (2006).
236. Horn, S. *et al.* TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* **339**, 959-61 (2013).
237. Liao, J.Y. *et al.* TERT promoter mutation is uncommon in acral lentiginous melanoma. *J Cutan Pathol* **41**, 504-8 (2014).
238. Griewank, K.G. *et al.* TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst* **106**(2014).