

Universitat de Lleida

## **Evolució dels nevus melanocítics adquirits. Epidemiologia a la infància, biomarcadors de senescència i fenomen d'autoinvolució**

Sara Moreno Fernández

<http://hdl.handle.net/10803/461910>



*Evolució dels nevus melanocítics adquirits. Epidemiologia a la infància, biomarcadors de senescència i fenomen d'autoinvolució* està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 4.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Les publicacions incloses en la tesi no estan subjectes a aquesta llicència i es mantenen sota les condicions originals.

(c) 2017, Sara Moreno Fernández



## **TESI DOCTORAL**

### **EVOLUCIÓ DELS NEVUS MELANOCÍTICS ADQUIRITS. EPIDEMIOLOGIA A LA INFÀNCIA, BIOMARCADORS DE SENESCÈNCIA I FENOMEN D'AUTOINVOLUCIÓ**

Sara Moreno Fernández

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida  
Programa de Doctorat en Salut

Director/a  
Rosa Maria Martí Laborda

2017

Evolució dels nevus melanocítics adquirits.  
Epidemiologia a la infància, biomarcadors de senescència i fenomen d'autoinvolució

Sara Moreno Fernández

Tesi doctoral, Universitat de Lleida  
7 de Juliol del 2017

**Directora:** Dra. Rosa Maria Martí Laborda

**Tribunal:** Dr. Xavier Matías-Guiu  
Dr. Pedro Zaballos Diego  
Dra. Paula Aguilera Peiró

**Suplents:** Dra. Judit Pallarès Quixal  
Dra. Susana Puig Sardà

Portada: cèl·lules A375 del melanoma humà. Imatge de microscopia confocal del Departament de Fisiologia de la Universitat del País Basc publicada al juliol del 2011.



**Rosa Maria Martí Laborda**, Doctora en Medicina i Catedràtica de Dermatologia del Departament de Medicina de la Universitat de Lleida,

Faig constar que,

La Llicenciada en Medicina i Cirurgia per la Universitat Autònoma de Barcelona i Màster en Investigació Clínica en Medicina per la Universitat de Lleida, **Sara Moreno Fernández**, ha realitzat sota la meva direcció i supervisió, dins del Grup de Patologia Oncològica de la Universitat de Lleida, el treball experimental titulat **“Evolució dels nevus melanocítics adquirits. Epidemiologia a la infància, biomarcadors de senescència i fenomen d’autoinvolució”**

Que el treball reuneix les condicions adients per tal de poder ser defensat davant del Tribunal de Tesi corresponent i, si s’escau, obtenir el **Grau de Doctor** per la Universitat de Lleida.

I perquè així consti i als efectes oportuns signo el present document a

Lleida, 13 d’Abril de 2017



La meva ànima voldria enlairar-se,  
però el meu cos no la deixa sortir.  
És com si jo volgués allunyar-me de mi.

Però quan l'àngel o la musa m'inspiren  
sóc l'alè d'un exercit diví  
sóc la guspira, estel o carícia,  
guspira, estel o carícia  
per fi.

*Lletra de Guspira, estel o carícia.*  
*Mishima*



## AGRAÏMENTS

---

No hi ha prou espai aquí per esmenar a totes aquelles persones que d'una manera o una altra han col·laborat en aquesta tesi. Milions de petits i grans favors que, junts, han fet un munt! Gràcies a totes i tots aquells que m'han regalat ànims i alè!

Però no podria no aturar-me i fer un agraïment personal:

En primer lloc, agrair a les institucions que ens van atorgar les beques que han permès en part poder desenvolupar aquesta tesi. Gràcies al FEDER i al ISCIII pel suport al projecte PI1200260 dirigit per la Dra. Martí, a la Lliga contra el càncer de les comarques de Lleida "Una flor per un projecte 2006" i gràcies al IRBLleida i a la Diputació de Lleida que van premiar-me amb una beca pre-doctoral al final de la meva residència.

Al Dr. Josep Manel Casanova, que junt amb el Dr. Soria, va idear l'estudi que ha donat lloc al primer article de la tesi i per ser el principal impulsor per introduir-me en això de la "ciència".

Al Xavi, el meu tutor de residència. Trobo molt a faltar aquells dies de quiròfan que em deies: "Has escoltat això? Són boníssims...". Gràcies, perquè entre moltes altres coses, vas despertar la part vocacional de la dermatologia que pensava que no tenia.

A la meva directora de tesi, la Dra. Rosa Maria Martí, la "meva jefa". Hem tingut infinitat de contratemps i malgrat tot, estem aquí. Sé que t'has preocupat igual que jo perquè tot tirés endavant, i t'estic molt agraïda per no deixar-me llençar la tovallola. La teva capacitat de treball és inigualable. Però encara ho és més la teva entrega als teus. Gràcies per ensenyar-me a treballar amb rigor i cautela. Ha sigut un privilegi treballar al teu costat. He après molt de tu i t'agraeixo totes i cada una de les hores que m'has dedicat. Et trobaré molt a faltar Rous!

Al Servei de Dermatologia de l'Arnau en general, per acompanyar-me en els anys més enriquidors de la meva vida. Perquè vàreu ser la meva família.

Perquè he trobat tres persones meravelloses al "Dark Side". Vero, ets la millor. Gràcies per recolçar-me en tants moments! Manel, ja no tindrè ningú que em llenci les teves "floretes"...

A la Conxi, la Cris i la Pepi que em van cuidar com si fossin les meves mares.

Als meus R petits, l'Àlvar i la M<sup>a</sup>Reyes, sempre recordo moments amb somriures amb vosaltres.

Una menció especial a l'Àlvar i la Pepi que em van ajudar moltíssim i em van facilitar molt la tasca en tota la part de la SIAscòpia.



## AGRAÏMENTS

---

Amb aquesta tesi tanco una gran etapa, però sempre tindrè un record immens d'aquests magnífics anys.

A l'Òscar, aquesta tesi és també teva. Gràcies perquè has sigut les meves mans al laboratori. Gràcies pel teu entusiasme i el teu bon humor sempre, a pesar d'avassallar-te constantment amb mil peticions. A molta gent del IRBLleida i HUAV que han format part d'això: al Dr. Matías-Guiu, a la Sònia Gatus, la Maria Santacana, la Maria Ruiz, l'Ana Velasco, la Dolors Cuevas, la Marta Romero i a tots els bioestadístics (Montse Martínez, Joan Valls, Ramon Boix i Carla Barceló). A la Rosa Plana pel seu TFG. Un agraïment també als pediatres d'atenció primària que van col·laborar en la primera part de l'estudi. Moltes gràcies per la vostra inestimable ajuda.

Als meus amics. A les divines i els jaladors, els troglos y otras, la Gris i el Pau, l'Ardèvol. Als que m'anaven animant per seguir endavant, als que han intentat i a vegades aconseguit segrestar-me quan intentava fer feina i als que m'han comprés i acompanyat des del primer dia malgrat que jo no ho fes en determinats moments...Als teus 40 no fallo, Gris. Tinc molta sort d'estar rodejada de totes i tots vosaltres. Us estimo.

Al meu pare. Por inculcarme la cultura del esfuerzo y el sacrificio y enseñarme que con dedicación todo se puede conseguir.

A mon germà. Por hacer que me dé cuenta que no vale la pena preocuparse tanto por todo!

A ti mama. Por todo. Por no dejarme caer nunca, por entregar tu vida a tus hijos y por tu eterna paciencia y comprensión. Todos mis logros son tuyos. Nunca podré agradecerte suficiente.

A tu. Tu millor que ningú sap que no ha sigut gens fàcil arribar fins aquí. Gràcies per ajudar-me tant i per fer-ho en els pitjors moments. Gràcies per la teva tendresa i la teva infinita paciència. Per confiar sempre en mi. Gràcies per voler-me ensenyar el que de veritat importa.

Als pacients, co-autors anònims d'aquesta tesi.



# Resum



Un dels factors de risc més importants pel desenvolupament del melanoma és la presència de nevus. El desenvolupament dels nevus melanocítics adquirits és un procés dinàmic que es pot dividir en tres etapes: el creixement, una aturada de creixement per un possible mecanisme de senescència i la involució o desaparició del nevus. L'estudi de l'evolució dels nevus melanocítics adquirits pot ajudar no només a aclarir la història natural d'aquests sinó també a la comprensió de la melanomagènesi.

Per aquest motiu hem realitzat un treball que es divideix en tres parts: epidemiologia dels nevus infantils, estudi sobre mutació de *BRAF* i biomarcadors de senescència i, finalment, descripció del fenomen d'autoinvolució.

L'estudi epidemiològic dels nevus adquirits a la infància va confirmar la importància de diversos factors de risc, ja descrits prèviament, associats amb la seva aparició (edat, sexe, fototipus i exposició solar) i, de forma original, va recolzar el paper protector dels filtres solars en el seu desenvolupament. En el segon treball, es va detectar immunopositivitat per *BRAF/V600E* en el 60% dels nevus comuns (NMCA) i el 35% dels displàsics (ND). El patró dermatoscòpic reticular va mostrar menor expressió de *BRAF/V600E*. Els ND van mostrar nivells significativament més alts de *hTERT* i més baixos de *pRB* que els NMCA, però tan sols en els nevus de patró dermatoscòpic multicomponent es va detectar significativament menor expressió de *p16* i *PTEN*. El patró dermatoscòpic de glòbuls perifèrics va mostrar el major nivell de *Ki67*, *hTERT* i *BRAF/V600E*. En conjunt, la dermatoscòpia va proporcionar informació addicional sobre la biologia dels nevus a l'obtinguda per la classificació histopatològica. En el darrer estudi vàrem demostrar que la involució dels nevus és un fenomen comú en els pacients amb síndrome dels nevus displàsic en seguiment mitjançant SIAscòpia. Sol ser un procés lent, més freqüent en nevus de patró reticular i localitzats al tronc. Histològicament, es caracteritza per escàs infiltrat inflamatori i melanofàgia, fibrosi delicada i augment de vasos i a nivell immunohistoquímic, sembla que ni la presència de marcadors clàssics (*CD4* i *CD8*) o resposta citotòxica (*granzima B* i *TIA-1*), d'inhibidors de cèl·lules T (*FoxP3* i *PD1*) o de cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (*CD123*) serien definitoris d'aquest fenomen.



**RESUM BREU:** El desenvolupament dels nevus melanocítics adquirits es pot dividir en tres etapes: el creixement, una aturada de creixement per un possible mecanisme de senescència i la involució o desaparició del nevus. Hem realitzat un treball que es divideix en tres parts: epidemiologia dels nevus infantils, estudi sobre mutació de BRAF i biomarcadors de senescència i descripció del fenomen d'autoinvolució. L'originalitat principal de l'estudi epidemiològic dels nevus adquirits a la infància va ser recolzar el paper protector dels filtres solars en el seu desenvolupament. En el segon treball vàrem demostrar que la dermatoscòpia proporciona informació addicional sobre la biologia dels nevus (immunoexpressió de BRAF/V600E i marcadors de senescència) a l'obtinguda per classificació histopatològica convencional. En el darrer estudi vàrem comprovar que el fenomen d'involució és molt freqüent en pacients amb síndrome del nevus displàsic; sol ser lent i més comú a lesions amb patró reticular i localitzades al tronc. Histològicament, es caracteritza per escàs infiltrat inflamatori i melanofàgia, fibrosi delicada i augment de vasos.

**RESUMEN BREVE:** El desarrollo de nevus melanocíticos adquiridos se puede dividir en tres etapas: el crecimiento, una parada del crecimiento por un posible mecanismo de senescencia y la involución o desaparición del nevus. Hemos realizado un trabajo que se divide en tres partes: epidemiología de los nevus infantiles, estudio sobre mutación de BRAF y biomarcadores de senescencia y descripción del fenómeno de autoinvolución. La originalidad principal del estudio epidemiológico de los nevus adquiridos en la infancia fue avalar el papel protector de los filtros solares en su desarrollo. En el segundo trabajo demostramos que la dermatoscopia proporciona información adicional sobre la biología de los nevus (immunoexpresión de BRAF/V600E y marcadores de senescencia) a la obtenida por la clasificación histopatológica convencional. En el último estudio comprobamos que el fenómeno de involución es muy frecuente en pacientes con síndrome del nevus displásico; suele ser lento y más común en lesiones con patrón reticular y localizadas en el tronco. Histológicamente, se caracteriza por escaso infiltrado inflamatorio y melanofagia, fibrosis delicada y aumento de vasos.

**SHORT ABSTRACT:** The development of acquired melanocytic nevi can be divided into three stages: growth, growth arrest through a possible senescence mechanism and involution or disappearance of nevus. Our work is divided into three parts: epidemiology of children nevi, study of BRAF mutation and senescence biomarkers and description of the involution phenomenon. The originality of the epidemiological survey was to support the protective role of sunscreens in the development of nevi during childhood. In the second study, we demonstrated that dermoscopy provides additional information on nevus biology (immunoexpression of BRAF/V600E and senescence biomarkers) to that obtained by conventional histopathological classification. In the last investigation we found that the phenomenon of involution is very common in patients with dysplastic nevus syndrome; usually slower and more common in reticular pattern and trunk located nevi. Histologically, it is characterized by sparse inflammatory infiltrate and melanophagia, delicate fibrosis and vessel increase.





# Abreviatures



## ABREVIATURES

---

<b>Casp3A</b>	Caspasa 3 activada
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calci ionitzat
<b>DAB</b>	Diaminobenzidina
<b>DE</b>	Desviació estàndard
<b>EDTA</b>	Àcid etilendiamintetraacètic
<b>E6/E7</b>	Oncogens del virus del papil·loma humà 16
<b>FPS</b>	Factor de protecció solar
<b>GC/RP</b>	Patró globular o àrea marró sense estructura central i reticle perifèric
<b>hTERT</b>	Enzim telomerasa
<b>IC</b>	Interval de confiança
<b>IHC</b>	Immunohistoquímica
<b>MLG</b>	Models lineals generalitzats
<b>NC</b>	Nevus compost
<b>NCA</b>	Nevus clínicament atípic
<b>ND</b>	Nevus displàsic
<b>NI</b>	Nevus intradèrmic
<b>NJ</b>	Nevus juntural
<b>NMCA</b>	Nevus melanocític comú adquirit
<b>OR</b>	<i>Odds ratio</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	<i>Polimerase chain reaction</i>
<b>pRB</b>	Proteïna del retinoblastoma
<b>PTEN</b>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
<b>Q</b>	Quantitat
<b>RC/GP</b>	Reticle o àrea marró sense estructura central i glòbuls perifèrics
<b>RIQ</b>	Rang interquartil
<b>R-G/R-E</b>	Retículo-globular/retículo-empedrat
<b>SIAscòpia</b>	<i>Spectrophotometric Intracutaneous Analysis</i>
<b>SNPs</b>	<i>Single-nucleotide polymorphisms</i>
<b>SV40</b>	Virus tumorogènic SV40
<b>TMA</b>	<i>Tissue microarrays</i>
<b>Tris-Hcl</b>	<i>Tris-hydrochloride</i>
<b>SWA</b>	<i>Swimwear area</i>
<b>VE1</b>	Anticòs anti-BRAF

## ABREVIATURES

---

**WT**      *Wild type*



<b>PRÒLEG</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>5</b>
<b>1. ELS NEVUS MELANOCÍTICS</b>	
1.1. Concepte	5
1.2. Nevus melanocítics comuns adquirits	5
1.3. Nevus clínicament atípics, displàsics o de Clark	7
<b>2. LA DERMATOSCÒPIA</b>	<b>10</b>
2.1. Mètode de diagnòstic dermatoscòpic en 2 etapes	12
2.2. L'anàlisi de patrons	14
2.3. Característiques dermatoscòpiques dels NMCA	19
2.4. Característiques dermatoscòpiques dels NCA	20
<b>3. LA SIASCÒPIA</b>	<b>22</b>
<b>4. ELS CANALS DE CALCI DE TIPUS T EN LES PROLIFERACIONS MELANOCÍTQUES BENIGNES I MALIGNES</b>	<b>26</b>
<b>5. HISTÒRIA NATURAL DELS NEVUS MELANOCÍTICS ADQUIRITS</b>	
5.1. Epidemiologia i evolució clínica dels nevus melanocítics adquirits	29
5.2. Bases moleculars de la nevogènesi	32
5.3. La involució dels nevus melanocítics adquirits	42
<b>6. ANÀLISI IMMUNOHISTOQUÍMIC PER A LA DETECCIÓ DE LA MUTACIÓ BRAF/V600E</b>	<b>50</b>
<b>HIPÒTESIS</b>	<b>53</b>
<b>OBJECTIUS</b>	<b>57</b>
<b>MATERIAL I MÈTODES</b>	
TREBALL 1: Epidemiologia dels nevus a la infància a la Regió Sanitària de Lleida	61
TREBALL 2: Immunoexpressió diferencial de marcadors de senescència, gens supressors de tumors, BRAF/V600E i canals de calci de tipus T en nevus adquirits d'acord amb la seva classificació histopatològica i dermatoscòpica	65
TREBALL 3: Estudi del fenomen d'autoinvolució	73
<b>RESULTATS</b>	
<b>TREBALL 1: Epidemiologia dels nevus a la infància a la Regió Sanitària de Lleida</b>	
1.1. Recompte total de nevus i distribució regional dels nevus	82
1.2. L'ús de fotoprotector i l'exposició solar	86
1.3. Recompte de nevus en relació amb el fototipus i les cremades solars	86
1.4. L'anàlisi multivariant	87

**TREBALL 2: Immunoexpressió diferencial de marcadors de senescència, gens supressors de tumors, BRAF/V600E i canals de calci de tipus T en nevus adquirits d'acord amb la seva classificació histopatològica i dermatoscòpica**

2.1. Característiques clíniques dels pacients i els nevus	90
2.2. Característiques dermatoscòpiques del nevus	90
2.3. Resultats de l'estudi immunohistoquímic	92
2.4. Estat mutacional de <i>BRAF</i> en la sèrie de nevus i melanomes per seqüenciació directa del gen mitjançat Sanger i/o Cobas	93
2.5. Correlació entre les característiques clíniques i la classificació dels nevus segons criteris histopatològics i dermatoscòpics	95
2.6. Correlació entre les diferents classificacions (histològiques vs dermatoscòpiques)	100
2.7. Associació entre les característiques dermatoscòpiques locals i els diferents grups de les classificacions dermatoscòpiques i histològiques	102
2.8. Positivitat per BRAF/V600E en els diferents tipus de nevus	110
2.9. Immunoexpressió diferencial dels biomarcadors estudiats entre els grups de nevus de les diferents classificacions histopatològiques i dermatoscòpiques	115

**TREBALL 3: Estudi del fenomen d'autoinvolució**

3.1. Estudi descriptiu segons imatges de SIAscòpia del fenomen d'autoinvolució en pacients amb síndrome del nevus amb atípia clínica que es trobaven sota seguiment digital en aquest sistema	121
3.2. Estudi descriptiu de les característiques dermatoscòpiques, estudi histopatològic i immunohistoquímic dels nevus en autoinvolució	128

**DISCUSSIÓ**

TREBALL 1: Epidemiologia dels nevus a la infància a la Regió Sanitària de Lleida	139
--	-----

TREBALL 2: Immunoexpressió diferencial de marcadors de senescència, gens supressors de tumors, BRAF/V600E i canals de calci de tipus T en nevus adquirits d'acord amb la seva classificació histopatològica i dermatoscòpica	145
--	-----

**TREBALL 3: Estudi del fenomen d'autoinvolució**

3.1. Estudi descriptiu segons imatges de SIAscòpia del fenomen d'autoinvolució en pacients amb síndrome del nevus amb atípia clínica que es trobaven sota seguiment digital en aquest sistema	154
3.2. Estudi descriptiu de les característiques dermatoscòpiques, estudi histopatològic i immunohistoquímic dels nevus en autoinvolució	159

<b>CONCLUSIONS</b>	<b>165</b>
--------------------	------------

<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>169</b>
---------------------	------------

<b>ANNEX</b>	<b>179</b>
--------------	------------

1. Interpretació dels diferents colors que es poden observar mitjançant la imatge dermatoscòpica
2. Característiques clíniques i demogràfiques de la població a estudi (N=369)
3. Presència de nevus en cada àrea anatòmica estratificat per edat
4. Densitat de nevus melanocítics per àrea anatòmica i edat en la mostra de nens de 4, 8 i 14 anys d'edat
5. Densitat de nevus melanocítics per àrea anatòmica, edat i sexe en la mostra de nens de 4, 8 i 14 anys d'edat
6. Ús de protector solar estratificat per edat en la mostra de nens de 4, 8 i 14 anys d'edat
7. Número total de nevus melanocítics comuns segons els fototipus
8. Número de nevus comuns segons si ha patit cremades, amb o sense butllofes
9. Anàlisi multivariant dels factors associats a nevus melanocítics en la mostra de nens de 4, 8 i 14 anys d'edat
10. Mesures d'associació significatives multivariants (després de comprovar l'efecte de confusió).
11. Anàlisi d'immunoexpressió entre els casos positius (V600E) i negatius (WT/V600K)
12. Sensibilitat i especificitat de la immunotinció amb VE1 considerant un punt de tall de l'*histoscore* de 45/300
13. Sensibilitat i especificitat de la immunotinció amb VE1 considerant un punt de tall de l'*histoscore* de 110/300
14. Anàlisi d'homogeneïtat entre els 2 tipus histopatològics de nevus (NMCA vs displàsic) en relació al sexe, edat, localització, tipus de fotoexposició i àrea (mida) del nevus
15. Distribució dels nevus segons el patró dermatoscòpic global de l'anàlisi de patrons (globular/en empedrat, inespecífic, multicomponent, reticular, mixt R-G/R-E) en quant a sexe, edat, localització, fotoexposició solar i mida de l'àrea de nevus
16. Distribució dels nevus segons el patró dermatoscòpic de la classificació de I. Zalaudek (globular/en empedrat, GC/RP, reticular, RC/GP) en quant a sexe, edat, localització, fotoexposició solar i mida de l'àrea de nevus
17. Avaluació de la comparació entre les diferents classificacions de nevus (histològiques vs dermatoscòpiques)
18. Avaluació de l'associació entre les característiques dermatoscòpiques locals amb les categories de la classificació dermatoscòpica basada en els patrons globals de l'anàlisi de patrons
19. Avaluació de l'associació entre les característiques dermatoscòpiques locals amb les categories de la classificació dermatoscòpica segons els patrons definits per I. Zalaudek
20. Avaluació de l'associació entre les característiques dermatoscòpiques locals amb les 2 categories de la classificació histopatològica, NMCA i nevus displàsics
21. Avaluació de l'associació entre les característiques dermatoscòpiques locals amb les 4 categories de la classificació histopatològica, nevus junturals, compostos, intradèrmics i displàsics
22. Mutació *BRAF/V600E* determinada per seqüenciació als NMCA vs nevus displàsics
23. Mutació *BRAF/V600E* determinada per seqüenciació als 4 tipus diferents de nevus adquirits
24. Mutació *BRAF/V600E* determinada per immunohistoquímica als NMCA vs nevus displàsics
25. Mutació *BRAF/V600E* determinada per immunohistoquímica als 4 tipus diferents de nevus adquirits
26. *Histoscore* de la immunotinció de *BRAF/V600E* mitjançant l'anticòs VE1 als NMCA vs nevus displàsics
27. *Histoscore* de la immunotinció de *BRAF/V600E* mitjançant l'anticòs VE1 als 4 grups histològics de nevus adquirits
28. *Histoscore* de la immunotinció de *BRAF/V600E* mitjançant l'anticòs VE1 als grups dermatoscòpics de nevus adquirits classificats segons els patrons globals
29. *Histoscore* de la immunotinció de *BRAF/V600E* mitjançant l'anticòs VE1 als grups dermatoscòpics de nevus adquirits classificats segons els patrons de I. Zalaudek



- 30.** Immunoexpressió diferencial dels biomarcadors estudiats entre els grups de NMCA vs nevus displàsics
- 31.** Immunoexpressió diferencial dels biomarcadors estudiats entre els 4 grups histopatològics de nevus adquirits
- 32.** Immunoexpressió diferencial dels biomarcadors estudiats entre els grups dermatoscòpics de nevus classificats pel seu patró global
- 33.** Immunoexpressió diferencial dels biomarcadors estudiats entre els grups dermatoscòpics de nevus classificats segons els patrons definits per I. Zalaudek
- 34.** Recull de les principals característiques dermatoscòpiques dels nevus en autoinvolució
- 35.** Resum de les característiques histològiques més significatives
- 36.** Estudi dels biomarcadors relacionats amb involució en casos i controls
- 37.** Correlació de la caspasa 3 activada amb els diferents biomarcadors immunohistoquímics en els casos i controls

1. Tipus de nevus melanocítics comuns adquirits
2. Característiques clíniques dels nevus atípics
3. Estructures dermatoscòpiques dels tumors melanocítics
4. Algoritmes diagnòstics del mètode de diagnòstic en 2 etapes
5. Modalitats per a la detecció del melanoma
6. Imatge il·lustrativa del siascop
7. Siagràfics
8. Augment progressiu de canals de calci de tipus T des dels melanòcits de la pell normal al melanoma
9. Distribució total dels nevus per edats ( $p < 0.05$ )
10. Resum de les mutacions més freqüents en nevus congènits, d'Spitz, adquirits i nevus blau
11. Locus *CDKN2A*
12. El model de senescència cel·lular amb M1 i M2
13. El model de Clark de progressió del melanoma
14. Els quatre patrons dermatoscòpics més freqüents i la seva correlació histopatològica
15. Patró dermatoscòpic dels nevus relacionat amb l'edat
16. Resum esquemàtic de la teoria dual de la nevogènesi
17. Diferents mecanismes de regressió o involució dels nevus melanocítics
18. Construcció de TMA
19. Comparació entre el número de nevus/àrea anatòmica dins de cada grup d'edat (4, 8 i 14 anys d'edat)
20. Distribució de nevus melanocítics (MN) segons la densitat per àrea anatòmica, l'edat i el sexe en una mostra de nens de 4, 8 i 14 anys d'edat
21. Patrons dermatoscòpics globals
22. Patrons dermatoscòpics segons I. Zalaudek
23. Característiques dermatoscòpiques locals
24. Exemples de les tincions immunohistoquímiques en els nevus
25. Immunoexpressió dels casos positius (V600E) i negatius (WT/V600K)
26. Sensibilitat i especificitat de la immunotinció amb VE1 segons els dos possibles punts de tall
27. Immunoexpressió de BRAF/V600E en diferents subtipus histològics
28. Immunoexpressió de BRAF/V600E en nevus de diferent patró global
29. Immunoexpressió de Cav 3.1 i hTERT
30. Immunoexpressió de PTEN i p16
31. Tincions immunohistoquímiques de nevus amb patró RC/GP (reticle central/glòbuls perifèrics).
32. Tipus de despigmentació
33. Canvi de pigmentació de la melanina dèrmica
34. Exemple de siagràfics d'un nevus en autoinvolució
35. Tinció immunohistoquímica de cèl·lules T CD4+ i CD8+ en l'infiltrat inflamatori d'un nevus en autoinvolució
36. Tincions immunohistoquímiques en nevus en autoinvolució
37. Tincions immunohistoquímiques en nevus en autoinvolució
38. Tinció FoxP3
39. Tinció de la Caspasa 3 activada
40. Quantitat d'infiltrat inflamatori
41. Correlació entre la quantitat d'infiltrat inflamatori i la caspasa activada
42. Nevus en autoinvolució



# Pròleg



El **melanoma cutani** és el tumor maligne que deriva dels melanòcits de la pell. Com succeeix amb altres càncers cutanis, la seva incidència s'està incrementant en els últims anys a un ritme molt important en la població caucàsica d'arreu del món amb un total de 232.000 nous casos mundials entre homes i dones, el que suposa un increment anual del 1,6% segons dades del GLOBOCAN 2012. Encara que no és ni molt menys la més freqüent de les neoplàsies cutànies malignes (aproximadament l'1%), el melanoma és, amb diferència, el càncer de pell que produeix major mortalitat (1). Les cèl·lules de melanoma tenen una alta capacitat d'invasió i de metastasi local i a distància, fins i tot quan sorgeixen de tumors de volum molt petit (2). Una vegada que el melanoma s'ha disseminat, és altament resistent als tractaments convencionals contra el càncer, el que li confereix un mal pronòstic (3). Per altra part, el melanoma pot afectar a adults d'edat jove i mitjana (4,5) causant una mortalitat desproporcionada en aquesta població, ja que és responsable d'una de les taxes més altes de pèrdua de vida potencial per càncer als adults (6). Tot i que els tractaments disponibles per al melanoma metastàtic han millorat considerablement en els darrers anys, especialment amb la introducció de teràpies contra dianes terapèutiques i immunològiques (7), el melanoma cutani segueix constituint un problema seriós de salut pública.

El melanoma pot aparèixer "de novo" sobre pell normal o bé sobre una proliferació melanocítica benigna (nevus melanocític) preexistent, ja sigui adquirida o congènita. De fet, histològicament, en el 20-40% dels casos de melanoma es pot identificar un nevus melanocític en continuïtat que, amb freqüència, comparteix la mateixa mutació (8). Sabem que un nombre elevat de nevus melanocítics és un dels tres factors de risc més importants en el desenvolupament del melanoma (junt amb l'exposició a la radiació ultraviolada i tenir la pell clara i facilitat per cremar-se).

La infància i l'adolescència són un moment important de la vida pel desenvolupament i l'evolució dels nevus, i la presència d'un major número de nevus en els primers anys de vida podria predir un major risc de desenvolupar melanoma (9-14). També hi ha una relació risc-lloc específic; una alta densitat de nevus en una regió anatòmica específica implica un major risc de desenvolupar melanoma en aquesta regió (14,15). A més, un patró de distribució atípica de nevus i la presència de nevus atípics/displàsics sabem que constitueixen marcadors de risc per desenvolupar melanoma (14, 16, 17). Finalment, a banda dels factors

ambientals (radiació UV), els nevus adquirits i el melanoma comparteixen factors genètics comuns en la seva etiopatogènia. Per exemple, determinats polimorfismes genètics poden estar implicats tant en el número i distribució de nevus com en el risc de desenvolupar melanoma (18-22).

Tots aquests motius són els que han generat el nostre interès en l'epidemiologia i el comportament biològic del nevus melanocític.

# Introducció





## 1. ELS NEVUS MELANOCÍTICS

### 1.1. Concepte

La paraula *nevus*, que prové del llatí *Naevus*, no s'aplica tan sols als nevus melanocítics, sinó que es va començar a utilitzar, i es continua utilitzant, per designar lesions malformatives circumscrites de la pell o de les mucoses degudes a un desenvolupament exagerat o una hipertròfia de diferents components de les mateixes. Així podem trobar nevus de substrat molt variat com nevus epidèrmics, nevus sebacis, nevus connectius, nevusacròmics, nevus anèmics, etc.... i nevus melanocítics.

Els nevus melanocítics estan constituïts per agregats de cèl·lules d'estirp melanocítica que, en aquest context, reben el nom de cèl·lules nèviques.

Malgrat la definició inicial de *nevus* com una lesió congènita del nouat, l'expressió "nevus melanocític" s'ha acabat aplicant, per extensió, també a les proliferacions benignes melanocítiques adquirides. De manera que ara, quan diem simplement *nevus*, normalment ens referim als nevus melanocítics, ja sigui en la seva vessant congènita o adquirida.

Tenim així, **nevus melanocítics congènits**, que es classifiquen segons la seva mida i **nevus melanocítics adquirits**, del quals els més freqüents són els nevus melanocítics comuns adquirits, a més del nevus displàsic (clínicament atípic o nevus de Clark), el nevus blau, el nevus de Spitz/Reed en la seva versió eritematosa i pigmentada i altres (23).

### 1.2. Nevus melanocítics comuns adquirits

Els **nevus melanocítics comuns adquirits (NMCA)**, també anomenats típics, són els tumors cutanis benignes més freqüents en pacients de raça blanca, podent afirmar que en un nombre més o menys important es troben a tots els individus. Solen ser múltiples. Apareixen després del naixement, ja durant la primera dècada de la vida, i de forma més

important, a la segona i tercera dècades. Augmenten de mida de manera lenta i simètrica fins que s'estabilitzen i, després d'un període, poden involucionar.

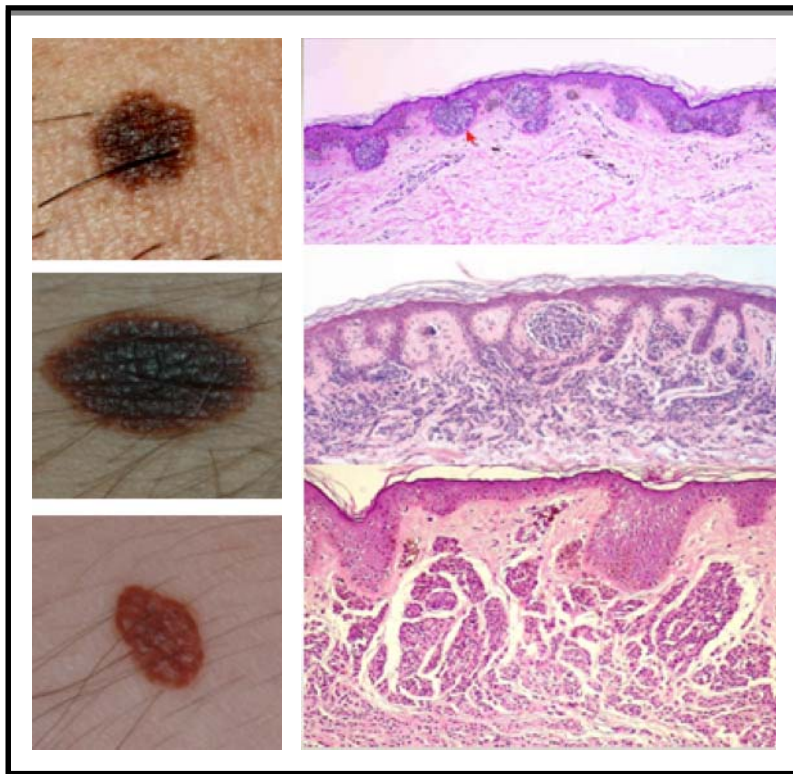
### **1.2.1. Característiques clíniques i classificació histopatològica dels nevus melanocítics comuns adquirits**

Les característiques clíniques dels NMCA varien de forma considerable. Generalment, el seu aspecte a simple vista és uniforme. Les lesions tenen forma rodona o oval, contorn regular i vores relativament ben definides, una superfície i un patró de coloració homogenis, i una mida que no supera 1cm de diàmetre (sovint <5mm). Els NMCA poden ser maculars, maculopapulars o papulars (abovedats o pediculats, de superfície llisa o papil·lomatososa). Acostumen a ser marrons (ja que provenen de cèl·lules que sintetitzen melanina), encara que també poden ser rosats o del color de la pell. Els nevus més elevats tendeixen a tenir pigmentació més clara, i els més plans, més fosca. Són de consistència elàstica, com de goma, i no solen tenir un tacte raspós, a diferència de la majoria de tumors epitelials, que produeixen queratina. A diferència del melanoma (que es caracteritza per la policromia), sovint són d'un sol color o no presenten més de dos (amb freqüència marró clar i marró fosc) (23).

Segons la teoria clàssica de l'evolució dels nevus (teoria de Unna), la majoria dels nevus melanocítics s'inicien per una proliferació dels melanòcits normalment presents al llarg de la unió dermoepidèrmica, que s'agrupen formant "teques" o nius a aquest nivell. En aquesta fase, en què es denominen des del punt de vista histològic com **nevus melanocítics junturals o de la unió**, les lesions són clínicament maculars i mostren diferents graus d'hiperpigmentació.

A mesura que la lesió evoluciona, els nius de melanòcits ja no estan situats només a la unió dermoepidèrmica, sinó que també s'observen teques de cèl·lules nèviques a la dermis superficial. Parlem llavors de **nevus melanocítics compostos**, amb un component juntural i un altre intradèrmic. En aquesta fase les lesions són clínicament més elevades i adquireixen la morfologia d'una pàpula simètrica de superfície lleugerament papil·lomatososa, amb pigmentació homogènia i vores regulars i llises.

En lesions més evolucionades, les cèl·lules nèviques es troben únicament situades en l'espessor de la dermis i el component juntural es perd per complet. Histològicament es classifiquen com **nevus melanocítics intradèrmics**. Alguns d'ells perden la capacitat de sintetitzar melanina pel que clínicament adquireixen el color de la pell normal. Són lesions exofítiques, que a vegades presenten una morfologia pediculada, i poden ser de superfície llisa (tipus Unna) o papil·lomatososa (tipus Miescher) (24) (**figura 1**).



**Figura 1. Tipus de nevus melanocítics comuns adquirits.** Es mostren els diferents tipus de nevus melanocítics adquirits (juntural, compost, intradèrmic) segons la teoria evolutiva de Unna.

### 1.3. Nevus clínicament atípics o displàsics

Els **nevus clínicament atípics (NCA)** (25), **malgrat ser proliferacions melanocítiques adquirides benignes**, comparteixen algunes característiques clíniques amb el melanoma. Es caracteritzen per ser màculo-pàpules, majors de 5 mil·límetres de diàmetre, amb vores irregulars o mal definides, que presenten una pigmentació desigual i una certa asimetria (**figura 2**).

---

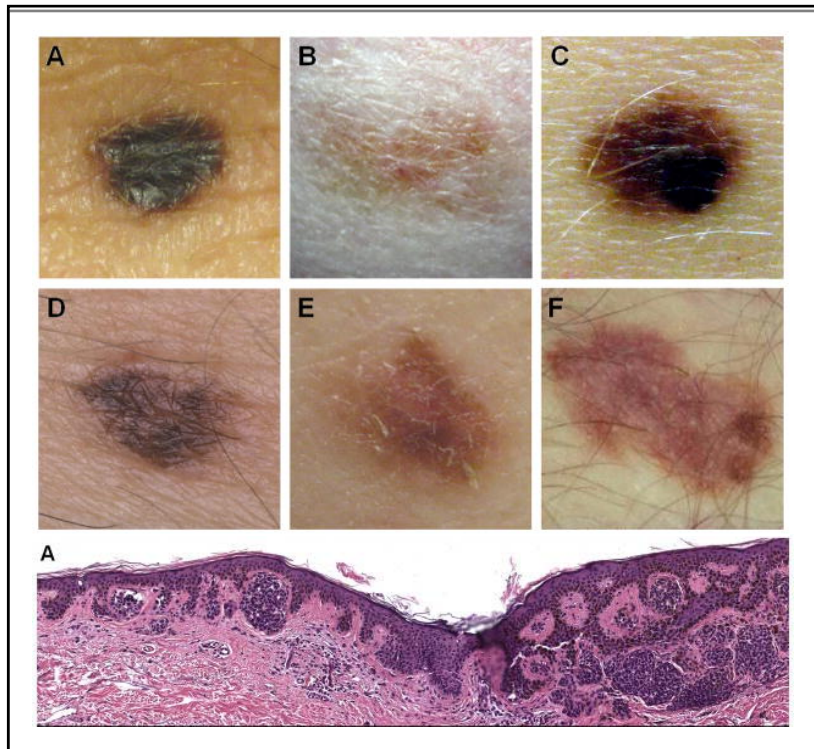
Avui en dia es consideren marcadors de risc per desenvolupar melanoma, tot i que la majoria d'aquestes lesions mai malignitzaran. Els pacients amb 1 NCA tenen un risc 1,5 vegades major que la població general de desenvolupar un melanoma al llarg de la seva vida, que augmenta fins a 10 vegades en els pacients amb més de 5 NCA. En el cas d'aparició d'un melanoma, aquest pot desenvolupar-se sobre un NCA previ o sobre pell normal.

En l'estudi histopatològic d'aquest tipus de nevus, descrit per Clark, s'observa una proliferació de melanòcits, habitualment agrupats en forma de nius o teques a la unió dermoepidèrmica i/o la dermis. Les cèl·lules tenen aspecte epiteloide i/o fusocel·lular i cert grau d'atípia citològica que es manifesta amb una mida major de la normal, pleomorfisme i hiper cromia nuclear. També existeixen alteracions estructurals consistents en un patró de creixement lentiginós de l'epidermis, fusió d'algunes crestes epidèrmiques i fibroplàsia laminar.

Encara que molts dels nevus que presenten atípia clínica tenen les característiques histopatològiques de displàsia descrites per Clark, no sempre es troba una correcta correlació clinicopatològica i el terme "nevus displàsic" ha estat molt discutit i, inclús, per alguns autors, s'hauria d'abandonar. Altres autors defensen utilitzar la nomenclatura de "nevus clínicament atípic" per assenyalar aquells nevus amb característiques d'atípia des del punt de vista clínic i la de "nevus displàsic" per a aquells nevus amb característiques atípiques des del punt de vista histopatològic. Altres prefereixen utilitzar la nomenclatura "nevus de Clark".

Parlem de **síndrome del nevus displàsic** o **del nevus amb atípia clínica** quan el pacient és portador d'un nombre elevat de nevus melanocítics (habitualment més de 50 en edat puberal o més de 100 en edat adulta) i presenta alguns NCA. La síndrome del nevus displàsic pot ser esporàdica o hereditària i augmenta la predisposició al desenvolupament de melanoma. El risc és molt més alt si el pacient té antecedents personals de melanoma, especialment si ha tingut més d'un melanoma (melanoma múltiple), si hi ha algun cas previ de melanoma a la família o si pertany a una família d'alt risc de melanoma (melanoma familiar), en el que s'anomena **síndrome del nevus displàsic o amb atípia clínica i melanoma**

**familiar.** En aquest últim cas, la probabilitat acumulativa de presentar un melanoma arriba fins a un 49% als 50 anys d'edat i a un 82% als 72 anys.



**Figura 2. Característiques clíniques dels nevus atípics.** S'observen vores irregulars i pigmentació variable en moltes d'aquestes lesions. A la imatge inferior es mostren les característiques histològiques dels nevus displàsics (26).

## 2. LA DERMATOSCÒPIA

La dermatoscòpia també anomenada microscopia d'epiluminiscència és una tècnica diagnòstica no invasiva que permet observar estructures de l'epidermis i de la dermis, que són invisibles a simple vista, mitjançant un sistema òptic d'amplificació de la imatge i una font d'il·luminació que disminueix l'índex de reflexió i refracció de la capa còrnia (27-30).

Per aconseguir aquest efecte, els primers aparells dissenyats utilitzaven una font de llum que incidia sobre la superfície cutània amb un angle de 20 graus i una lent de contacte de 10-40 augments que es col·locava sobre la pell a través d'una interfase líquida que eliminava el reflex de la llum a la capa còrnia. Com interfase líquida es podien utilitzar substàncies diverses, com ara oli, aigua, gel, alcohol-gel o glicerina. Els nous dermatoscopis de llum polaritzada aconseguen un efecte òptic similar, sense requerir la interfase fluïda, el que els fa molt més còmodes. Els dos sistemes tenen avantatges i inconvenients, de manera que alguns dermatòlegs segueixen combinant ambdues tècniques en la seva pràctica clínica. L'ampliació habitual proporcionada pels dermatoscopis manuals és de 10 augments, però en dermatoscops digitals s'empren ja dispositius de fins a 70 augments amb bona definició de la imatge.

Les estructures cutànies que permet visualitzar la dermatoscòpia són aquelles que posseeixen color, pel que és especialment útil per al diagnòstic diferencial de les lesions pigmentades (que contenen fonamentalment melanina) i per al reconeixement dels patrons vasculars (per la presència d'hemoglobina en els glòbuls vermells dels vasos sanguinis) (**taula 1**). L'observació de la combinació d'ambdues característiques, pigment melànic i hemoglobina, conformant diverses estructures, amb variacions pel que fa a presència o absència, tonalitat, forma, mida, número, localització, distribució, etc. És el que ha portat a definir les característiques dermatoscòpiques típiques i recognoscibles en les diferents varietats de lesions cutànies.

Taula 1. Interpretació dels diferents colors que es poden observar mitjançant la imatge dermatoscòpica

COLOR	INTERPRETACIÓ
Negre	Melanina localitzada en estrat corni i capes superiors de l'epidermis
Diferents tonalitats de marró	Melanina a l'epidermis i la unió dermoepidèrmica
Blau-gris	Melanina a dermis papilar
Blau acer	Melanina a dermis reticular
Blanc	Fibrosi (blanc més clar que el de la pell del voltant)
Vermell	Hemoglobina

L'origen i desenvolupament de la dermatoscòpia des dels primers treballs recollits al segle XVII fins l'actualitat s'entén per l'interès de visualitzar *in vivo* les lesions de la pell i millorar el seu diagnòstic. Al 1655, Peter Borrelus i, 8 anys més tard, Christophorus Kolhaus van observar la imatge dels capil·lars del llit ungueal mitjançant un microscopi (31). Dos segles més tard, el 1878, Abbe va suggerir les avantatges de l'aplicació d'oli d'immersió per millorar la imatge, avantatge que va utilitzar Unna en 1893 per a l'avaluació de lesions cutànies (30,32). El primer treball exhaustiu sobre les possibles aplicacions dermatològiques de la tècnica consta de 4 publicacions i l'hi devem a Johann Saphier (33-36). A més, Saphier va ser el primer autor que va encunyar el terme de "Dermatoscòpia" amb les connotacions actuals (1920) i el que va començar a avaluar nevus melanocítics, descrivint per primera vegada els glòbuls, paràmetre dermatoscòpic actualment vigent. A la primera meitat del segle XX, alguns autors varen realitzar diferents aportacions a la tècnica: Lombard, Müller, Schur, Weiss, Jaensch i Bettman varen estudiar les diferents aplicacions clíniques. Posteriorment, el 1971, després d'uns 20 anys d'absència de referències a la dermatoscòpia, Rona Mackie la va tornar a l'actualitat per destacar, per primera vegada, la seva utilitat en l'increment de la precisió diagnòstica preoperatòria de les lesions pigmentades i en la diferenciació entre lesions benignes i malignes (37). L'any 1987, Pehamberger va realitzar un exhaustiu treball en el qual va aplicar la dermatoscòpia en l'avaluació d'un número elevat de tumors pigmentats, descrivint una sèrie de paràmetres i patrons dermatoscòpics que amb petites modificacions es fan servir actualment, establint les bases del procediment anomenat "anàlisi de patrons"(38). El 1990, Braun-Falco i col·laboradors varen dissenyar el dermatoscopi manual que permet una major difusió de la tècnica a causa del seu fàcil maneig i preu més assequible (39). A la dècada dels 90, començaren a aparèixer els algorismes diagnòstics que



intenten facilitar i objectivar el diagnòstic dermatoscòpic del melanoma (Regla de l'ABCD - Stolz el 1994 (40), Règle de Menzies -Menzies el 1996 (41), Regla dels 7 punts - Argenziano en 1998 (42)). També en la dècada dels 90, s'han anat desenvolupant sistemes digitalitzats de dermatoscòpia que permeten magnificacions superiors a les subministrades pels dermatoscòpis manuals i l'obtenció de mapes corporals totals i l'arxiu d'imatges clíniques i dermatoscòpiques útils en el seguiment de pacients amb múltiples lesions pigmentades (35-38). Davant l'augment de la difusió de la dermatoscòpia, es va fer necessari unificar criteris pel que fa a la terminologia i a la definició d'estructures dermatoscòpiques. Al 2003, es van publicar els resultats del "Consensus Net Meeting on Dermoscopy" (CNMD) on es va unificar la terminologia dermatoscòpica. Es va demostrar que la tècnica és fiable i reproduïble, es va revalidar el mètode diagnòstic en 2 etapes i es van contrastar els diferents algorismes diagnòstics.

En definitiva, la dermatoscòpia ha demostrat ser una eina diagnòstica molt valuosa i imprescindible en la pràctica diària del dermatòleg. Actualment, encara que la majoria de les publicacions segueixen tractant sobre lesions melanocítiques, hi ha cada vegada més treballs que caracteritzen dermatoscòpicament tumors no melanocítics i lesions no tumorals. A més, comencen a aparèixer estudis que utilitzen la dermatoscòpia per intentar explicar l'evolució natural de les lesions cutànies i la influència del tractament en els diferents processos dermatològics.

### **2.1. Mètode de diagnòstic dermatoscòpic en 2 etapes**

El **mètode de diagnòstic en 2 etapes** és l'algoritme en què es basa el diagnòstic diferencial en dermatoscòpia. Aquest procediment diagnòstic és l'acceptat per la immensa majoria dels grups de treball a tot el món, va ser avalat pel *Consensus Net Meeting on Dermoscopy* (27) i ha estat considerat pel *Consensus Meeting of IDS* (43) com 1 dels punts clau en l'informe estandarditzat en dermatoscòpia.

El mètode diagnòstic en 2 etapes permet avaluar dermatoscòpicament una lesió cutània que ha de ser prèviament considerada en el context clínic del pacient. Una vegada ha estat

avaluada la informació clínica rellevant del pacient i la descripció clínica del tumor, es procedeix a l'avaluació dermatoscòpica de la lesió cutània de la següent manera (**figura 4**):

**Primera etapa:** en aquesta etapa, hem de discernir si ens trobem davant d'una lesió melanocítica o no melanocítica. En primer lloc, avaluarem la presència d'una sèrie d'estructures i patrons propis dels tumors melanocítics per etiquetar de lesió melanocítica. Davant l'absència d'aquests criteris dermatoscòpics, hem d'avaluar la presència dels criteris específics dels tumors no melanocítics (carcinoma basocel·lular, dermatofibroma, queratosi seborreica i tumors vasculars) per etiquetar la lesió de: no melanocítica. En el cas que el tumor no compleixi cap dels criteris de lesió melanocítica ni de lesió no melanocítica, ha de ser considerat com de possible origen melanocític per minimitzar el risc d'infradiagnòstic de melanomes poc expressius des del punt dermatoscòpic (melanoma acròmic, melanoma hipopigmentat o melanoma amb extensa regressió).

Classificarem la lesió cutània com melanocítica si presenta una de les següents estructures dermatoscòpiques: reticle pigmentat, agregats de glòbuls, extensions (projeccions radials o pseudòpodes), pigmentació blava homogènia o patró paral·lel, en el cas de les lesions de localització palmo-plantar (27-30) (**figura 3**).



**Figura 3. Estructures dermatoscòpiques dels tumors melanocítics.** D'esquerra a dreta i de superior a inferior: reticle pigmentat, agregats de glòbuls, extensions (projeccions radials o pseudòpodes), pigmentació blava homogènia i patró paral·lel. (imatges obtingudes de la Dermatoweb: dermatoweb.udl.es)

**Segona etapa:** quan la lesió presenta criteris de lesió melanocítica, es procedeix a la segona etapa per tal de diferenciar si és benigna (nevus melanocític) o maligna (melanoma), mitjançant l'anàlisi de patrons fonamentalment o els diferents algoritmes diagnòstics dissenyats per a aquest fi. Es poden aplicar diversos mètodes diagnòstics desenvolupats amb aquesta finalitat, incloent fonamentalment l'anàlisi de patrons, la regla de l'ABCD, el mètode de Menzies (41) i la llista dels 7 punts (42). En general, es recomana l'aplicació dels 3 últims quan l'experiència de l'observador en dermatoscòpia és limitada i la utilització de l'anàlisi de patrons quan s'ha adquirit certa experiència. Més recentment, s'han introduït altres algoritmes per aquesta segona etapa, d'ús no tan generalitzat, com per exemple l'algoritme CASH (44).

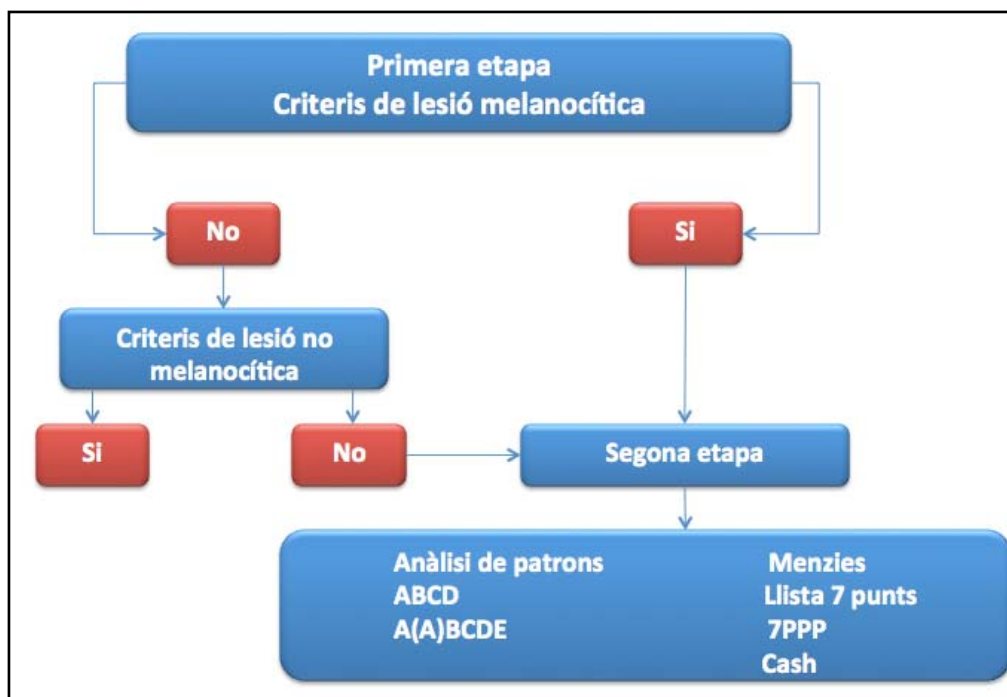


Figura 4. Algoritmes diagnòstics del mètode de diagnòstic en 2 etapes.

## 2.2. L'anàlisi de patrons *(dermatoweb.udl.es)*

L'anàlisi de patrons consisteix en la valoració completa de totes les característiques dermatoscòpiques en una determinada lesió, tant el seu patró global, com els paràmetres o estructures localitzades.☐

### 2.2.1. Patró global

Quan es troben dos patrons diferents en una mateixa lesió, s'adjudica a la lesió el patró que predomina.

**Patró reticular.** Presència de reticle pigmentat en gairebé tota la superfície de la lesió. El patró predominantment reticular és més freqüent en els nevus melanocítics, tot i que es pot veure a melanomes superficials.

**Patró globular.** Presència de glòbuls que componen pràcticament la totalitat de la lesió. El patró predominantment globular també és més freqüent en els nevus melanocítics.

Quan es combinen els patrons reticular i globular, de vegades es parla de "patró retículo-globular".

**Patró en empedrat.** Considerat per alguns autors com una varietat del patró globular, està constituït per glòbuls grans, densament agregats (el que provoca un contorn angulat o poligonal), que recorda morfològicament a un empedrat. Les estructures de tipus glòbul solen ser de mida major als glòbuls del patró globular.

**Patró homogeni.** Constituït per una pigmentació difusa marró, blau, blau-gris o gris-negrosa, en absència de reticle o d'altres estructures dermatoscòpiques. El patró homogeni predominant sol veure's en els nevus melanocítics, sent en cas de ser blau, l'aspecte característic del nevus blau.

**Patró en esclat d'estrelles.** Presència de projeccions (lineals o digitiformes) radials distribuïdes de forma regular per tota la perifèria d'una lesió pigmentada. Tot i que és típic dels nevus de Spitz i/o Reed, en rares ocasions alguns melanomes poden adoptar aquesta morfologia. Per això s'han d'extirpar les lesions amb aquest aspecte, especialment quan apareixen en adults o posseeixen una història de canvis recents pel que fa a grandària, forma o color.

**Patró paral·lel.** Pigmentació distribuïda en línies o bandes paral·leles al llarg de les crestes o els solcs dels dermatoglifs de la pell no pilosa. S'observa als palmells, les plantes i a les mucoses. Ocasionalment també pot distribuir-se també seguint línies situades en angle recte respecte a les crestes o els solcs dels dermatoglifs de la pell de palmes i plantes.

**Patró multicomponent.** Correspon a la combinació de tres o més estructures o patrons dermatoscòpics. Es va descriure com característic del melanoma, encara que pot observar-se en altres lesions com els nevus clínicament atípics, els nevus congènits i els nevus de Spitz/Reed.

**Patró inespecífic.** Es denomina així al patró d'una lesió en la qual no s'identifica cap dels patrons globals descrits anteriorment, i en la qual tampoc s'observen estructures que permetin classificar-la com una lesió no melanocítica (com queratosi seborreica, carcinoma basocel·lular o angioma). En aquesta situació sempre s'ha de descartar que no es tracti d'un melanoma.

### 2.2.2. Característiques dermatoscòpiques locals

**Reticle pigmentat típic/atípic.** Al reticle pigmentat gruixut i irregular se li denomina "atípic" i s'associa a melanoma i al fi i regular, "típic" i s'associa a les melanocítiques benignes. El reticle pot estar present com una malla sense interrupcions en tota la superfície de la lesió o distribuir-se de manera "apedaçada" (per exemple en alguns nevus clínicament atípics). El reticle pigmentat típic sol difuminar-se a les vores de la lesió, mentre que és freqüent que el reticle pigmentat atípic acabi de forma abrupta. De la mateixa manera, la distribució del reticle atípic és freqüentment heterogènia i/o asimètrica.

**Punts i glòbuls regulars/irregulars.** Totes dues són estructures esfèriques que podem trobar distribuïts de forma variable a l'interior o a la perifèria de la lesió. La diferència entre els punts i els glòbuls resideix en la grandària, sent el d'un punt <0,1 mm i el d'un glòbul >0,1 mm de diàmetre. Els glòbuls i els punts poden ser de diferents colors depenent del nivell de profunditat en què es trobin. L'homogeneïtat o "regularitat" en el color, mida, distribució i

agrupació dels glòbuls i punts és típica de lesions melanocítiques benignes, mentre que els punts i glòbuls de grandària i distribució "irregulars" suggereixen malignitat.

**Extensions (projeccions radials i pseudòpodes).** Corresponen a la fase de creixement radial de les lesions melanocítiques i s'associen a la fase d'extensió superficial del melanoma, a més del nevus de Spitz i/o Reed. Quan es distribueixen de forma regular en tota la perifèria de la lesió, conformen el patró en esclat d'estrelles. Es defineixen com "projeccions irregulars" a les projeccions radials i als pseudòpodes de forma i distribució irregular. Sota aquesta definició, són molt característics de melanoma.

**Vel blau-blanquinós o blau-gris.** Es defineixen així àrees irregulars i sense estructura, de pigmentació blava, recobertes d'un vel blanquinós "en vidre esmerilat". Les zones blanquinoses translúcides corresponen a àrees d'ortoqueratosi compacta amb o sense hipergranulosis situades sobre estructures intensament carregades de pigment. La pigmentació pot no ocupar tota la superfície de la lesió i normalment correspon a una zona clínicament sobreelevada. Són molt suggestives de melanoma, encara que també poden aparèixer en carcinomes basocel·lulars i en queratosis seborreiques gruixudes.

**Estructures de regressió (àrees blanques i/o àrees blaves).** Mitjançant dermatoscòpia podem identificar dos patrons fonamentals que reflecteixen el fenomen de regressió: la "despigmentació blanca tipus cicatriu" i les àrees amb "puntejat blau en pebre". Les àrees blanques o pseudocicatricials es correlacionen histopatològicament amb fibrosi i engruiximent dèrmic. El to blanc és més clar que el color normal de la pell circumdant. Les àrees blaves de regressió contenen a més melanòfags. Aquestes últimes consisteixen en zones amb pigmentació blava menys confluent que la del vel blau-blanquinós en vidre esmerilat i amb un puntejat fi (en pebre) al seu interior.

La distinció entre àrees blaves de regressió i vel blau-blanquinós pot resultar impossible quan s'utilitza un dermatoscopi de pocs augments i el puntejat blau és molt dens. Tot i que el fenomen de regressió és molt característic del melanoma, s'observa també en lesions melanocítiques benignes i queratosis liquenoides. Mitjançant dermatoscòpis de llum

polaritzada, la presència de fibrosi dèrmica es pot visualitzar en forma de bandes blanquinoses que reben el nom de "crisàlides".

**Àrees hipopigmentades sense estructura o homogènies.** Àrees focals, sense estructura, hipopigmentades, que ocupen almenys un 10% de la superfície de la lesió. No són específiques, encara que en el melanoma solen ser irregulars i localitzades a la perifèria. Es veuen també en nevus displàsics.

**Taques de pigment.** Són àrees intensament i homogèniament hiperpigmentades (negres o marró-negre), que impedeixen veure les estructures subjacents i que constitueixen almenys un 10% de la superfície de la lesió. En lesions benignes solen estar localitzades en el centre i ser úniques o escasses en nombre i de distribució simètrica. En el melanoma, es localitzen freqüentment a la perifèria, solen ser múltiples i de distribució asimètrica.

**Estructures vasculares.** En lesions melanocítiques, es poden veure els següents tipus d'estructures vasculares:

- Vasos "en coma": vasos no ramificats en forma d'un petit arc, alguns amb un cap visible, que recorden una coma. Són típics dels nevus melanocítics compostos i intradèrmics.
- Vasos "en forquilla": són vasos en forma de nansa també anomenats "d'anada i tornada". Quan són típics (fins i regulars) són característics de les queratosis seborreiques. Quan són atípics (irregulars) es veuen en el melanoma, el nevus de Spitz, el carcinoma escamós i en la perifèria del queratoacantoma.
- Vasos "en llevataps": vasos prominents i tortuosos, en espiral. Són típics del melanoma i les metàstasis de melanoma.
- Vasos "puntiformes": vasos petits que recorden a caps d'agulles. Dins de les lesions melanocítiques, són característics del melanoma i del nevus de Spitz. Es poden veure a més en tumors no melanocítics, com el carcinoma escamós, i en dermatosis inflamatòries com la psoriasi.

## **2.3. Característiques dermatoscòpiques dels NMCA**

### **2.3.1. Nevus melanocític juntural**

Es caracteritzen per un reticle pigmentat típic que recobreix tota la lesió i que es difumina per les vores. En ocasions, podem observar punts negres (superposats a les línies de la xarxa) i glòbuls marrons al centre de la lesió, o a manera de corona (si la lesió està creixent). Alguns nevus melanocítics junturals molt pigmentats presenten una taca de pigment central anomenada "lamel·la negra". La lamel·la negra expressa una transeliminació epidèrmica molt intensa de melanina que es concentra a les cèl·lules mortes de la capa còrnia, pel que es pot eliminar total o parcialment de forma manual simplement fregant la lesió amb una gasa.

### **2.3.2. Nevus melanocític compost**

Presenten diverses combinacions de reticle, glòbuls i àrees sense estructura. És freqüent veure nevus compostos amb un patró globular de distribució regular en tota la lesió o també amb un patró difús o àrea sense estructura o en empedrat al centre i un reticle pigmentat típic perifèric que es difumina cap a les vores.

### **2.3.3. Nevus melanocític intradèrmic**

No mostren reticle pigmentat ni glòbuls o punts.

Els nevus melanocítics intradèrmics cerebriformes o berrucosos poden ser més o menys pigmentats o amelanòtics. En la seva variant pigmentada donen lloc al típic patró en empedrat. Posseeixen crestes, solcs i, fins i tot, quists tipus *millium* i taps cornis.

En els nevus melanocítics intradèrmics de superfície llisa solem observar traces de pigment homogeni marró o gris (depenent del grau de pigmentació) regularment interromputs per àrees d'hipopigmentació perifol·licular.



En els dos tipus es poden observar característicament vasos en coma, que serien els vasos que de manera més freqüent trobem en aquests tipus de nevus, però també s'ha descrit la presència de vasos puntiformes, vasos en forquilla i vasos atípics/polimorfs (45, 46).

## **2.4. Característiques dermatoscòpiques dels NCA**

Els nevus clínicament atípics dermatoscòpicament es classifiquen avaluant dues variables: l'estructura predominant i la distribució del pigment.

### **2.4.1. Classificació dels nevus clínicament atípics en funció de l'estructura predominant**

**Tipus reticular.** És el més freqüent. El reticle és més o menys prominent, però regular.

**Tipus globular.** Constituït per nombrosos punts i glòbuls. Es pot confondre amb els nevus melanocítics congènits.

**Tipus homogeni.** Sense estructures dermatoscòpiques. Es pot combinar en forma de tipus homogeni-reticular o homogeni-globular. Si a això s'associen a més punts negres, parlaríem ja de patró multicomponent. En el melanoma, si hi ha un patró predominantment homogeni, se solen distingir, a més, estructures vasculars.

**Tipus retículo-globular.** És poc freqüent (al voltant del 15% dels nevus clínicament atípics), però significatiu, ja que una corona de glòbuls perifèrics indica creixement.

### **2.4.2. Classificació dels nevus clínicament atípics en funció de la distribució de la pigmentació**

**Pigmentació uniforme.** És el tipus més freqüent; sense diferències significatives en la distribució de la pigmentació en tota la superfície de la lesió.

**Hipopigmentació central o "tipus anul·lar".** El més comú és que l'àrea central hipopigmentada estigui menys estructurada i que estigui envoltada per un reticle pigmentat típic (tipus homogeni-reticular).

**Hipopigmentació excèntrica.** És poc freqüent. No s'ha de confondre aquesta àrea hipopigmentada amb una zona de regressió.

**Hiperpigmentació central o "en diana".** La hiperpigmentació central és del tipus "lamel·la negra" (veure nevus melanocítics junturals, apartat 2.3.1) i acostuma a veure's en nevus clínicament atípics de tipus reticular.

**Hiperpigmentació excèntrica.** És el de major importància ja que sota aquesta aparença es troben melanomes *in situ* o melanomes microinvasors, tot i que hi ha treballs contradictoris respecte a aquesta qüestió. La hiperpigmentació excèntrica ha d'arribar fins la vora de la lesió.

**Hipo/hiperpigmentació multifocal o apedaçada.** És el tipus més comú de distribució heterogènia de la pigmentació. És freqüent en els tipus retículo-globular i homogeni-reticular.

La majoria dels individus amb síndrome del nevus displàsic presenten predominantment el mateix tipus dermatoscòpic de nevus clínicament atípic. Per això, una lesió que s'aparti del tipus predominant ha de ser estudiada amb especial atenció, buscant criteris de malignitat.

Aquesta idea de què el procés de detecció del melanoma no es basaria tant en un procés analític com l'algoritme ABCD sinó en un procés cognitiu global com el "signe de l'aneguet lleig" ha estat estudiada dermatoscòpicament en els últims anys. En aquest sentit, es va publicar un estudi en què es va avaluar la variabilitat intra-individual dels nevus en una escala clínica i dermatoscòpica i van comprovar que tots els nevus d'un pacient pertanyien a un número baix de patrons dominants que podien ser percebuts de forma intuïtiva. Aquesta baixa variabilitat explicaria perquè el concepte de "l'aneguet lleig" funciona en la pràctica dermatològica (47).

### 3. LA SIASCÒPIA

En els últims anys s'han desenvolupat diferents tècniques diagnòstiques complementàries a l'examen clínic per al diagnòstic de les lesions pigmentades (**figura 5**). Dins d'elles s'inclou la dermatoscòpia multiespectral digital combinada amb l'anàlisi computacional, que és una tècnica mitjançant la qual s'obtenen una sèrie de imatges a les que se li apliquen diversos filtres amb diferents longituds d'ona per a ser estudiades i, posteriorment, ser analitzades mitjançant un programa informàtic. S'han desenvolupat dos eines que fan servir aquesta tecnologia: l'anàlisi espectrofotomètric intracutani (*Spectrophotometric Intracutaneous Analysis* o SIAscòpia) i el MelaFind®.

Modalidad	Ventajas y desventajas
Detección visual	Algunos melanomas son fáciles de reconocer, pero algunas lesiones no cumplen la regla ABCD
Dermatoscopia	Mejora la decisión de lesión benigna o maligna y es barata
Dermatoscopia con análisis mediante ordenador (SolarScan®)	De utilización limitada por la variabilidad interobservador
Microscopia confocal (Vivascope®)	Permite obtener una imagen en tiempo real con una buena resolución y correlación con la dermatoscopia
Dermatoscopia multiespectral digital combinada con el análisis computacional (Siascopia y MelaFind®)	Analiza características cutáneas invisibles para el ojo humano, tiene una alta sensibilidad y una baja especificidad para melanoma
Tomografía de coherencia óptica (SkinDex-300)	Estudios en piel limitados, desconocida su sensibilidad/especificidad en melanoma
Ultrasonido de alta resolución (DermaScan C)	Permite observar con detalle la vascularización de los tumores, coste elevado y sensibilidad/especificidad para melanoma desconocida
Dermatoscopia seriada con fotografías (MoleMax II™)	Permite apreciar cambios precoces en lesiones melanocíticas, aumenta la sensibilidad de la dermatoscopia convencional
Fotografía corporal total (Dermagraphix™)	Permite detectar la aparición de nuevas lesiones

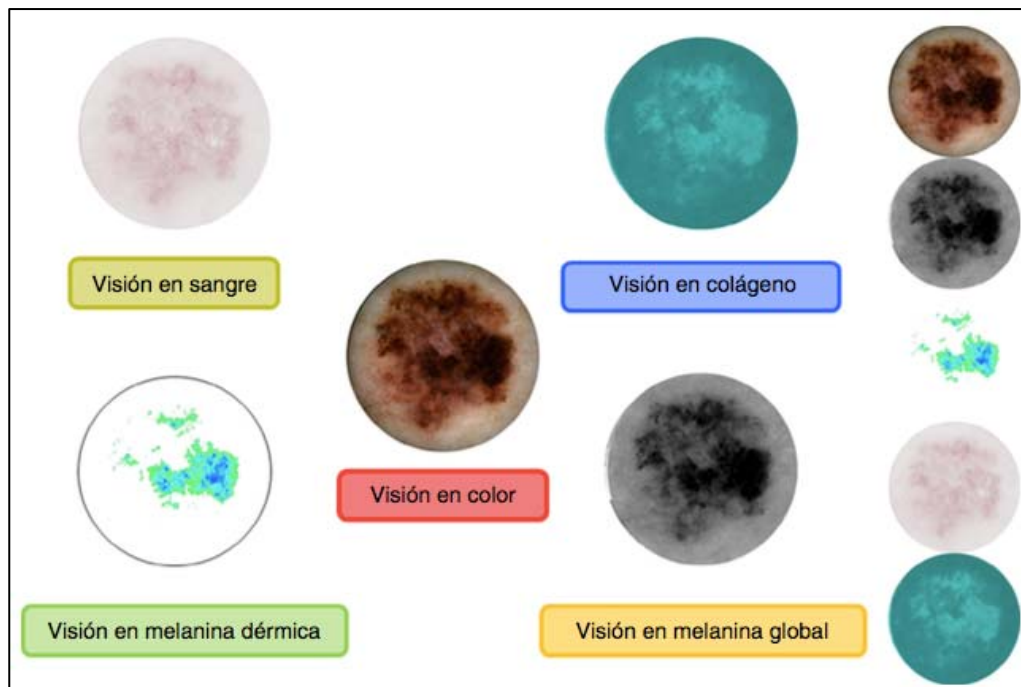
**Figura 5. Modalitats per a la detecció del melanoma (48).**

L'anàlisi espectrofotomètric intracutani, més comunament denominat SIAscòpia, és una tècnica no invasiva que permet estudiar lesions de la pell utilitzant 8 filtres de diferents longituds d'ona (entre els 400 i 1.000nm). Existeixen 2 modalitats de SIAscòpia: la de no contacte i la de contacte. La primera es realitza mitjançant una càmera fotogràfica convencional a la qual se li acobla un filtre lumínic específic i s'utilitza per obtenir imatges d'una regió cutània extensa, permetent així estudiar les diverses lesions presents en aquesta regió. En canvi, la SIAscòpia de contacte té com a objectiu l'estudi individualitzat de les lesions i es realitza amb un capçal que es posa en contacte amb la pell del pacient permetent estudiar un fragment de 24x24mm de diàmetre (**figura 6**).



**Figura 6. Imatge il·lustrativa del siascop.** **A)** Equip complet de SIAscòpia compost per un ordinador amb el programari MoleManager®, el capçal per a la SIAscòpia de contacte i la càmera fotogràfica amb el filtre per realitzar la SIAscòpia de no contacte. **B)** Siascop de contacte a l'esquerra i càmera fotogràfica amb filtre per SIAscòpia de no contacte a la dreta (48).

El funcionament de la SIAscòpia es basa en analitzar com interacciona la llum amb els components de la pell que són responsables del seu color (substàncies cromòfores) dins de les quals s'inclouen la melanina, l'hemoglobina i el col·lagen. Quan un feix de llum incideix sobre la pell, una part reflecteix en entrar en contacte amb l'epidermis i la resta es transmet cap a capes més profundes. En arribar a la dermis, part del feix de llum restant tornarà a reflectir, i la llum restant serà absorbida per les substàncies cromòfores presents. El color de la pell d'una determinada regió cutània s'obté perquè l'ull humà capta els feixos de llum reflectits per la mateixa i, tant la quantitat com la longitud d'ona d'aquests feixos depenen de les concentracions de melanina, hemoglobina i col·lagen del territori. El fonament de la SIAscòpia és deduir l'estructura interna de la part superior de la pell (fins a 2mm de profunditat, arribant fins a la dermis papil·lar) analitzant aquests feixos de llum reflectits. Posteriorment, el programa tradueix les dades registrades a una imatge anomenada siagràfic (**figura 7**). Així, es creen siagràfics per la melanina total de la lesió, per la melanina dèrmica, per l'hemoglobina i un altre pel col·lagen. Finalment, mitjançant la combinació d'aquests 4 siagràfics s'obté la imatge en color, la qual s'assembla a la imatge observada mitjançant dermatoscòpia.



**Figura 7. Siagràfics.** Imatge que il·lustra els siagràfics per la melanina de tota la lesió (els punts gris-negres representen la presència de melanina i aquests són més foscos quanta més quantitat de melanina), per la melanina dèrmica (les zones blanques representen zones sense melanina dèrmica i els increments de la concentració de la melanina dèrmica es representen pels colors verd, blau clar, blau fosc, lila i vermell, ordenats en concentració ascendent), per l'hemoglobina (les zones més eritematoses representen zones amb major concentració d'hemoglobina) i un altre pel col·lagen (les zones amb molt col·lagen es mostren amb un to brillant, mentre que les zones amb poca concentració són fosques) (48).

El programa informàtic permet escanejar lesions individualitzades, guardar els siagràfics corresponents per realitzar l'estudi evolutiu i realitzar una sèrie de modificacions sobre ells, com ara variar el contrast, la brillantor, l'augment i fins i tot observar la lesió en tres dimensions.

A banda de l'estudi individualitzat de la lesió, la SIAscòpia disposa d'un programa informàtic (antigament comercialitzat com "MoleManager<sup>®</sup>") que permet realitzar mapes corporals totals dels pacients. Inicialment, per mitjà de la utilització de la SIAscòpia de no contacte s'obtenen els siagràfics de zones amples del cos del pacient. Posteriorment, el programa ofereix la possibilitat de seleccionar les lesions desitjades mitjançant uns marcadors numèrics. Un cop marcades, s'utilitza la siascòpia de contacte amb un altre programa informàtic (antigament comercialitzat com "MoleView<sup>®</sup>") sobre cadascuna de les lesions que

hem seleccionat prèviament per poder obtenir els siagràfics del col·lagen, melanina total, melanina dèrmica, hemoglobina i color. El programa també permet la comparació dels siagràfics obtinguts amb la siascòpia de contacte i no contacte, avaluant-se tots els canvis evolutius de les lesions estudiades, com l'aparició o desaparició de lesions als mapes corporals i/o els canvis morfològics de lesions individuals a partir de les imatges obtingudes mitjançant la SIAscòpia de contacte. És a dir, es pot fer un seguiment dels pacients amb mapes corporals totals i imatges de lesions individuals, semblant als seguiments realitzats amb altres sistemes com Fotofinder® i MoleMax®, encara que les imatges individuals a comparar no són dermatoscòpiques sinó siascòpiques. Els programes "MoleManager®" i "MoleView®" actualment s'han fusionat en un altre programa anomenat "Simsys®". Finalment existeix un programa anomenat "MoleMate®", especialment dissenyat per metges de primària, que incorpora exemples de siagràfics de lesions pigmentades no melanocítiques (carcinomes basocel·lulars, queratosis seborreiques, angiomes...) ajudant al diagnòstic diferencial.

Tal i com es pot entreveure en les línies anteriors, la principal utilitat de la SIAscòpia és el diagnòstic diferencial de les lesions pigmentades (49) però progressivament s'està utilitzant en altres camps com en el seguiment de les plaques de psoriasi, el càncer cutani no melanoma o la cicatrització de les ferides (50-52).

#### 4. ELS CANALS DE CALCI DE TIPUS T EN LA PROLIFERACIONS MELANOCÍTIQUES BENIGNES I MALIGNES

El calci ionitzat ( $\text{Ca}^{2+}$ ) és un segon missatger ubic que intervé en diverses funcions fisiològiques, com la proliferació cel·lular, la supervivència, l'apoptosi, la migració i l'expressió gènica. La concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medi extracel·lular és de 1-2 mM, mentre que, en repòs, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular es manté a aproximadament a 100 nM. Les cèl·lules utilitzen diversos transportadors específics de  $\text{Ca}^{2+}$  i proteïnes unides a  $\text{Ca}^{2+}$  per extreure  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmàtica, transportar  $\text{Ca}^{2+}$  als reservoris intracel·lulars i tamponar  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic. Per contra, hi ha una diversitat de canals de  $\text{Ca}^{2+}$  en la membrana plasmàtica que permeten l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol. L'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  pot interactuar a la vegada amb els canals de  $\text{Ca}^{2+}$  presents en el reticle endoplasmàtic, el que dona lloc a elevacions localitzades de  $\text{Ca}^{2+}$  que són descodificades a través d'una varietat d'efectors dependents de  $\text{Ca}^{2+}$  (53).

Existeixen diferents tipus de canals de calci, dels quals els més coneguts són els canals de calci dependents de voltatge. Aquests canals difereixen uns dels altres en la seva subunitat alfa. Es classifiquen en dos grups principals, els canals de calci d'alt voltatge (tipus L, tipus P/Q, de tipus N i tipus R) que són característics de cèl·lules excitables (com les musculars o les del sistema nerviós) i els canals de calci de baix voltatge (tipus T) que estan presents en les cèl·lules de tots els llinatges. Essent els canals de calci tan importants per l'homeòstasi i diverses funcions cel·lulars, durant la darrera dècada s'han estudiat en diverses neoplàsies malignes, s'han descrit sobreexpressats o infraexpressats i s'han proposat com a possibles dianes terapèutiques (53).

Fins fa poc no s'havia descrit el patró d'expressió de canals de calci en el melanoma. El 2012 el nostre grup va publicar un estudi pioner en què vam demostrar, per RT-PCR, que tant les cèl·lules de melanoma com els melanòcits normals expressaven diferents tipus de canals de calci dependents de voltatge. Les variacions en aquesta expressió resultaven especialment interessants pel que fa als canals de calci tipus T (en totes les seves isoformes: Cav3.1,

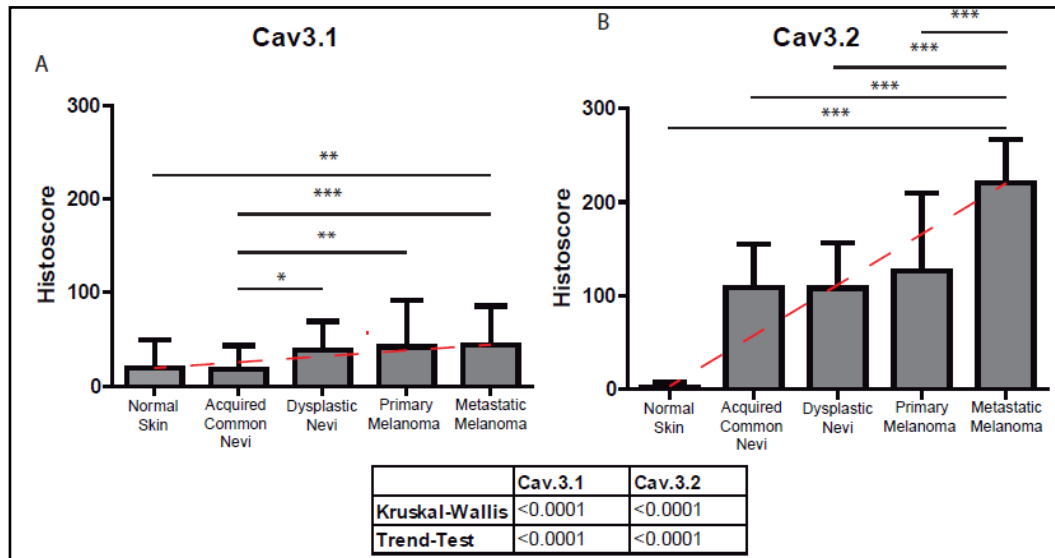
Cav3.2 i Cav3.3), que són canals operatius a potencials de membrana negatius en les cèl·lules no excitable. En el nostre estudi, totes les cèl·lules de melanoma analitzades (incloent línies derivades de tumors primaris, línies derivades de metàstasi i mostres tissulars congelades) expressaven canals de tipus T, mentre que els melanòcits control no tenien (o expressaven mínimament) aquests tipus de canals de calci. També vam demostrar que aquests canals eren funcionals, que la seva expressió augmentava en condicions d'hipòxia i que el seu bloqueig o inhibició repercutia en la viabilitat de les cèl·lules de melanoma i en la progressió del cicle cel·lular de les mateixes (54).

En un segon treball més recent (55) vàrem comprovar que la inhibició farmacològica dels canals de calci de tipus T (mitjançant drogues amb pedigrí terapèutic en els sistemes nerviós i cardiovascular, com Pimozide i Mibefradil) induïa la mort de les cèl·lules de melanoma mitjançant la inducció d'estrès del reticle endoplasmàtic i la subsegüent inhibició de l'autofàgia constitutiva, típica de les cèl·lules de melanoma.

Finalment, acabem de publicar un article on descrivim per primera vegada la immunoexpressió de les isoformes Cav3.1 i Cav3.2 dels canals de calci de tipus T en mostres parafinades de pell normal, NMCA, NCA o displàsics i melanoma primari i metastàtic (56) (**figura 8**). Varen trobar que la immunoexpressió d'aquests canals augmentava gradualment de la pell normal als NMCA, NCA i melanoma, però amb diferències en la distribució de les dues isoformes. En particular, l'expressió de Cav3.2 va ser significativament major en el melanoma metastàtic que en el melanoma primari i la de Cav3.1 en els NCA respecte als NMCA. En les mostres de melanoma, l'anàlisi estadístic de diferents biomarcadors va demostrar una interacció lineal entre la disminució de l'expressió de PTEN, presència de la mutació *BRAF/V600E*, expressió de Cav3.1, de marcadors d'autofàgia, proliferació i cicle cel·lular, expressió de Cav3.2 i de marcadors de hipòxia. Per altra part, utilitzant dades del *cBioPortal for Cancer Genomics*, vàrem demostrar que la supervivència lliure de malaltia i la supervivència global es correlacionaven inversament amb la sobreexpressió de Cav3.2. En conjunt doncs, vam descriure que l'expressió de Cav3.1 i Cav3.2 a la pell normal i els tumors melanocítics benignes i malignes estava en línia amb els nostres estudis previs *in vitro* i que semblava estar relacionada amb la progressió tumoral. Per tant, d'una banda, l'alta expressió de Cav3.2 en el melanoma metastàtic vs el melanoma primari i la seva associació amb



marcadors de proliferació i d'hipòxia, i per l'altra, la correlació positiva entre Cav3.1, marcadors d'autofàgia i mutació *BRAF/V600E*, obre una nova possibilitat a la investigació sobre l'ús de bloquejants dels canals de calci de tipus T en les teràpies dirigides contra el melanoma disseminat i sobre les implicacions biològiques d'aquests canals en les neoplàsies melanocítiques.



**Figura 8.** Augment progressiu de canals de calci de tipus T des dels melanòcits de la pell normal al melanoma (56).

## 5. HISTÒRIA NATURAL DELS NEVUS MELANOCÍTICS ADQUIRITS

### 5.1. Epidemiologia i evolució clínica dels nevus melanocítics adquirits

El desenvolupament de nevus melanocítics és un procés dinàmic i complex que pot veure's afectat per molt factors tant endògens com exògens. El número de nevus incrementa des de la infància fins a la meitat de la vida i posteriorment decreix. Aquest comportament dinàmic es pot resumir (exceptuant els nevus melanocítics congènits) amb la frase que diu "*naixem i morim sense nevus*".

D'aquesta manera, la vida d'un nevus melanocític la podem dividir conceptualment en 4 estadis que serien: la iniciació, el creixement o promoció, una aturada de creixement (que per una majoria d'autors estaria induïda per mecanismes de senescència) i la involució o desaparició del nevus. Les dades que donen suport a l'existència d'aquests quatre estadis estan basades en l'observació clínica, en la dermatoscòpia, en troballes histològiques i en canvis a nivell molecular.

#### 5.1.1. Factors de risc pel desenvolupament de nevus melanocítics adquirits

Són nombrosos els estudis que han identificat possibles factors de risc pel desenvolupament de nevus. S'han relacionat diversos factors constitucionals com: el sexe masculí, ètnia Europea, tenir la pell clara, ulls clars i cabells rossos, efèlides, cremar-se fàcilment després de l'exposició solar o, en general, ser un individu de fototipus baix (57). Però també s'han descrit altres factors no endògens relacionats amb la presència de nevus com la radiació ultraviolada rebuda, ja sigui de forma natural o per l'ús de pantalles solars. No obstant, hi ha poc acord sobre quines d'aquestes estarien involucrades de manera específica (9).

També s'ha comprovat com diversos polimorfismes genètics poden influir en el número de nevus, i inclús tenir relació amb la seva distribució i els seus patrons dermatoscòpics.

S'han associat polimorfismes de manera significativa tant amb un major número de nevus (*IRF4*, *PAX3*) com amb una menor presència d'aquests (*PARP1*, *CDK6* i *PLA2G6*) (18-22).

També s'ha vist com variants en la coneguda regió 9p21 podrien estar associades amb el melanoma, els nevus i el fenotip d'aquests nevus en famílies propenses a desenvolupar melanoma amb mutacions del gen *CDKN2A* (58, 59) . És a dir, aquest gen no només influiria en el número de nevus sinó que també ho faria en com aquests nevus es distribueixen per la superfície corporal.

També hi ha altres alteracions genètiques més novells que s'han associat al fenotip dels nevus com és el cas del gen *NID1* en 1q42, que s'ha associat al nombre de nevus melanocítics presents als braços així com a un major risc de melanoma (60).

Inclús en el cas dels nevus displàsics, també hi ha estudis que suggereixen que algunes variants genètiques de *CDK6* i *XRCC1* poden conferir susceptibilitat a tenir nevus displàsics que seria independent del risc de melanoma en famílies propenses a melanoma (61).

En relació als patrons dermatoscòpics dels nevus, el polimorfisme *IRF4* rs12203952 s'ha associat a la presència de major número de nevus, mentre que l'al·lel rs12203952T s'ha associat amb un augment en el número de nevus plans i menor número de nevus sobreelevats (62). Polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs) en *IRF4* i *hTERT* s'han associat amb el patró globular, mentre que SNPs en *CDKN1B*, *MTAP* i *PARP1* s'han associat amb el patró reticular (en comparació amb nevus homogenis).

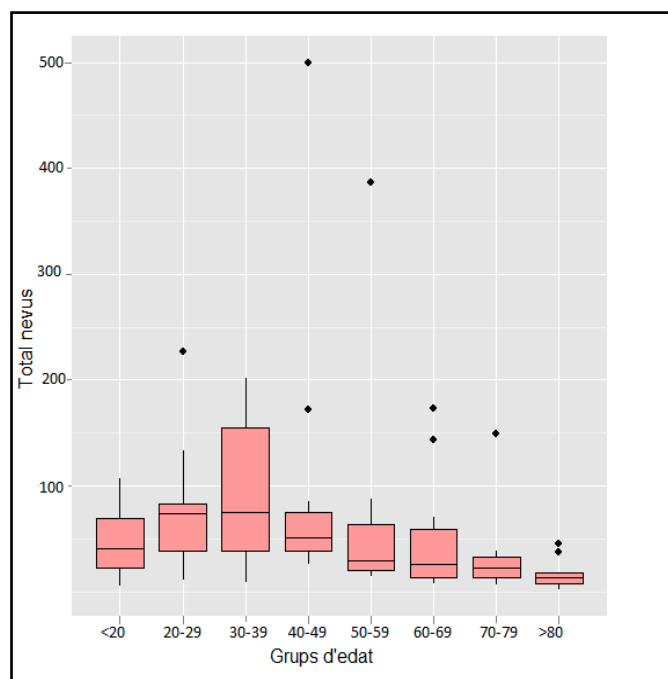
Tots aquests estudis en número de nevus entre els quals es troben diversos estudis d'associació genòmica de genoma complet (anomenats GWAS segons les sigles en anglès) han identificat un nombre de *loci* que expliquen només una petita proporció del risc, el que suggereix que altres *loci* addicionals queden per ser identificats.

### 5.1.2. Variació del número de nevus melanocítics adquirits amb l'edat

El desenvolupament de nous nevus durant la infància i adolescència és un fenomen ben establert i són nombrosos els articles publicats en aquest sentit durant les últimes dos dècades (25, 63-69).

Aquest nombre de nevus augmentaria fins als 20-30 anys per després disminuir progressivament. Ja l'any 1985, el Dr. Mackie va realitzar un estudi sobre població caucàsica on mostrava com la majoria dels nevus adquirits es desenvolupen sobre la 2a, 3a i 4a dècades de la vida. Aquesta prevalença de nevus edat-depenent s'ha observat repetidament de manera molt similar en altres països.

A la nostra àrea geogràfica, entre la població adulta major a 16 anys de la regió sanitària de Lleida vam veure com el nombre màxim de nevus es veu a la dècada dels 30 anys per després disminuir (Treball de Final de Grau de Rosa Plana Bolba, Universitat de Lleida, curs 2015-16) (figura 9).



**Figura 9. Distribució total dels nevus per edats ( $p < 0.05$ )** (Treball de Final de Grau de Rosa Plana Bolba, Universitat de Lleida, curs 2015-16).

En el cas dels nevus atípics o displàsics que són excepcionals durant la infància, també s'ha observat com aquest número decreix amb l'edat. No obstant, l'aparició de nous nevus displàsics és un fenomen encara freqüent des dels 30 als 50 anys i inclús per sobre de la cinquena dècada de la vida.

Que els nevus involucionen, desapareixen o despigmenten és un fet que sembla més que evident tot i que no existeixen moltes publicacions focalitzades en l'estudi d'aquest fenomen.

A nivell clínic s'ha comprovat que existeix una reducció progressiva en el número total de nevus conforme avança l'edat. Aquest decreixement començaria sobre els 40 i 50 anys i continuaria més enllà de la sisena dècada de la vida.

Aquest fet sembla que seria més atribuïble a una disminució progressiva dels nevus de Clark segons la classificació d'Ackerman, per tant, de nevus de superfície plana juncionals o compostos que als nevus intradèrmics. Això reflectiria que els subtipus morfològics de nevus són edat-depenents i això és el que ha portat a formular les hipòtesis de nevogènesi més recents i que es basen en els patrons dermatoscòpics morfològics dels nevus que més endavant explicarem.

## **5.2. Bases moleculars de la nevogènesi**

### **5.2.1. Mutacions involucrades en la fase d'iniciació i promoció o creixement dels nevus**

A diferència del melanoma en què s'han fet estudis moleculars molt amplis, els estudis moleculars que s'han fet en nevus melanocítics s'han restringit fonamentalment als gens implicats de forma clàssica en la melanomagènesi.

Entre les principals alteracions genètiques en oncogens del melanoma de pell i mucoses s'han descrit alteracions en ordre de freqüència la mutació del gen *BRAF*, en segon lloc de

*NRAS* i, en tercer lloc, de *c-Kit*. En el melanoma uveal s'han trobat mutacions dels gens *GNAQ* y *GNA11*.

Pel que fa als nevus melanocítics, als nevus congènits s'han trobat especialment mutacions de *NRAS* (encara que també de *BRAF*), als nevus adquirits tant comuns com displàsics s'han trobat mutacions de *BRAF* (encara que també de *NRAS*), als nevus blaus mutacions de *GNAQ* i *GNA11* (encara que també de *BRAF*) i als nevus de Spitz mutacions de *HRAS* (aquestes no descrites en el melanoma) a part de mutacions de *BRAF*, de *NRAS* i altres (70) (**figura 10**).

Contràriament, no s'han descrit mutacions de *c-Kit* en nevus melanocítics (8).

Classification	Mutations and Relative Frequency
Congenital nevi	NRAS > BRAF
Spitz nevi	HRAS > BRAF > NRAS
Acquired nevi	BRAF > NRAS
Blue nevi	GNAQ > BRAF

**Figura 10.** Resum de les mutacions més freqüents en nevus congènits, d'Spitz, adquirits i nevus blau (70).

En els **nevus congènits**, s'ha descrit una majoria de mutacions de *NRAS* per sobre de mutacions de *BRAF*. No obstant, aquesta diferència no queda tan clara si es miren tots els nevus congènits en el seu conjunt, però sí si es separen els nevus melanocítics congènits gegants dels de mida petita o mitjana. En aquest cas, el percentatge de positivitat per mutacions *NRAS* és del 97% i el *BRAF* del 30%, respectivament.

En els **nevus blaus**, com hem dit la mutació més freqüentment descrita és la de *GNAQ*, que comparteixen amb els melanomes uveals. S'han descrit també percentatges baixos de mutacions de *GNA11*, *BRAF*, *NRAS*, i una mica més alts de *KRAS* (aquestes també sense contrapartida en el melanoma).

En el cas dels **nevus de Spitz**, encara que hi han diferències segons les sèries i els criteris emprats, sembla ser que als nevus de Spitz clàssics predominen, com ja hem dit, les

mutacions de *HRAS*, a part de *BRAF* i *NRAS* mentre que és als tumors melanocítics spitzoides on s'han descrit mutacions de *BRAF* i pèrdua bial·lèlica de *BAP-1* o altres mutacions menys freqüents com les de *ROS1*, *ALK* o *RET*.

En el cas dels **NMCA**, existeix un clar predomini de mutacions de *BRAF* sobre les de *NRAS*, encara que pocs treballs han estudiat diferències en la seva distribució entre els diferents subtipus de nevus. Desenvoluparem una mica més aquest tema en el proper subapartat.

En resum doncs, molts dels gens implicats en la patogènesi de diferents tipus de melanoma (*NRAS (HRAS)*, *BRAF*, *GNAQ*) també intervenen en les fases d'iniciació/promoció de diferents tipus de nevus melanocítics, pel que un camp important de recerca és conèixer quins mecanismes els deriven habitualment cap a l'aturada de creixement i involució o, eventualment, cap a la transformació maligna.

### 5.2.2. Mutacions de *BRAF* en els nevus melanocítics adquirits

*BRAF* és un component clau de la via de les MAPkinases, *RAS/RAF/MEK/ERK*, que intervé en el creixement, la supervivència i la migració cel·lular. Les mutacions activadores d'aquesta proteïna condueixen a la hiperactivació de la via i, com a conseqüència, a una proliferació i supervivència cel·lular incontrolades. Un 5-7% de totes les neoplàsies humanes són portadores d'una alteració de *BRAF*. La mutació més freqüent del gen *BRAF* és la que condiciona la substitució de valina per àcid glutàmic en la proteïna codificada, en la posició 600 (*V600E*), encara que es poden veure altres mutacions no tan comuns com la *V600K*, la *K601E* o altres.

La mutació *V600/BRAF* és la més freqüentment trobada en el melanoma (40-60% de tots els subtipus de melanoma). Això passa predominantment en els melanomes desenvolupats sobre pell sense dany solar crònic (pell exposada al sol de forma intermitent), que constitueixen el subtipus més comú en la nostra població. En aquest subtipus de melanoma, també s'han detectat més rarament mutacions de *NRAS* (mútuament excloents respecte a les de *BRAF*). Per contra, en formes menys comuns de melanoma, com els relacionats amb el dany solar crònic o sense relació amb la llum UV, la taxa de mutacions de *BRAF* és menor. La

mutació *V600E/BRAF* constitueix el 90% de les mutacions de *BRAF* descrites en el melanoma. Amb aquesta premissa, s'han desenvolupat diversos inhibidors específics de la proteïna *V600E/BRAF* (Vemurafenib, Dabrafenib) per al tractament de pacients amb melanoma disseminat que han demostrat una alta taxa de resposta a més d'una prolongació del període lliure de progressió i de la supervivència global en comparació amb la quimioteràpia estàndard amb dacarbazina.

En aquest context, sent tan important la mutació *V600E/BRAF* en el melanoma, com per a poder ser utilitzada com una diana terapèutica, resulta sorprenent que les mutacions de *BRAF* siguin comuns en nevus melanocítics benignes. Es pensa que les mutacions de *BRAF* (generalment la *V600E*) són molt importants per a la proliferació de les cèl·lules d'estirp melanocítica. Aquesta mutació formaria part dels esdeveniments inicials del creixement de les lesions melanocítiques benignes. No obstant això, aquestes, amb el temps, detindrien la seva proliferació i romandrien com neoplàsies benignes. En aquelles lesions en les que tinguessin lloc mutacions posteriors successives i acumulatives, com, per exemple, la pèrdua d'un gen supressor de tumors, tindria lloc la transformació del nevus melanocític amb mutació de *BRAF* a melanoma. Aquesta progressió s'ha definit com la "via de la proliferació". Els segons estímuls necessaris per a la progressió de nevus a melanoma són encara poc coneguts. El terme "vies de senescència" descriu el comportament benigne d'aquells nevus que haurien aturat la seva proliferació, que es calcula que ocorre en el 82% dels nevus melanocítics amb mutacions de *BRAF*.

Com ja hem comentat prèviament, els NMCA són el subtipus de nevus que més s'han relacionat amb la mutació de *BRAF*. No obstant, existeixen encara pocs treballs on s'hagin estudiat la seva freqüència en els diferents subtipus, però s'estima que la freqüència total estaria al voltant del 79%. En els nevus melanocítics junturals del 66%, en els compostos del 46-53% i en els nevus intradèrmics entre el 50-88%.

Els nevus displàsics (o NCA), considerats clàssicament com majorment predisposats a la transformació a melanoma, es calcula que en un percentatge lleugerament superior al 50% (20-80%, segons les sèries) es veuen mutacions de *BRAF* i en aproximadament un 5%, mutacions de *NRAS*.



Existeix certa controvèrsia respecte al fet de que la mutació de *BRAF* es tracti d'una mutació inicial o més tardana en la nevocènesi. Això es degut a que alguns autors han descrit que els nevus melanocítics BRAF+ son tumoracions policlonals en què no totes les cèl·lules son portadores de la mutació. Segons aquestes troballes, la mutació de *BRAF* no representaria un esdeveniment iniciador de la formació del nevus, sinó que actuaria com un procés secundari, ja en l'etapa de promoció de la nevocènesi. No obstant, aquesta afirmació també ha estat objecte de debat. Altres autors creuen que aquesta suposada policlonalitat es deuria a que l'especificitat de les tècniques de seqüenciació directa del DNA del tumor no és del 100% degut a la presència de contaminació estromal que podria infraestimar el nombre de cèl·lules mutades. Aquests autors defensen que si s'utilitza una tècnica immunohistoquímica específica per la detecció de la mutació *BRAF/V600E* (mitjançant l'anticòs VE1), sí que s'observa d'una manera uniforme en la majoria, sinó totes, les cèl·lules que constitueixen el nevus.

Hi han altres evidències que recolzen que sí seria un esdeveniment inicial. En primer lloc, que es tracta d'una mutació freqüent en pacients joves i en lesions que estan en creixement. També recolzaria aquesta teoria que s'hagi vist la mateixa mutació en melanomes i nevus contigus dels quals se suposa l'origen, que es tracta d'una mutació freqüent en melanomes en fase de creixement radial des de la qual s'inicia el creixement vertical, així com el fet de que sigui una mutació que es conservi en les metàstasis de melanoma.

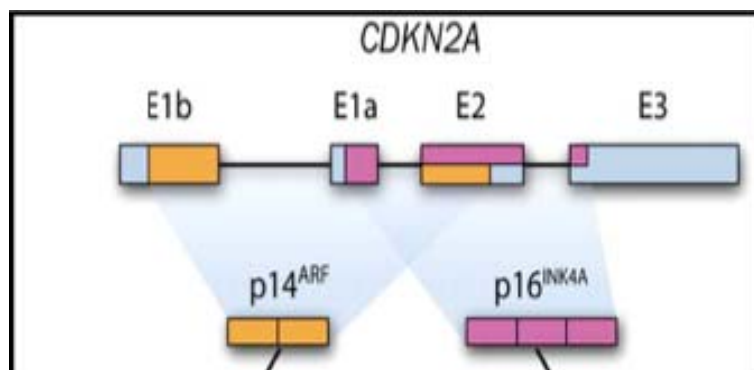
### **5.2.3. La senescència com un possible mecanisme de l'aturada dels nevus melanocítics adquirits**

La senescència cel·lular és aquell procés pel qual les cèl·lules somàtiques normals deixen de dividir-se després d'un nombre finit de vegades. Actualment, es considera com una barrera crucial en el procés de tumorigènesi i és controlada fonamentalment per gens supressors de tumors com p53 i la proteïna del retinoblastoma (pRB) (71).

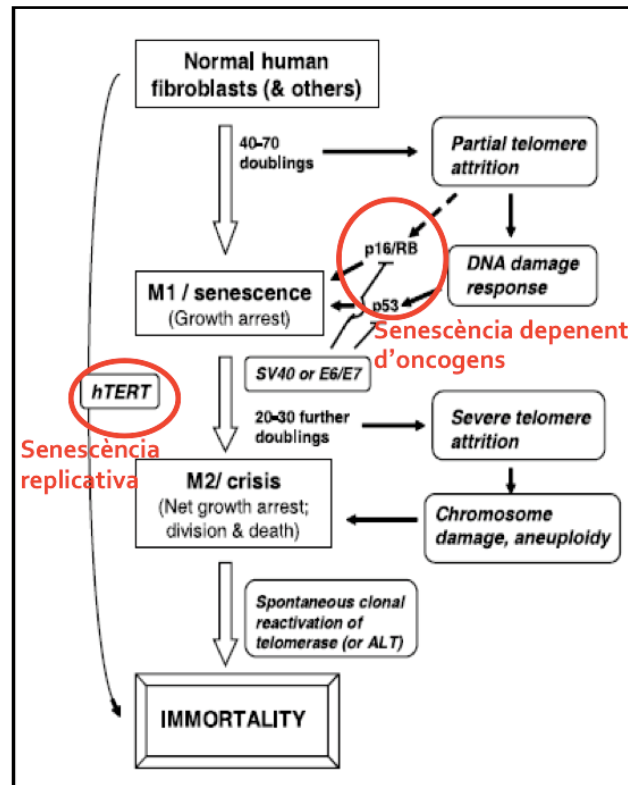
Clàssicament s'ha descrit la senescència com un procés lineal, en el qual existiria un primer bloqueig cel·lular (M1) en el qual intervindrien p16 (71) i p53. Si es supera aquest primer

bloqueig (per exemple mitjançant l'addició d'oncogens), les cèl·lules continuen proliferant fins a un segon *stop*, l'*stop* de crisi (M2). Aquest segon bloqueig cel·lular està relacionat amb l'escurçament telomèric. Els telòmers es troben al final dels cromosomes de les cèl·lules eucariotes i consisteixen en milers de repeticions d'una seqüència curta d'ADN. Aquestes seqüències no es repliquen correctament en el procés normal de divisió cel·lular, de manera que els cromosomes tendeixen a escurçar-se en cada divisió. El enzim telomerasa (hTERT) es troba inactiu en la majoria de cèl·lules somàtiques, però es reactiva en el 80-90% de cèl·lules canceroses humanes, mantenint la longitud dels telòmers i vulnerant el segon *stop* del procés de senescència cel·lular M2 o crisi.

Encara que també s'ha descrit com una alteració somàtica freqüent al melanoma, *CDKN2A* va ser el primer gen identificat associat a susceptibilitat genètica a melanoma quan es troba mutat a la línia germinal. *CDKN2A* posseeix la propietat de codificar 2 proteïnes diferents, p16 i p14ARF (**figura 11**). Les dues actuen com supressors de tumors i es troben mutades en moltes neoplàsies. p16 i el seu substrat CDK4 actuen sobre pRB, elements crucials en la senescència cel·lular i, si es perden o alteren, en el desenvolupament de neoplàsies, com per exemple, el melanoma. p14ARF actua en una via diferent, la via de p53, mitjançant la inhibició de HDM2, encarregada de reduir la quantitat i l'activitat de p53 (**figura 12**). Recentment, s'ha descrit en ratolins *knock-out* per p14ARF però amb p53 conservada, la importància de p14ARF, de forma independent a p53, en la senescència dels melanòcits, ja que aquests ratolins desenvolupen ràpidament melanoma.



**Figura 11.** Locus *CDKN2A*. Codificació de 2 proteïnes diferents (p14 i p16) a partir de la seqüenciació en exons diferents.



**Figura 12 . El model de senescència cel·lular amb M1 i M2.** SV40: indica el virus tumorogènic SV40 o la seva part llarga T oncogènica. E6/E7: oncogens del virus del papil·loma humà 16 (72).

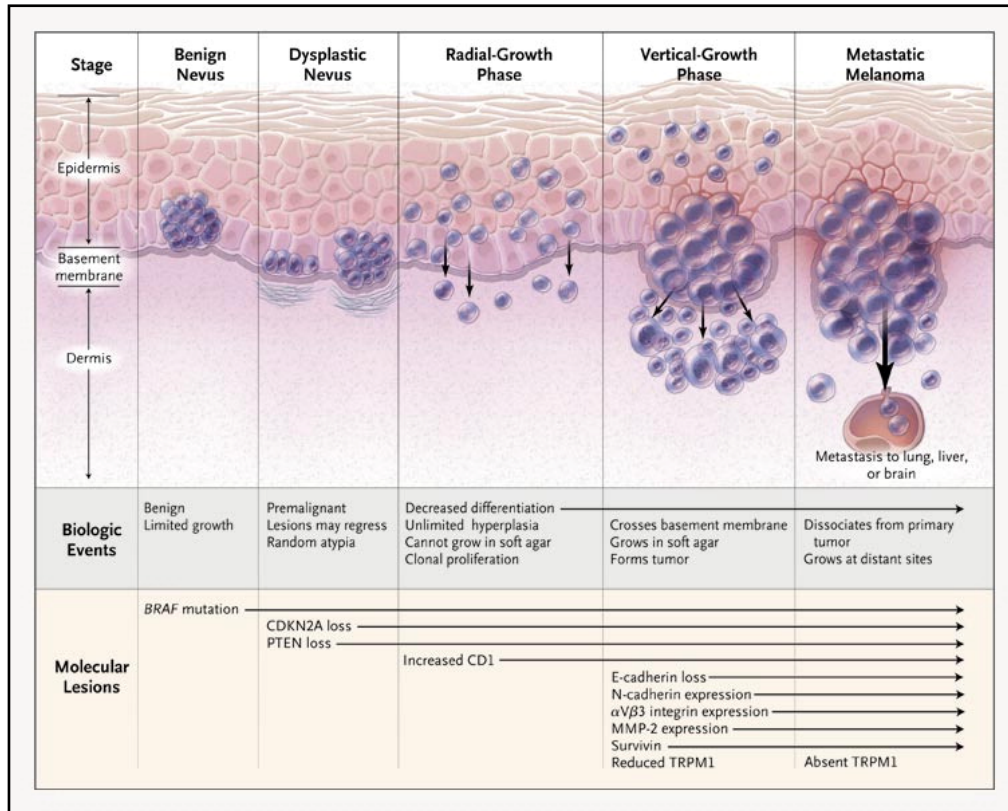
Els nevus melanocítics semblen ser una proliferació clonal de melanòcits que han parat el seu creixement per alguna raó. Un possible motiu seria la senescència cel·lular. Dona suport a la idea de que els nevus melanocítics són clones senescents el fet que cultius de melanòcits provinents de nevus, tinguin una vida més curta que els obtinguts de pell normal. A més, els cultius de melanòcits nèvics tenen característiques citològiques pròpies de cèl·lules senescents (mida augmentada, morfologia estrellada, binucleació ocasional). D'altra banda, els NMCA presenten activitat telomerasa baixa o absent, mentre que està augmentada en el melanoma i en alguns nevus displàsics (72).

D'altra banda, s'ha descrit que la transfecció de BRAF/V600E indueix en melanòcits humans en cultiu l'expressió nuclear de p16. Aquests mateixos autors descriuen immunopositivitat per p16 en aproximadament el 80% dels nevus melanocítics i absència de la mateixa en els melanòcits normals de la pell adjacent (2).

Contràriament, hi ha autors que pensen que els nevus no són cèl·lules senescentes. Els autors es basen en què s'ha vist en alguns estudis que les cèl·lules nèviques presentarien un cert, encara que molt baix nivell mitòtic i serien cèl·lules capaces de proliferar en diverses situacions com l'embaràs, per la irradiació ultraviolada i després de l'excisió incompleta d'un nevus. També s'ha publicat un estudi on es comparen diversos marcadors de senescència entre melanòcits normals i melanòcits transformats sense observar-ne diferències. Per tant, segons aquests autors, sí sembla clar que els nevus aturarien el seu creixement per alguna raó, però aquesta raó no seria la senescència mitjançada per oncogens (73).

#### **5.2.4. Alteracions moleculars dels nevus clínicament atípics o displàsics**

Actualment està clar que el melanoma cutani pot sorgir tant a la pell normal com sobre un nevus melanocític previ congènit o adquirit, essent probablement més freqüent la primera situació (74, 75). No obstant, el model de Clark per a la progressió del melanoma, en què el melanoma es desenvolupa a partir de nevus melanocítics benignes a través de nevus displàsics (76,77), és un model útil per analitzar en espècimens humans el paper de molècules potencialment rellevants per la biologia dels tumors melanocítics (**figura 13**). En aquest sentit, en els nevus displàsics s'han estudiat i detectat algunes alteracions moleculars que semblen reflectir una pèrdua de senescència en relació als NMCA, però amb moltes dades contradictòries entre els estudis i significat clínic desconegut.



**Figura 13. El model de Clark.** Descriu els canvis histològics que acompanyen la progressió des dels melanòcits normals al melanoma (77).

En un estudi de tot el genoma realitzat amb nevi comuns, displàsics i melanoma van observar moltes similituds en relació a l'expressió de múltiples gens implicats en la mitosi, apoptosi i la regulació de la transcripció (78). Respecte a marcadors cel·lulars d'apoptosi com el Bcl-2 o la survivina, no existeix suficient evidència per afirmar que els nevi displàsics són més resistents a l'apoptosi que els nevi comuns. En relació als marcadors de proliferació com Ki-67 i ciclina D1, els nevi displàsics poden presentar taxes més altes que els NMCA però més baixes que el melanoma (79).

En relació a la mutació de gens supressors tumorals, s'ha vist com alguns nevi displàsics presentarien més mutacions de p16 i p53 que els NMCA, però, segons alguns autors, el nombre de nevi examinats seria insuficient per determinar si aquesta troballa és real. En relació a l'expressió de p16 sembla ser que sí podria veure's compromesa en alguns nevi displàsics per la deleció del gen (explicat més endavant).

Les mutacions en p53, que es regula positivament per la senyalització de dany de l'ADN i promou l'apoptosi, es troben en més de 50% dels càncers i en menor mesura en el melanoma. Diversos estudis, tant moleculars com immunohistoquímics, han investigat la presència de mutacions de p53 en nevus displàsics amb resultats dispars.

En quant a pèrdues al·lèliques de p16, s'ha vist que alguns nevus displàsics poden albergar delecions a la regió cromosòmica 9p21 codificadora d'aquesta proteïna supressora de tumors. És important tenir en compte que la manca de detecció de mutacions en un gen no és sinònim de la presència del gen i/o expressió de la proteïna salvatge. Això és a causa de que les delecions poden produir-se en un al·lel (supressió hemizigòtica) que no serà detectat per mètodes de seqüenciació amb PCR. En el context d'aquesta pèrdua d'heterozigositat, la mutació o pèrdua de l'al·lel restant pot resultar en la pèrdua de funció o l'absència completa de la proteïna, que en el cas d'un gen supressor tumoral pot promoure la transformació.

En aquest sentit, sembla ser que un subconjunt de nevus displàsics presenten aberracions genètiques no vistes en NMCA, que inclouen la pèrdua d'heterozigositat de les regions que contenen el gen que codifica p16. Si la pèrdua d'heterozigositat de p16 hemizigòtica és compensada per l'al·lel restant o té com a resultat la disminució dels nivells de la proteïna segueix sent una pregunta oberta. Un estudi immunohistoquímic va trobar nivells més baixos de p16 amb localització nuclear en nevus displàsics en comparació amb nevus comuns, encara que un estudi anterior va trobar nivells comparables de p16 en ambdós.

PTEN, que actua com un supressor de tumors, estaria immunoexpressat en la majoria de nevus (aproximadament 60-70%) i absent en la majoria de melanomes; però segons el publicat no s'observen diferències significatives entre nevus displàsics i NMCA.

La inestabilitat de microsatèl·lits sembla que sí es veuria en alguns melanomes i nevus displàsics, però no en NMCA.

---

Per últim, sembla ser que els nevus displàsics poden mostrar nivells més alts d'estrès oxidatiu que els nevus comuns. No obstant, el paper de l'estrès oxidatiu en el desenvolupament i la progressió potencial dels nevus displàsics no s'ha investigat.

### **5.3. La involució dels nevus melanocítics adquirits**

La regressió espontània de tumors és un dels fenòmens més fascinants i alhora intrigants que es poden observar en medicina. Aquest rar succés ha estat descrit en pràcticament tots els tipus de càncers, i freqüentment en neoplàsies melanocítiques cutànies, tant benignes com malignes, en què el fenomen és més evident per la pèrdua de pigment (80, 81). En la inducció del fenomen de regressió s'han implicat múltiples mecanismes, entre els quals destaquen la resposta immune, l'apoptosi, la inhibició de l'angiogènesi, la diferenciació terminal cel·lular i la crisi genòmica (82, 83). En el cas dels tumors melanocítics sembla que el mecanisme immune és el que, per ara, s'ha relacionat d'una manera més consistent (80).

Tot i que la regressió parcial en el melanoma ocorre entre un 10 i un 35% dels casos, la documentació histològica de regressió completa és molt rara, amb una incidència estimada d'un 0,22-0,27% (84, 85). Fins a la data, hi ha menys de 50 casos documentats, encara que probablement estigui infradiagnosticada (86-88). Les sèries més llargues de melanomes xifren en aproximadament un 2,5-4% els casos de melanoma metastàtics en els quals el tumor primari és d'origen desconegut, el que fa intuir que molts d'aquests casos puguin correspondre a melanomes que han patit un procés de regressió completa amb posterioritat al procés de disseminació (84, 86, 89).

Per contra, la regressió completa de nevus melanocítics és molt més freqüent. Clàssicament, la pèrdua de pigmentació de les lesions melanocítiques s'ha associat a la presència d'un halo blanquinós perilesional. En els últims anys s'han documentat mecanismes de despigmentació diferents a l'halo nevus, com per exemple, en nevus congènits gegants o melanomes (84, 85, 88).

D'altra banda, la introducció de la dermatoscòpia digitalitzada, ha permès realitzar un seguiment més estret dels pacients amb múltiples nevus melanocítics, i millorar els

coneixements morfològics de les lesions pigmentades, sobretot des d'un punt de vista dinàmic (90, 91). Gràcies a aquest tipus d'aparells és possible disposar d'un control evolutiu de les mateixes. D'aquesta manera, es poden apreciar canvis morfològics en els nevus, tant transitoris com permanents, i és possible identificar mecanismes de despigmentació diferents a l'halo nevus, com comentarem posteriorment de forma més amplia.

Les característiques essencials d'una lesió melanocítica que ha sofert un procés de regressió espontània són la substitució de la població cel·lular tumoral per un estroma fibrós amb quantitats variables de melanòfags, inflamació i neovascularització (84). Des d'un punt de vista exclusivament histològic, quan la regressió és completa, és molt difícil determinar la naturalesa biològica de la lesió prèvia, i en la majoria d'ocasions tan sols el desenvolupament de metàstasis en el seguiment posterior del pacient permet establir aquesta distinció.

### **5.3.1. Aportacions de la dermatoscòpia a l'estudi de la nevogènesi i al seguiment evolutiu dels nevus melanocítics adquirits**

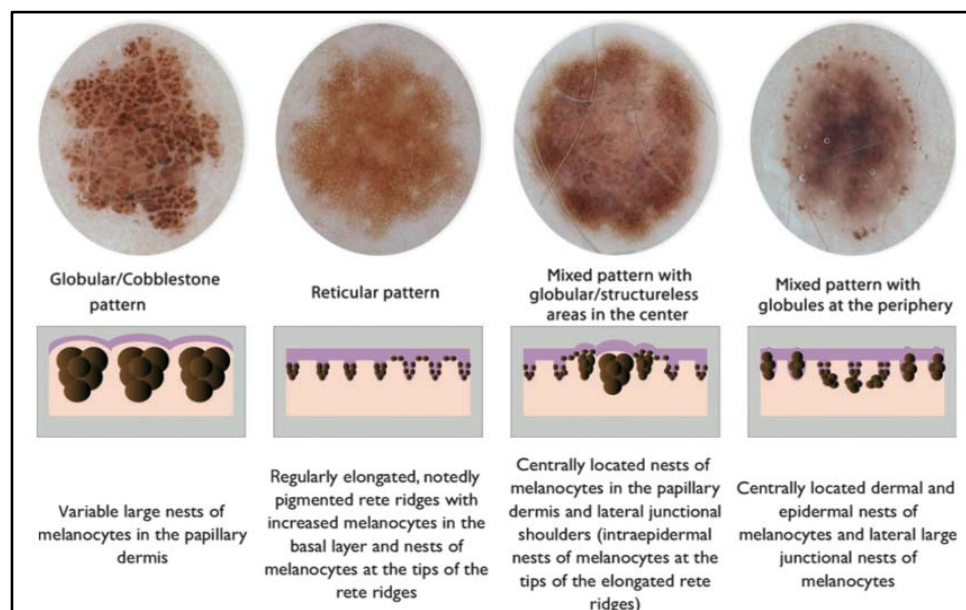
La utilització de la dermatoscòpia ha permès posar en dubte les teories clàssiques de l'origen i evolució dels nevus com la teoria de Unna. La classificació dels nevus melanocítics adquirits és una ciència que segueix evolucionant i, per tant, segueix sense haver-hi una classificació universalment acceptada. El que sembla que està clar és que les teories clàssiques, que eren teories basades en observacions histopatològiques no reflecteixen el caràcter dinàmic que tenen els nevus. Feia falta un concepte integratiu de la nevogènesi i sembla que la dermatoscòpia ha permès aquesta integració.

Així és com sorgeix la teoria dual de la **nevogènesi** (92) (**figura 16**). Segons aquesta, la majoria dels nevus melanocítics a excepció del nevus d'Spitz i el nevus blau poden ser classificats segons 4 patrons utilitzant el dermatoscop: els nevus amb patró globular o en empedrat, els nevus amb patró reticular i els nevus amb patró mixt que es dividiria en dos: nevus amb un patró globular o àrea marró sense estructura central i reticle perifèric i nevus amb un reticle o àrea marró sense estructura central i glòbuls perifèrics.



Aquests patrons dermatoscòpics presentarien una correlació histopatològica, del tal manera que **(figura 14)**:

- Els nevus amb patró globular correspondrien a una proliferació dèrmica de grans nius de melanòcits.
- El patró reticular reflectiria una proliferació intraepidèrmica de melanòcits amb una elongació regular de les crestes les quals es veurien més pigmentades gràcies a un augment dels melanòcits a la capa basal i amb nius a la punta de la cresta.
- Els nevus amb patró mixt presentarien una proliferació dèrmica central i un component més epidèrmic lateral. En el cas del patró globular o àrea marró sense estructura central i reticle perifèric hi hauria una proliferació central a la dermis papil·lar i un component juncional bilateral (donant la imatge clínica d'ou ferrat). En els nevus amb reticle o àrea marró sense estructura central i glòbuls perifèrics hi hauria una proliferació de nius a dermis i epidermis i una proliferació de grans nius juncionals bilateral que donaria lloc als glòbuls perifèrics.



**Figura 14.** Els quatre patrons dermatoscòpics més freqüents i la seva correlació histopatològica. Els nevus globulars/empedrat i els reticulars són proliferacions dèrmiques i intraepitelials primàries respectivament. Els nevus amb patró mixt revelen un component dèrmic central i epidèrmic lateral (92).

Aquests subtipus morfològics de nevus serien edat-dependents **(figura 15)**. Així, els que apareixen abans de la pubertat acostumen a presentar un patró globular. El patró mixt amb

glòbuls perifèrics és més freqüent durant la pubertat i adolescència. La majoria dels nevus dels adults mostrarien un patró reticular o el patró mixt amb glòbuls centrals. Mentre que els nevus en edats més avançades són típicament nodulars i revelen l'aparença típica d'un nevus intradèrmic. La dermatoscòpia en aquestes lesions no mostra cap estructura o a vegades algun glòbul residual.

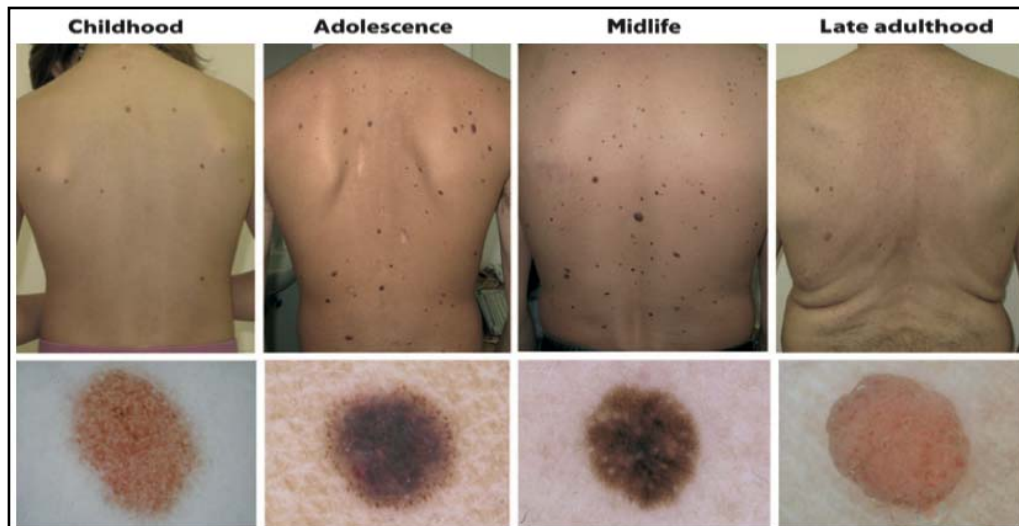


Figura 15. Patró dermatoscòpic dels nevus relacionat amb l'edat (92).

Aquestes observacions, on hi ha una clara diferència entre els patrons dermatoscòpics, sobretot reticular i globular, en funció de l'edat, va portar als autors a proposar la hipòtesi de que la nevocèlisi tindria lloc almenys per dos vies diferents (93) (**figura 16**). Una primera via, la **via constitucional o endògena** que donaria lloc als nevus amb patró globular amb predomini de grans nius a la dermis, que serien nevus que apareixerien durant la infància. Estudis longitudinals han mostrat que la majoria d'aquests nevus mantindrien aquest patró dermatoscòpic mentre creixen de forma proporcional al creixement del nen. Un cop el nevus s'ha estabilitzat, el nevus persistiria i adoptaria l'aparença típica d'un nevus intradèrmic. Per altra banda, hi hauria la **via adquirida** que seria responsable de nevus amb un patró predominantment reticular. Aquests nevus segurament derivarien de melanòcits epidèrmics, els quals tindrien un cicle vital dinàmic i podrien proliferar en resposta a factors com l'exposició a la radiació ultraviolada. Aquest tipus de nevus tindrien la capacitat de proliferar i presentar una migració horitzontal al llarg de la membrana basal. Aquests nevus després de

dècades, podrien involucrar presentant una desaparició gradual del pigment per eliminació transepidermàtica de cèl·lules apoptòtiques.

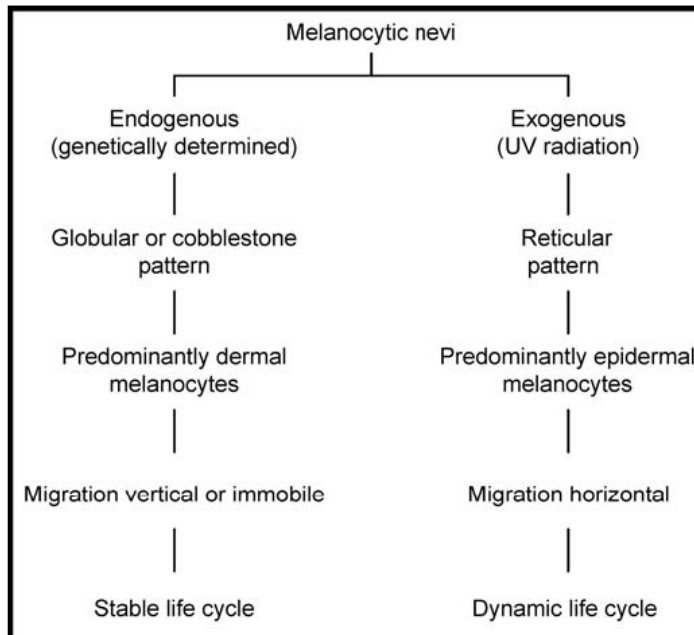


Figura 16. Resum esquemàtic de la teoria dual de la nevocènesi (93).

No obstant, no tots els autors estan d'acord amb aquesta teoria excessivament simplista i s'ha descrit també que els nevus de patró globular dels nens poden acabar tenint un patró reticular.

Pel que fa al **creixement** dels nevus, la dermatoscòpia ens ha permès tenir dades sobre quines són les modificacions observades al llarg del temps en els nevus melanocítics comuns. Un estudi va mostrar com la freqüència de nevus en creixement era inversament proporcional a l'edat, sent un fet relativament comú en pacients de menys de 20 anys i rar en grups d'edat més grans (94).

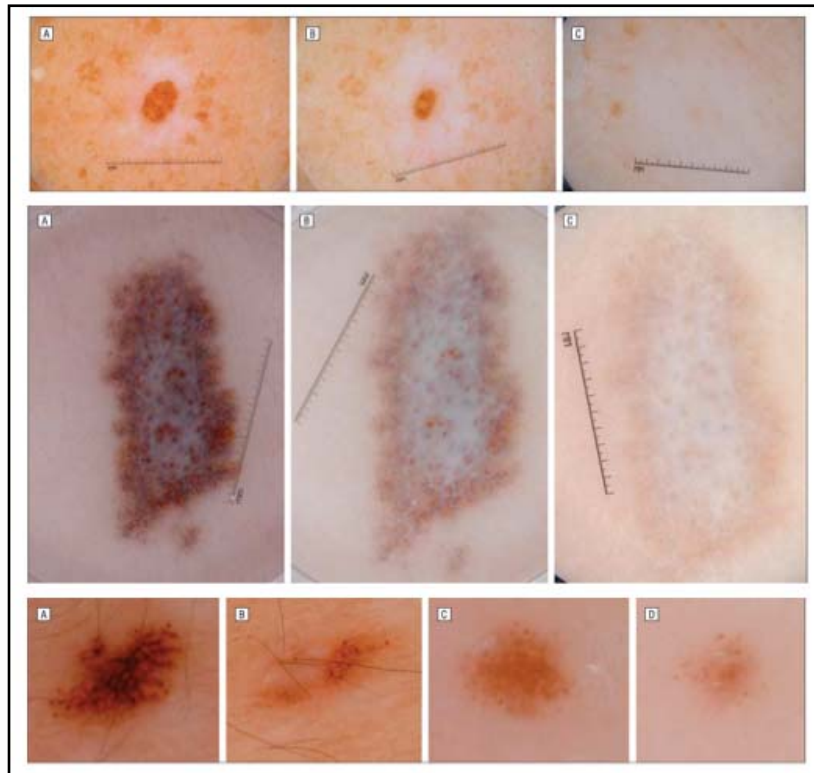
També ha permès demostrar com el ribet de glòbuls perifèrics és una troballa freqüent en nevus en creixement, observant-se en una de cada dos lesions (94). Això que ara ens sembla evident, no ho era en el moment de la seva publicació, ja que la presència de la corona perifèrica de glòbuls s'havia interpretat com una característica pràcticament patognomònica del nevus de Reed.

---

El fenomen **d'involució** o **desaparició** dels nevus també s'ha vist reflectit en alguns estudis basats en dermatoscòpia, principalment en pacients amb síndrome dels nevus amb atípia clínica que segueixen un control dermatoscòpic digital de les seves lesions melanocítiques (95-97). No obstant, també està descrit en pacients sense síndrome del nevus amb atípia clínica, com un fenomen que pot esdevenir durant tota la vida i inclús durant la infantesa.

Alguns autors han proposat diferents vies d'involució dels nevus segons els canvis en les característiques dermatoscòpiques observades durant el seguiment digital (98) (**figura 17**). La primera via seria mitjançant el fenomen de l'halo, per tant, un mecanisme immunomeditat pels limfòcits T. Aquest seria el paradigma dels nevus melanocítics que pateixen una regressió. La segona via seria la regressió amb l'aparició d'estructures típiques de regressió com el *peppering* ("puntejat blau en pebre") i les àrees de cicatriu blanca que es relaciona histopatològicament amb la presència de melanofàgia i fibroplàsia, i la tercera via seria una via sense cap d'aquestes dos característiques anteriors, on clínicament s'observa un fenomen de *shading* o esvaïment del nevus i en la que no està clar quin seria el mecanisme pel qual es produeix.

Així, el "*shading*", "*fading*" o esvaïment de nevus melanocítics es defineix com el fenomen que pateixen alguns nevus els quals desapareixen gradualment amb el temps, sense presentar inflamació macroscòpica aparent. Els termes de esvaïment i involució s'utilitzen indistintament, però haurien de diferenciar-se de regressió, que és un procés on hi ha inflamació i una resposta immunitària evident. No obstant, malgrat que s'haurien d'utilitzar de manera diferenciada, són termes que es barregen constantment quan fem referència a la desaparició dels nevus melanocítics (97).



**Figura 17.** Diferents mecanismes de regressió o involució dels nevus melanocítics. A la fila superior, el fenomen de l'halo. A la fila central, regressió amb estructures típiques ("peppering" i fibrosi). A la fila inferior, fenomen d'autoinvolució o "shading" (98).

En un altre estudi realitzat amb la intenció d'establir el valor de la dermatoscòpia per identificar possibles marcadors de regressió completa de lesions melanocítiques, varen observar que existeix una gran variabilitat entre el temps de despigmentació de les lesions i les estructures morfològiques observades, el que suggeriria la implicació de diferents mecanismes en la regressió dels nevus melanocítics pendents de caracteritzar (95).

A nivell histopatològic, en un estudi en la mateixa línia de l'anterior (96), s'han intentat definir les característiques histològiques de regressió en un grup reduït de nevus que presentaven una mitjana de temps de regressió completa ràpida (mitja de 6,4 mesos). Van observar que la presència d'una fibrosi que descriuen com delicada i de localització subepidèrmica i el predomini de limfòcits T CD8 eren les característiques histològiques més significatives.

Existeix un altre estudi que va tractar de caracteritzar l'immunofenotip de les cèl·lules de l'infiltrat inflamatori de nevus en halo i melanoma amb regressió en el que es van estudiar les possibles diferències en marcadors clàssics (CD4 i CD8), de resposta citotòxica (granzima B i TIA-1), en inhibidors de l'activitat de cèl·lules T (FoxP3 i PD1) i en la presència de cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (CD123), aquests dos últims grups implicats en la resposta tolerogènica que s'encarrega de silenciar la resposta immune (99). Aquests autors van observar que els marcadors de resposta citotòxica (TIA-1 i granzima B) serien més freqüents en els halo nevus mentre que en el melanoma en regressió la proporció CD123/TIA-1 seria superior a 1 suggerint la presència d'un mecanisme tolerogènic en aquests fenomen, sobretot en les fases inicials. No obstant, els halo nevus també presentarien un augment de la densitat de PD1, el que conjuntament amb les dades anteriors, indicaria la presència d'un ambient immune més actiu que seria fortament contrarestat en els halo nevus en relació al melanoma.

## 6. ANÀLISI IMMUNOHISTOQUÍMIC PER A LA DETECCIÓ DE LA MUTACIÓ BRAF/V600E

La ràpida i precisa detecció de mutacions de *BRAF* en el moment del diagnòstic de metàstasi en un melanoma és essencial per a una òptima atenció al pacient a causa de l'existència dels nous fàrmacs contra dianes terapèutiques que hem comentat en l'apartat 5.2.1. La tècnica *gold standard* per a la seva anàlisi és la seqüenciació directa del DNA del tumor. Hi ha disponibles altres tècniques (totes d'anàlisi d'ADN), la majoria basades en PCR (PCR quantitativa, seqüenciació mitjançant *locked Nucleic acid-PCR*, piroseqüenciació, assaigs mitjançant tecnologia *snapshot*). La combinació de diferents mètodes és habitual. Cadascuna de les tècniques posseeix diferent sensibilitat, especificitat i costos. Requereixen instrumental especialitzat costós, una tècnica precisa i un control rigorós de qualitat, que no és habitual trobar en molts laboratoris d'anatomia patològica. Per aquest motiu, moltes vegades cal enviar el teixit tumoral a laboratoris especialitzats amb un obvi retard en el diagnòstic. L'anàlisi immunohistoquímic és una tècnica àmpliament utilitzada al laboratori. És més ràpida, presenta una millor relació cost-efectivitat i major sensibilitat.

El desenvolupament en els darrers anys d'un anticòs monoclonal (VE1) que pot identificar BRAF/V600E en un anàlisi immunohistoquímic de rutina, de mostres parafinades, pot facilitar l'anàlisi molecular d'aquesta proteïna per a fins diagnòstics i pronòstics.

Tot i que des de la primera publicació d'aquesta tècnica l'any 2011 (100), són múltiples els estudis que s'han anat publicant en la detecció de BRAF/V600E en melanoma, són escassos els que s'han fet en NMCA o nevus displàsics (101-103).

Existeix un treball interessant que, utilitzant l'anticòs VE1, mira la immunoexpressió de la mutació BRAF/V600E en nevus amb diferents patrons dermatoscòpics i histològics, observant que la presència de glòbuls *versus* reticle i la de creixement intradèrmic o nius junturals grans *versus* l'absència dels mateixos, s'associa clarament a la presència de la positivitats per VE1 (104).

# Hipòtesis





**Hipòtesi 1:** El número de nevus infantils a l'àrea sanitària de Lleida, la seva progressió amb l'edat i la seva distribució per àrees anatòmiques i gènere és similar al observat en àrees o països del nostre entorn. Aquest número estaria relacionat amb factors constitucionals com el fototipus i amb factors exògens com l'exposició solar, les cremades solars i l'ús de fotoprotectors.

**Hipòtesi 2:** Els nevus melanocítics adquirits són proliferacions melanocítiques clonals, sovint induïdes per la mutació *BRAF/V600E*, que podrien haver aturat el seu creixement gràcies a l'activació de molècules implicades en el procés de senescència cel·lular (p16, p53, pRB i hTERT). En els nevus melanocítics adquirits també s'ha demostrat una sobreexpressió dels canals de calci de tipus T. Els patrons d'expressió d'aquestes molècules podrien ser diferents en funció del tipus de nevus melanocític estudiat, tant segons la seva classificació histopatològica com dermatoscòpica.

**Hipòtesi 3:** L'anàlisi immunohistoquímic utilitzant un anticòs anti-BRAF (VE1) per detectar la presència de la mutació *BRAF/V600E* en pacients amb nevus melanocítics i melanoma primari i metastàtic presentaria una bona especificitat i sensibilitat en comparació a la detecció d'aquesta mutació mitjançant seqüenciació genètica directa.

**Hipòtesi 4:** La majoria dels fenòmens de regressió observats en nevus en pacients amb síndrome del nevus displàsic difereixen de la regressió paradigmàtica amb el fenomen d'halo o de la regressió amb la presència d'estructures típiques com el *peppering*/melanofàgia o les àrees blanques de fibrosi. Pel contrari, es solen caracteritzar per presentar un temps mig de regressió llarg i seguir una evolució de tipus *shading* o esvaïment. Les característiques morfològiques a nivell histològic i la tipificació del infiltrat inflamatori podrien ajudar a definir criteris d'aquest fenomen.



# Objectius



**1. Determinar en la població pediàtrica de l'àrea Sanitària de Lleida el número de nevus melanocítics adquirits, la seva distribució anatòmica i avaluar els factors constitucionals i ambientals associats**

- A. Determinar el número i distribució anatòmica dels nevus melanocítics comuns adquirits en nens de tres grups d'edat diferents (4, 8 i 14 anys)
- B. Recollir les característiques de fototipus, color del cabell i dels ulls d'aquests nens
- C. Investigar la història d'exposició solar dels nens (hores de sol/any i acumulades, ús correcte del fotoprotector, antecedents de cremades solars)
- D. Investigar les diferències en el número de nevus segons edat, localització anatòmica i gènere
- E. Analitzar la relació entre el número de nevus amb els factors constitucionals dels nens i amb les dades de la seva història d'exposició solar

**2. Investigar la immunoexpressió diferencial en els nevus melanocítics adquirits de marcadors de senescència, altres gens supressors tumorals, mutació BRAF/V600E i canals de calci de tipus T, segons la seva classificació histològica i dermatoscòpica**

- A. Investigar la sensibilitat i especificitat de l'estudi immunohistoquímic de l'estat mutacional de BRAF en mostres parafinades de nevus melanocítics i melanomes utilitzant un anticòs anti-BRAF/V600E, usant com a control la presència de mutació demostrada mitjançant seqüenciació directa del gen
- B. Recollir una sèrie de nevus melanocítics adquirits, amb un número proporcional de nevus junturals, compostos, intradèrmics i displàsics, segons la seva classificació histològica
- C. Classificar dermatoscòpicament aquesta sèrie de nevus segons el patró dermatoscòpic global i el patró dermatoscòpic proposat per Iris Zalaudek (92)
- D. Determinar les característiques dermatoscòpiques locals del nevus
- E. Comparar entre sí la classificació histològica i les classificacions dermatoscòpiques
- F. Avaluar la distribució de les característiques dermatoscòpiques locals dels nevus segons la seva classificació histològica i les classificacions dermatoscòpiques

- G.** Valorar per immunohistoquímica l'expressió de marcadors de proliferació i cicle cel·lular (Ki67 i ciclina D1), marcadors de senescència (p16, p53, pRB i hTERT), altres gens supressors tumorals (PTEN), mutació BRAF/V600E i canals de calci de tipus T (Cav3.1 i Cav3.2)
- H.** Correlacionar les diferències d'expressió dels biomarcadors immunohistoquímics entre els diferents tipus de nevus melanocítics segons la classificació histològica i els dos tipus de classificacions dermatoscòpiques emprades.

**3. Estudi descriptiu del fenomen d'autoinvolució en pacients amb síndrome del nevus amb atípia clínica que es troben sota seguiment digital mitjançant SIAscòpia**

- A.** En una sèrie ampla de pacients, revisar aquells que tenen nevus amb signes d'autoinvolució i recollir les següents dades:
  - I.** Sexe i edat del pacient
  - II.** Número de nevus en autoinvolució i localització
  - III.** Temps transcorregut en produir-se la despigmentació
  - IV.** Característiques obtingudes per SIAscòpia de les imatges en color, de la melanina total i de la melanina dèrmica
- B.** Selecció en els mateixos pacients d'una sèrie petita de nevus en autoinvolució a extirpar. Estudi en els nevus extirpats de:
  - I.** Les característiques histopatològiques
  - II.** L'expressió immunohistoquímica de diferents marcadors immunològics, d'apoptosi i mutació BRAF/V600E
  - III.** Correlació entre variables histopatològiques i immunohistoquímiques seleccionades

# **Material i mètodes**





## **TREBALL 1: Epidemiologia dels nevus a la infància a la Regió Sanitària de Lleida**

### **1.1. Disseny de l'estudi**

Es va dissenyar un estudi transversal, que es va dur a terme entre abril del 2007 i setembre del 2008.

### **1.2. Pacients**

La població a estudi comprenia nens de 4, 8 i 14 anys que vivien a la ciutat de Lleida (Catalunya) o ciutats i pobles del voltant. Els nens van ser reclutats pels seus pediatres d'atenció primària quan assistien a la revisió mèdica de rutina del programa del nen sa. Es van excloure pacients de raça negra.

### **1.3. Metodologia**

Van participar vint pediatres d'atenció primària de la Regió Sanitària de Lleida. Es van dur a terme per part de 2 especialistes en Dermatologia sessions de formació abans de l'inici de l'enregistrament de dades. Es varen mostrar i discutir un centenar d'imatges clíniques de nevus melanocítics (comú, congènit, atípic, blau i halo nevus).

El mateix dia de la revisió mèdica del nen sa, el/la pediatre/a completava un qüestionari amb els pares dels nens (per a nens de 4 i 8 anys) o amb els pares i fill/a (per a nens de 14 anys). Se'ls va interrogar sobre el número d'hores d'exposició al sol, la capacitat de bronzejar-se, el fototipus, el número de cremades solars i l'ús de filtres solars (**annex 1**). Es va registrar el color de cabell i ulls. Els pares van ser informats sobre l'estudi i es va sol·licitar el seu consentiment.

#### **1.3.1. Recompte de nevus**

Es van definir com nevus melanocítics adquirits màcules o pàpules pigmentades  $\geq 2$ mm de diàmetre, no congènites, de color marró-negre. Es va definir com nevus atípic aquell major de 5mm amb una vora irregular i/o pigmentació irregular. Es van excloure els nevus congènits i nevus blaus. Per evitar qualsevol confusió entre nevus i efèlides, es van considerar només nevus amb un diàmetre  $> 2$ mm. Les lesions maculars ubicades en zones

fotoexposades amb una tendència a la confluència i a la desaparició durant l'hivern es van considerar com efèlides (105). No es va tenir en compte la diferenciació del lentigen simple amb el nevus melanocític de la unió.

El dia de l'enquesta el pediatra examinava la pell dels nens buscant els nevus melanocítics adquirits i registrant la seva mida. Es va excloure l'examen del cuir cabellut. Els nevus de 2-4.9mm de diàmetre es van marcar amb el signe més (+) en una figura esquemàtica inclosa a l'enquesta (**annex 2**). Els nevus  $\geq 5$ mm es van registrar amb un cercle (o) i els nevus atípics amb un quadrat ( $\square$ ). Tots els nens amb nevus atípics o amb lesions equívocues van ser revaluats al Departament de Dermatologia de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova (Lleida). Es duia a terme una reunió mensual amb els pediatres d'atenció primària per discutir els casos dubtosos que van sorgir.

### **1.3.2. Característiques constitucionals de pigmentació**

Es va recollir informació sobre el color dels cabells (clar, fosc o pèl-roig) i el color dels ulls (clar o fosc). El color de la pell es va avaluar segons una escala de 7 graus en funció del color de la pell a la part interna dels braços (blanc, marró clar, mitjà, groguenc, fosc, quasi negre). El patró de reacció a l'exposició al sol es va avaluar amb la pregunta: "Què li passa al seu fill/a si ell/ella juga a la platja sense protecció solar?" i es responia amb un d'aquests ítems: es bronzeja molt, en general es bronzeja, generalment es posa vermell i algunes vegades es bronzeja, sempre es posa vermell, no sap/no respon i sempre usa protector solar. D'altra banda, la reacció habitual de la pell del nen a la llum solar es va registrar i es va classificar com: sempre es crema, es crema gairebé sempre però de vegades es bronzeja i gairebé sempre es bronzeja i mai es crema. Aquesta pregunta es va afegir a l'anterior per evitar un possible biaix a causa del sentiment de culpabilitat dels pares davant del metge si deien que no aplicaven sistemàticament crema solar als seus fills/es.

### **1.3.3. Recompte de nevus per regions anatòmiques**

El recompte de nevus es va fer tenint en compte les següents 7 àrees anatòmiques: el cap (es va excloure el cuir cabellut), el tronc, l'àrea coberta pel banyador (per la peça de baix del banyador per a tots dos sexes), braços (braços i avantbraços), mans, cames (cuixes i cames) i peus.

#### **1.3.4. Història d'exposició al sol i hàbits de protecció solar**

Per tal de calcular el número total d'hores d'exposició solar, es van contemplar 2 períodes diferents de l'any (abril-juny i juliol-setembre, de les 10.00h fins a les 18.00h). Per al període d'abril a juny, es van considerar les següents activitats: l'ús de roba d'estiu o roba esportiva (samarreta i pantalons curts/faldilla) per caminar a l'aire lliure, a l'escola (esbarjo i la classe d'educació física) i durant les activitats extraescolars a l'aire lliure. De juliol a setembre, es van considerar les següents activitats: hores que van passar a l'aire lliure amb roba d'estiu o esportiva caminant, a l'escola i durant activitats extraescolars a l'aire lliure i hores amb banyador a la piscina i/o la platja. L'exposició al sol del període d'octubre a març no es va tenir en compte ja que, a la nostra regió, situada a l'oest i interior de Catalunya, el número de dies assolellats durant aquests mesos és baix.

En quant a l'ús de protector solar, es va demanar als pares sobre el seu ús en certes situacions: passejant a l'aire lliure amb samarreta i/o pantalons curts i a la platja/piscina. També es va registrar la freqüència de reaplicació del protector solar i el factor de protecció solar.

#### **1.3.5. Nombre de cremades solars**

Es van registrar el número i la intensitat (sense o amb butllofes) de les cremades solars al llarg de la vida dels nens.

#### **1.4. Anàlisi estadístic**

La descripció de cada grup de nens inclou la mediana més el rang interquartil (o mitjana i desviació estàndard) i les freqüències, per a les variables quantitatives i qualitatives, respectivament.

La presència de qualsevol nevus melanocític (és a dir, excloent els nevus atípics, ja que el seu número era molt baix en totes les cohorts: <1) es va analitzar per lloc anatòmic i l'edat. Les diferències en cada lloc anatòmic per edat es van avaluar utilitzant el test  $\chi^2$  (o el test de Fisher en presència de qualsevol freqüència esperada inferior a 5), i si era significatiu, es van calcular la *odds ratio* (OR) i els intervals de confiança del 95% (IC) per comparar els diferents

grups d'edat (8 anys vs 4 anys i 14 anys vs 8 anys d'edat i, en cas de no obtenir resultat significatiu, també la OR de 14 vs 4 anys d'edat). Es va utilitzar el mateix anàlisi per mirar diferències en l'ús de protecció solar. El test de Mann-Whitney (i la prova t si el supòsit de normalitat és cert) es va utilitzar per avaluar les diferències en el número de nevus melanocítics entre els nens i nenes segons la seva localització anatòmica i edat.

Degut a la presència de sobredispersió, es van estimar models de regressió binomial negativa pel nombre de nevus melanocítics en cada grup d'edat, ajustats per sexe, tipus de pell (I-II vs. III-IV), ús de protector solar, i l'exposició solar acumulada a platges i piscines, així com en altres activitats a l'aire lliure. També es van proporcionar els coeficients i els seus intervals de confiança del 95%. Els possibles factors de confusió (canvis >20%) i els efectes de la interacció entre les variables explicatives van ser revisats, estratificant l'anàlisi en el cas d'interaccions significatives.

---

**TREBALL 2: Immunoexpressió diferencial de marcadors de senescència, gens supressors de tumors, BRAF/V600E i canals de calci de tipus T en nevus adquirits d'acord amb la seva classificació histopatològica i dermatoscòpica****2.1. Material****2.1.1. Mostres de nevus melanocítics**

Corresponen a una sèrie de nevus melanocítics de pacients visitats a la secció de Dermatologia de l'Hospital Arnau de Vilanova que van ser seleccionats de manera prospectiva durant el meu període de Residència (2009-2013). La selecció es va fer tenint en compte l'orientació diagnòstica segons els criteris clínics de nevus juntural, intradèrmic, compost o atípic. No es varen incloure nevus localitzats a mans o peus. En tots els casos es van realitzar fotografies clíniques (amb referència de la seva mida en mm) i dermatoscòpiques abans de practicar l'exèresi quirúrgica. Posteriorment, un cop estudiats des del punt de vista histopatològic per 2 patòlegs independents, es va realitzar una redistribució dels casos en els diferents subtipus histològics de nevus melanocítics, seguint criteris uniformes preestablerts. La sèrie final seleccionada estava composta per 80 biòpsies [60 nevus melanocítics comuns adquirits (20 junturals, 20 compostos, 20 intradèrmics) i 20 nevus displàsics)].

**2.1.2. Mostres de melanoma primari i metastàtic**

Es va utilitzar una sèrie de biòpsies de l'arxiu del Servei d'Anatomia Patològica i Genètica Molecular de l'Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida (HUAV). Aquesta sèrie estava composta per 39 melanomes primaris (20 d'extensió superficial, 6 nodulars, 6 sobre lentigen maligne, 6 lentiginosos acral i 1 inclassificable) i 25 metàstasi de diversa localització (10 cutànies, 10 ganglionars, 2 pulmonars, 1 d'epiplon, 1 suprarenal i 1 parotídia).

(Totes les mostres biològiques provinents de pacients varen estar obtingudes mitjançant consentiment informat específic, aprovat pel CEIC del nostre Centre).

## 2.2. Mètodes

### 2.2.1. Recollida de dades

Els nevus que varen ser seleccionats per l'estudi se'ls hi va assignar una referència identificativa. Per cada un d'ells es varen recollir les dades següents: número d'història clínica, número de biòpsia, edat, sexe, localització, àrea en mm<sup>2</sup> i classificació histològica.

L'àrea en mm<sup>2</sup> es va calcular dividint la superfície total del nevus en figures geomètriques d'àrea coneguda i fent el sumatori.

Pel que fa a la localització es van considerar els següents grups: cap/coll, pectoral, abdomen, esquena superior, esquena inferior, extremitat superior i extremitat inferior. Aquesta localització a la vegada es va classificar en dos grups com: àrea d'exposició solar crònica o intermitent.

### 2.2.2. Anàlisi de les imatges dermatoscòpiques

L'estudi es va realitzar sobre fotografies dermatoscòpiques de cada nevus per tres observadors independents, especialistes en Dermatologia, sense informació sobre la imatge clínica de la lesió i el seu diagnòstic histopatològic. Les diferents característiques dermatoscòpiques observades varen ser recollides en una taula dissenyada prèviament.

En primer lloc, es va valorar el patró dermatoscòpic global, segons l'anàlisi de patrons que, de manera simplificada, es va agrupar en les següents categories: 1.Reticular. 2.Globular/empedrat 3.Retículo-globular/empedrat. 4.Homogeni. 5.Esclat d'estrelles. 6. Paral·lel. 7. Multicomponent (considerant com a tal aquell en que es combinaven 3 o més estructures dermatoscòpiques en una lesió) 8. Inespecífic (en el nostre treball es va definir com a tal, el patró caracteritzat per l'absència de pigment o presència únicament de traces de pigment marró-gris que no permetia englobar-lo en cap dels patrons anteriors).

En segon lloc, els nevus varen ser classificats utilitzant la classificació dermatoscòpica proposada per Iris Zalaudek (92) en què es consideren el següents patrons: 1. Patró reticular. 2. Patró globular/empedrat. 3. Patró mixte: patró globular o àrea marró sense estructura

central i reticle perifèric (GC/RP). 4. Patró mixte: reticle o àrea marró sense estructura central i glòbuls perifèrics (RC/GP).

En tercer lloc, es van recollir les característiques locals dels nevus: 1. Reticle típic/atípic. 2. Glòbuls regulars/irregulars. 3. Projeccions radials regulars/irregulars. 4. Vel blau-blanquinós. 5. Àrees de regressió. 6. Hipopigmentació. 7. Despigmentació. 8. Traces de pigment marró-gris. 9. Taques de pigment simètriques/asimètriques. 10. Vasos: en coma, en forquilla, puntiformes, lineals irregulars i vasos i/o eritema dins d'estructures de regressió.

En els casos de discrepància entre observadors, es va triar l'opció en què dos dels observadors estaven d'acord. Si hi havia discrepàncies entre els tres observadors, el cas en particular es va discutir fins arribar a un acord.

### **2.2.3. Disseny i construcció dels *arrays* matricials de teixit (TMA) amb les mostres de melanoma**

Es varen elaborar 2 TMA, un amb les mostres provinents de melanomes primaris i un altre amb melanomes metastàsics (apartat 2.1.2 de material) amb l'ajuda d'un instrument per a la construcció dels *Tissue Micro Arrays* (*Beecher Instruments TMA apparatus*) (**figura 18**). Per a la selecció de les zones més representatives de cada tumor, es varen efectuar tincions simples d'hematoxilina-eosina sobre els talls complets de les mostres obtingudes. Es va utilitzar un sistema manual per a l'extracció i inserció dels cilindres. La tècnica va consistir en prendre un petit cilindre del bloc de parafina de la mostra d'interès (bloc donant), segons el mapa elaborat prèviament sobre els talls tenyits, i inserir de manera precisa en un bloc receptor de parafina (bloc "en blanc") adequadament perforat. Es varen utilitzar cilindres d'1 mm de gruix. L'homogeneïtzació de les mostres un cop introduïdes en el bloc receptor es va realitzar mitjançant calor. Es va anotar la posició de cada cilindre per poder identificar-los posteriorment. D'aquesta manera, es va controlar la identificació de cada cilindre, la seva disposició a la matriu i la determinació del nombre de mostres.





Figura 18. Construcció de TMA.

#### 2.2.4. Preparació de les mostres de nevus melanocítics

La preparació de les lesions melanocítiques benignes no es va poden realitzar mitjançant TMAs ja que la selecció de zones de 0,4 o 1 mm de diàmetre en nevus junturals o displàsics corria el risc de no obtenir material representatiu, en especial, perdre el component juntural, a part del problema que representa les reduïdes dimensions d'alguns d'aquests tipus de nevus. L'estudi immunohistoquímic dels nevus, per tant, es va realitzar fent tincions de les seccions completes.

Es van reconstruir blocs de parafina agrupant 5 mostres de cada nevus a cada bloc/lamineta respectant la classificació per subtipus histològics per tal d'optimitzar el mètode immunohistoquímic i reduir els costos.

#### 2.2.5. Estudi immunohistoquímic de ki67, ciclina D1, p16, p53, pRB, hTERT, PTEN, VE1 (BRAF/V600E), Cav3.1 i Cav3.2

Es varen practicar seccions de 3 micres de gruix dels blocs de parafina que es van deixar assecar durant 16h a 56°C, es van desparafinar amb xilè i es varen rehidratar mitjançant una sèrie successiva de solucions amb una graduació decreixent d'etanol per, finalment, rentar-los amb PBS. El desemascarament antigènic es va realitzar en una plataforma de DAKO,

anomenada PT Link. El PT link combina un bany amb solucions aquoses (contenen EDTA, Tris-HCl) a pH diferents (6-9pH) en funció de l'antigen a recuperar amb elevades temperatures (95-97°C) durant aproximadament uns 20 minuts. Abans d'iniciar la tinció, es va bloquejar la peroxidasa endògena.

A les mostres provinents de nevus melanocítics, es van emprar com anticossos primaris Ac anti-Ki67, anti-ciclina D1, anti-p16, anti-p53, anti-pRB, anti-hTERT, anti-PTEN, anti-BRAF/V600E (VE1), anti-Cav3.1 i anti-Cav3.2 en un interval de dilucions de 1:400 a 1:600 (la dilució dels Ac anti-p16, anti-p53, anti-RB i anti-Ki-67 ja s'havia determinat prèviament en el nostre laboratori) (**Annex 3**). A les mostres provinents de melanomes, únicament es va fer la immunotinció de BRAF/V600E que, posteriorment, es va comparar amb el resultat de l'estudi mutacional de BRAF.

Després de la incubació dels esmentats anticossos primaris, la reacció es va visualitzar amb el Kit Envision Flex+ Detection (DAKO) emprant com a substrat el cromogen diaminobenzidina (DAB). No obstant, la detecció per IHC de VE1 es va realitzar sota les condicions i plataforma de *Ventana Medical Systems, Inc* de Roche® (Arizona, USA). La prova es va realitzar en un instrument de tinció *IHC/ISH Benchmark XT* amb un pretractament (*Cell Conditioning 1*) durant 64 minuts, i l'anticòs primari durant 16 minuts. La concentració final de la VE1 va ser ~ 12µg/ml. Per detectar la proteïna es va utilitzar el Kit de detecció de *IHC DAB OptiView*. Les seccions es van tenyir amb hematoxilina i el reactiu *Bluing Reagent* durant 4 minuts. Per mesurar el nivell de senyal de fons no específic, cada teixit també es va tenyir amb un anticòs monoclonal de ratolí (MOPC-211) [Control Negatiu (monoclonals), *Ventana Medical Systems, Inc*]. Aquest anticòs no està dirigit contra cap epítoc conegut present en els teixits humans. Les seccions es varen contrastar amb hematoxilina.

Els resultats de la tinció immunohistoquímica varen ser avaluats per dos observadors seguint criteris uniformes preestablerts. La immunoexpressió es va graduar de forma semiquantitativa considerant el percentatge i la intensitat de la tinció. A cada mostra se li va assignar una puntuació histològica (*histoscore*) que oscil·lava des de 0 (tinció negativa) fins a 300 (màxima immunoreactivitat). La puntuació es va obtenir aplicant la fórmula següent:  $Histoscore = 1X (\% \text{ tinció dèbil}) + 2X (\% \text{ tinció moderada}) + 3X (\% \text{ tinció intensa})$ . La validesa d'aquest sistema de puntuació per avaluar els resultats de tincions immunohistoquímiques ha estat demostrada prèviament (106). Per assegurar la representativitat de les mostres

observades en el TMA, es va realitzar una validació mitjançant tinció aleatòria d'uns 30 casos en els blocs d'origen.

En els nevus melanocítics junturals de patró lentiginós en els que no es va poder identificar teques nèviques a la unió dermo-epidèrmica no es varen valorar les tincions dels marcadors de proliferació i cicle cel·lular (Ki-67 i ciclina D1) per la dificultat de diferenciar les cèl·lules nèviques proliferatives dels queratinòcits proliferatius de la capa basal epidèrmica.

### **2.2.6. Estudi mutacional de *BRAF* en nevus melanocítics i melanoma**

Per a l'estudi mutacional de *BRAF* es varen seleccionar totes les mostres de melanoma primari i metastàtic (39 i 25 mostres respectivament) i 5 mostres de cada subtipus histològic de nevus (juntural, compost, intradèrmic i displàsic), per tant, 20 nevus en total.

En els casos de melanoma que per motius assistencials s'havia determinat la presència de mutació de *BRAF* per Cobas, en el cas que el resultat fos negatiu, no es varen fer més estudis i la mostra es va considerar negativa. En el cas que el resultat fos positiu, es va seqüenciar ja que per Cobas no es pot distingir si la mutació de *BRAF* és *V600E* o *V600K*.

En els melanomes en què va ser precís la determinació de la mutació per seqüenciació i en tots els nevus, aquesta es va realitzar de la manera següent: l'ADN genòmic va ser extret a partir de biòpsies fixades en formol i parafina. L'anàlisi de les mutacions es va dur a terme mitjançant seqüenciació directa dels productes generats mitjançant PCR amb encebadors específics dissenyats per cobrir els exons d'interès del gen *BRAF* (NM\_004333). Els encebadors de *BRAF* utilitzats varen ser l'exó 15 50-TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA-30 (*forward*) i 50- GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A-30 (*reverse*). Les condicions per a les reaccions de PCR van ser les següents: desnaturalització a 95°C durant 2 minuts, seguit de 35 cicles a 96°C durant 30 segons, 55°C durant 30 segons, 72°C durant 30 segons i completat amb una etapa d'extensió a 72°C durant 10 minuts. Els productes d'amplificació varen ser purificats utilitzant el *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) i seqüenciats en ambdues direccions amb la parella d'encebadors originals utilitzant BigDye v1.1 (*Applied Biosystems*, Foster City, CA) en combinació amb un seqüenciador d'ADN ABI PRISM 3100 DNA (*Applied Biosystems*).

### 2.2.7. Correlacions entre les diferents variables estudiades

Es varen correlacionar les diferents variables en els següents aspectes:

1. Diferències en les dades clíniques (edat, sexe, localització, fotoexposició i àrea en mm<sup>2</sup>) entre nevus comuns i displàsics.
2. Diferències en les dades clíniques (edat, sexe, localització, fotoexposició i àrea en mm<sup>2</sup>) segons el patró dermatoscòpic global.
3. Diferències en les dades clíniques (edat, sexe, localització, fotoexposició i àrea en mm<sup>2</sup>) segons la classificació dermatoscòpica proposada per I. Zalaudek.
4. Comparació entre les diferents classificacions (histològiques vs dermatoscòpiques).
5. Avaluació de l'associació entre les característiques dermatoscòpiques locals i la classificació dermatoscòpica per patrons globals.
6. Avaluació de l'associació entre les característiques dermatoscòpiques locals i la classificació dermatoscòpica segons I. Zalaudek.
7. Avaluació de l'associació entre les característiques dermatoscòpiques locals i les classificacions histològiques.
8. Diferències d'immunoexpressió dels biomarcadors segons el patró dermatoscòpic global.
9. Diferències d'immunoexpressió dels biomarcadors segons els patrons dermatoscòpics proposats per I. Zalaudek.
10. Diferències d'immunoexpressió dels biomarcadors entre nevus comuns i displàsics.
11. Diferències d'immunoexpressió dels biomarcadors entre nevus junturals, compostos, intradèmics i displàsics.

### 2.2.8. Determinació de la sensibilitat i especificitat de l'estudi immunohistoquímic de l'estat mutacional de BRAF en mostres parafinades mitjançant l'anticòs VE1, usant com a control la presència de la mutació demostrada per seqüenciació directa del gen

Per aquest anàlisi es van incloure 64 melanomes (primaris i metastàtics) i 5 nevus de cada subtipus tal i com s'ha explicat a l'apartat 2.2.6.

En el cas dels melanomes, es van considerar com a negatius des del punt de vista molecular els casos negatius per la mutació de *BRAF* i els portadors de la mutació *V600K*.

L'avaluació de l'associació entre la positivitat/negativitat de *V600E* mitjançant PCR i els seus nivells d'expressió per immunohistoquímica es va realitzar amb el test paramètric t-Student i no paramètric test Mann-Whitney.

La determinació d'un punt de tall en l'escala *histoscore* per a discriminar la positivitats/negativitat de V600E es va realitzar mitjançant *ODratios*.

### 2.2.9. Anàlisi estadístic

Per garantir una potència estadística del 80% ( $\beta=0,2$ ) i poder detectar diferències quan aquestes siguin, com a mínim del 58% a l'escala *Histoscore*, utilitzant per a això una prova *t-Student* amb un error de tipus I del 5% ( $\alpha = 0,05$ ), es va utilitzar una mida mostral de 60 nevus comuns i 20 displàsics.

En primer lloc, es va realitzar un estudi d'especificitat i sensibilitat de la detecció immunohistoquímica respecte la mutació BRAF/V600E en seccions histològiques de nevus i melanomes establint com a control el resultat de l'anàlisi mutacional de les mateixes mostres mitjançant seqüenciació genètica directa. Per a això, es van utilitzar els mateixos casos de melanoma seleccionats per al projecte FIS PI12/00260 (2013-2015), on ja s'havia justificat la mida mostral. Per a l'anàlisi de sensibilitat i especificitat es va obtenir la taula de freqüències creuada a partir de la qual es va estimar la proporció de positius per immunohistoquímica en els veritables positius (sensibilitat) i la proporció de negatius en els veritables negatius (especificitat), aportant una estimació dels intervals de confiança.

En segon lloc, es van estudiar les diferències en els nivells d'immunoexpressió observats per als diferents marcadors de senescència segons la presència o absència de la proteïna mutada BRAF/V600E i també segons les característiques clíniques, histològiques i dermatoscòpiques dels nevus melanocítics. Es van realitzar anàlisis estadístics descriptius habituals (mitjana, mediana, desviació estàndard i rang) i es van mesurar les diferències a nivell absolut i a nivell relatiu (*fold-change*). Es va avaluar la significació estadística per dades contínues a partir de la prova paramètrica *t-Student* i la no paramètrica de Mann-Whitney per comparar dues condicions. La prova paramètrica ANOVA i la prova no paramètrica de Kruskal-Wallis, en el cas de comparació de més de dues condicions. Es va avaluar la significació estadística per dades discretes mitjançant taules de contingència les quals van ser analitzades amb la prova d'independència de Pearson ( $\chi^2$ ) o el test exacte de Fisher.

Tots els anàlisis estadístics es van realitzar mitjançant el paquet estadístic R, fixant un nivell de significació del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

### **TREBALL 3: Estudi del fenomen d'autoinvolució**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Selecció de pacients**

La font d'informació comú per als diferents subapartats de l'estudi del fenomen d'autoinvolució van ser els pacients amb síndrome del nevus amb atípia clínica que es trobaven sota seguiment digital amb el sistema de SIAscòpia al Servei de Dermatologia de l'Hospital Arnau de Vilanova de Lleida recollits des d'abril del 2007 fins juliol del 2014.

##### **3.1.2. Mostres de nevus**

**A) Casos.** Es van seleccionar de manera aleatòria 14 nevus adquirits que presentaven signes d'autoinvolució/regressió de pacients que seguien control digital mitjançant SIAscòpia, després d'obtenir el seu consentiment informat.

**B) Controls.** Per tal de poder realitzar un anàlisi comparatiu sobre les característiques immunohistoquímiques de l'infiltrat inflamatori i de les cèl·lules nèviques del casos de l'estudi amb un grup control, es van seleccionar 11 nevus melanocítics escollits de forma aleatòria de l'arxiu d'imatges del Servei de Dermatologia de l'Hospital Arnau de Vilanova.

#### **3.2. Mètodes**

##### **3.2.1. Estudi descriptiu segons imatges de SIAscòpia del fenomen d'autoinvolució en pacients amb síndrome del nevus amb atípia clínica que es troben sota seguiment digital en aquest sistema**

###### **A) Disseny de l'estudi**

Descriptiu transversal.

Es van recollir el número total de pacients registrats en SIAscòpia des d'abril del 2007 fins juliol de 2014. Es van excloure de l'estudi els pacients amb mapes regionals, on només es

representaven una o unes poques àrees anatòmiques i els nevus congènits gegants. Es varen excloure de l'estudi aquells pacients que presentessin un seguiment inferior a 3 anys. Finalment, també es van excloure els abandonaments, excepte els casos amb més de 3 anys de seguiment.

D'aquest total resultant, es van seleccionar tots els nevus que presentessin signes d'autoinvolució/regressió a l'inici o durant el seguiment. Es van excloure aquells nevus en els que el pacient referia un antecedent traumàtic. Es van recopilar tots els siagràfics corresponents de cada nevus.

Totes les lesions que van mostrar indicis suficients d'atípia clínica i/o dermatoscòpica o canvis sospitosos en el seguiment van ser extirpades. No es van extirpar aquelles en què el procés de despigmentació es va realitzar de manera gradual sense augment del diàmetre ni aparició d'estructures noves, fent un seguiment estret dels pacients.

## **B) Recollida de dades**

- I.** Sexe i edat del pacient
- II.** Número total de nevus registrats durant el seguiment
- III.** Dades clíniques recollides de manera protocol·litzada en pacients en seguiment digital amb SIAscòpia: fototipus, color del cabell, color dels ulls, antecedents personals de melanoma, antecedents personals de càncer cutani no melanoma, antecedents familiars de síndrome del nevus amb atípia clínica, antecedents familiars de melanoma, exposició solar a la infància i edat adulta, exposició UV artificial, número de cremades a la infància i edat adulta, ús de fotoprotector a la infància i edat adulta.
- IV.** Número de nevus que presenten signes d'autoinvolució/regressió progressiva
- V.** Localització anatòmica de cada nevus amb signes d'autoinvolució/regressió
- VI.** Data d'inici i final de l'autoinvolució/regressió. El criteri que es va utilitzar per decidir que un nevus amb autoinvolució/regressió parcial ja havia acabat d'autoinvolucionar/regressar va ser que en un període de 6 mesos no s'objectivessin nous canvis.

**VII.** Característiques obtingudes per SIAscòpia de les imatges en color, de la melanina total i de la melanina dèrmica. Es van recollir en una taula les següents dades:

- **Desaparició total o no del nevus**
- **Patró dermatoscòpic estructural predominant.** Es va considerar el patró globular, patró reticular, patró homogeni, patró paral·lel, patró combinat (dels anteriors) i altres.
- **Percentatge de despigmentació.** Es va considerar el percentatge de despigmentació respecte a la imatge inicial, en rangs de 10 (0%, 1-10%, 11-20%, 21-30%, 31-40%, 41-50%, 51-60%, 61-70%, 71-80%, 81-90%, 91-100%).
- **Tipus de despigmentació (homogènia o heterogènia).** Es va considerar com despigmentació homogènia aquella que s'iniciava per la perifèria del nevus. Els nevus que no complien aquesta característica es van classificar com despigmentació heterogènia (95).
- **Presència de fibrosi, punts blau-grisos, halo i/o estructures vasculares.** Es va registrar si a l'inici o durant el seguiment es va apreciar despigmentació blanca tipus cicatriu (fibrosi), punts blau-grisos (melanofàgia), la presència d'halo clínic i/o dermatoscòpic i l'aparició d'estructures vasculares (proliferació vascular).
- **Disminució de la melanina total i disminució de la melanina dèrmica.** Es va registrar si durant el seguiment es va apreciar disminució quantitativa de la melanina total i dèrmica.
- **Canvi de color de la melanina dèrmica.** La melanina que s'observa en el siagràfic de la melanina dèrmica presentarà un color o un altre en funció de la seva profunditat en aquest ordre de superficial a profunda: verd clar, blau clar, blau fosc, lila i vermell. Es va registrar si durant el seguiment es van apreciar canvis en el color d'aquesta i quin era aquest canvi.

### **3.2.2. Estudi descriptiu de les característiques dermatoscòpiques, estudi histopatològic i immunohistoquímic dels nevus en autoinvolució**

#### **A) Disseny de l'estudi**



Descriptiu prospectiu. Es varen seleccionar un total de 14 casos i 11 controls (veure apartat 3.1.2).

### **B) Descripció de les característiques dermatoscòpiques**

Es recull en una taula:

- I. Patró estructural majoritari del nevus (reticular, globular, homogeni, combinat, altres)
- II. Tipus i percentatge de despigmentació (comentat a l'apartat 3. 2. 1. B, VII)
- III. Característiques dermatoscòpiques de regressió/autoinvolució (comentades a l'apartat 3.2.1. B, VII)

### **C) Descripció de les característiques histològiques**

Es descriuen els fenòmens histològics observats en tincions convencionals d'hematoxilina-eosina. Es recullen les dades següents:

- I. **Subtipus histològic del nevus** (juntural, compost, intradèrmic o displàsic)
- II. **Quantitat de nevus present.** Es va utilitzar la tinció amb melan-A per fer la valoració i es va quantificar mitjançant una escala gradual de 0 a 3 (0: gens/1:poc/2:moderat/3:molt).
- III. **Infiltrat inflamatori**
  - Quantitat\*
  - Distribució (parxejat, focal, continu)
- IV. **Melanofàgia**
  - Quantitat\*
  - Distribució (parxejada, focal, continua)
- V. **Fibrosi**
  - Quantitat\*
  - Tipus (laminar, delicada, compacta)(96)
  - Presència d'accentuació subepidèrmica: sí/no
- VI. **Augment de vasos**
- VII. **Apoptosi de cèl·lules tumorals**
- VIII. **Atròfia epidèrmica**

\*En relació a la quantitat d'infiltrat inflamatori, melanofàgia i fibrosi es va valorar en una escala gradual tenint en compte el percentatge que ocupava el paràmetre en qüestió en relació al total de l'àrea de la següent manera:

- **0** = absent
- **0.5** = molt lleu
- **1** = lleu
- **1.5** = moderat
- **2** = intens
- **3** = molt intens

#### **D) Preparació de les mostres de nevus melanocítics**

L'estudi immunohistoquímic dels nevus es va realitzar fent tincions de les seccions completes.

#### **E) Estudi immunohistoquímic de CD3, CD4, CD8, FoxP3, PD1, Granzima B, TIA-1 i CD123, Casp3A i VE1 (BRAF/V600E).**

Les immunotincions d'aquests marcadors es van realitzar seguint les mateixes directrius que en l'estudi de biomarcadors de senescència, BRAF/V600E i canals de calci (apartat 2.5). La immunotinció de Casp3A i VE1 (BRAF/V600E) es va avaluar mitjançant *histoscore*, també definit a l'apartat 2.5 de l'anterior estudi. La valoració de la tinció dels antígens T (CD3, CD4 i CD8), FoxP3, PD1, Granzima B, TIA i CD123 no es va realitzar mitjançant un *histoscore*, sinó considerant únicament el percentatge de tinció respecte al total d'infiltrat inflamatori (però no la seva intensitat).

#### **F) Correlacions entre algunes variables escollides**

- I. Diferències en les característiques histològiques (intensitat infiltrat, melanofàgia i fibrosi, tipus fibrosi, accentuació subepidèrmica, atròfia epidèrmica i augment de vasos) entre els casos i els controls.

- 
- II. Diferències d'immunoexpressió dels diferents biomarcadors (CD3, CD4, CD8, TIA1, FoxP3, CD123, PD1, granzima B) entre casos i controls.
    - Diferències en la *ratio* CD123/TIA-1 entre els casos i controls.
  - III. Correlació entre la immunoexpressió de la caspasa-3 activada i:
    - La intensitat de l'infiltrat inflamatori en els casos i els controls.
    - CD3, CD4, CD8, TIA1, FoxP3, CD123, PD1, granzima B en els casos i els controls.

### G) Anàlisi estadístic

Es van realitzar anàlisis estadístics descriptius habituals (desviació estàndard o la freqüència absoluta i percentatge, segons el més convenient) de les dades discretes i contínues. Es van avaluar les diferències en les característiques histològiques entre els casos i els controls mitjançant la prova no paramètrica de Mann-Whitney per dades contínues i el test exacte de Fisher per a dades discretes. Les diferències d'immunoexpressió dels diferents biomarcadors entre casos i controls es van avaluar mitjançant la prova no paramètrica de Mann-Whitney. Les correlacions entre la immunoexpressió de la caspasa-3 activada i la intensitat de l'infiltrat inflamatori; els biomarcadors o el *ratio* CD123/TIA-1 en els casos i els controls es van realitzar calculant els coeficients de correlació de Pearson.

Tots els anàlisis estadístics es van realitzar mitjançant el paquet estadístic R, fixant un nivell de significació del 5% (alfa = 0,05).

# Resultats



**TREBALL 1: Epidemiologia dels nevus a la infància a la Regió Sanitària de Lleida**

Durant l'estudi, van ser examinats 369 nens entre abril de 2007 i setembre del 2008. Les característiques demogràfiques i clíniques de la població d'estudi es recullen a la **taula 2**.

**Taula 2. Característiques clíniques i demogràfiques de la població a estudi (N=369)**

Variable		4 anys	8 anys	14 anys
n		182	125	62
Raça caucàsica		170 (93,4%)	116 (92,8%)	61 (96,8%)
Sexe	Home	97 (53,3%)	59 (47,2%)	32 (50,8%)
	Dona	85 (46,7%)	66 (52,8%)	30 (49,2%)
Nevus*	Total	1(3) [0-17]	5(7) [0-40]	10(20) [0-84]
	≥5mm	0(0) [0-2]	0(0) [0-3]	0(0) [0-8]
	Atípics	0(0) [0-4]	0(0) [0-1]	0(0) [0-1]
Color ulls	Clar	34 (18,7%)	21 (16,8%)	15 (23,8%)
	Fosc	148 (81,3%)	104 (83,2%)	48 (76,2%)
Color cabell	Clar o pèl-roig	93 (51,1%)	51 (40,8%)	22 (34,9%)
	Fosc	89 (48,9%)	74 (59,2%)	41 (65,1%)
Fototipus	I-II	22 (12,1%)	17 (13,6%)	15 (23,8%)
	III-IV	160 (87,9%)	108 (86,4%)	47 (76,2%)
Exposició solar	Acumulades (al llarg de la vida) (hores)*	1344 (982) [48-5232]	3192 (2068) [686- 10098]	5530 (3796) [946- 18340]
	Percentatge d'hores a platges /piscines*	19,1 (21) [0-100]	24,3 (19) [0-65,6]	24,5 (20,6) [2,9-54,8]
	Anual [mitjana hores/anuals (DE)]	387,6(223,4)	450,8(217,8)	456,5(242,4)
	Ús de fotoprotector	Cada 2 hores	119 (65,4%)	69 (55,2%)
Número cremades (freqüència, %)	FPS ≥15	155 (85,2%)	102 (81,6%)	55 (87,3%)
	Cada 2h and FPS≥15	106 (58,2%)	60 (48%)	24 (38,7%)
	Lleu-moderada (dolorosa)	7 (3,8%)	8 (6,4%)	22 (33,9%)
	Severa (butllofes)	2 (1,1%)	0 (0%)	2 (3,2%)

Es mostren freqüència absoluta i percentatge o mitjana, mediana i rang segons el més convenient. FPS: factor de protecció solar; DE: desviació estàndard

A continuació es descriuen els resultats relacionats amb la caracterització de la nostra població pediàtrica en termes de prevalença de nevus, hàbits d'exposició solar i factors constitucionals.

### 1.1. Recompte total de nevus i distribució regional dels nevus

La mitjana del número de nevus per a tots els grups va ser de 6 (rang 0-84). La distribució per edat, número de nevus grans i nevus atípics es mostren a la Taula I. En resum, el número de nevus atípics i nevus >5mm va ser baix per als 3 grups d'edat, amb una mitjana inferior a 1 en totes les cohorts.

La distribució regional dels nevus va ser la següent: 106 nens tenien nevus al cap, 241 al tronc, 27 a la zona del banyador, 108 als braços, 10 a les mans, 117 a les cames i 14 als peus (Taula 3).

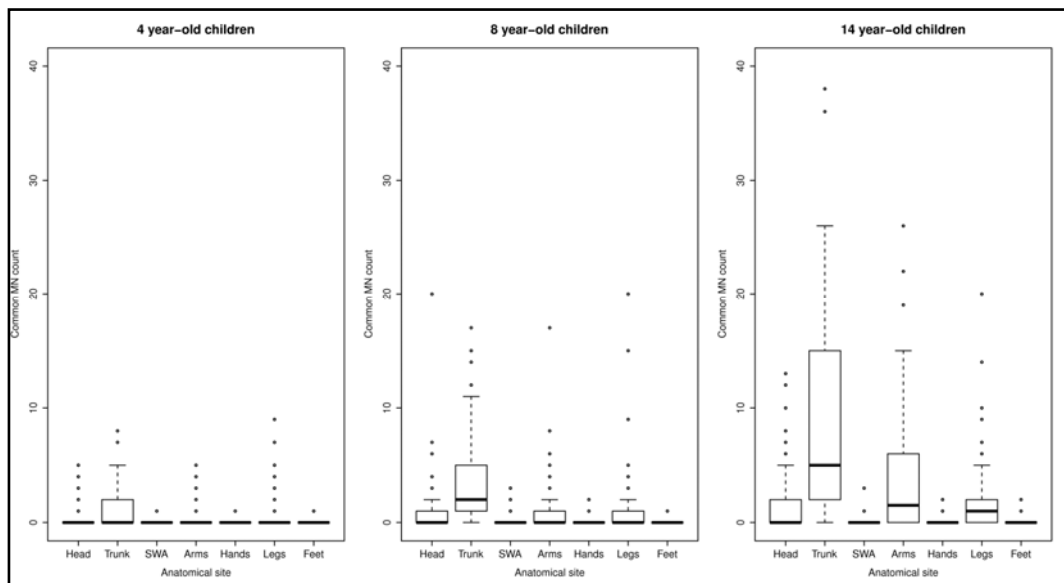
Taula 3. Presència de nevus en cada àrea anatòmica estratificat per edat

Àrea anatòmica	Edat	Presència de nevus	Diferències
Cap	4	31(17,0%)	Test X <sup>2</sup> p=0,000005: OR (8 vs. 4) = 3,0, 95% IC=[1,73, 5,35] OR (14 vs. 8) = 1,2, 95% IC=[0,63, 2,40]
	8	48(38,4%)	
	14	27(43,5%)	
Tronc	4	80(44,0%)	Test X <sup>2</sup> p<0,000001: OR (8 vs. 4) = 6,7, 95% IC=[3,72, 12,35] OR (14 vs. 8) = 1,8, 95% IC=[0,64, 5,71]
	8	105(84,0%)	
	14	56(90,3%)	
Àrea del banyador	4	11(6,0%)	Test de Fisher p=0,108
	8	14(11,2%)	
	14	2(3,2%)	
Braços	4	35(19,2%)	Test X <sup>2</sup> p<0,000001: OR (8 vs. 4) = 2,6, 95% IC=[1,51, 4,54] OR (14 vs. 8) = 2,1, 95% IC=[1,07, 4,05]
	8	48(38,4%)	
	14	35(56,4%)	
Mans	4	1(0,5%)	Test de Fisher p=0,021129: OR (8 vs. 4) = 9,1, 95% IC=[1,08, 421,15] OR (14 vs. 8) = 1,0, 95% IC=[0,16, 4,92]
	8	6(4,8%)	
	14	3(4,8%)	
Cames	4	40(22,0%)	Test X <sup>2</sup> p=0,000001: OR (8 vs. 4) = 1,7, 95% IC=[1,00, 2,99] OR (14 vs. 8) = 2,8, 95% IC=[1,44, 5,58]
	8	41(32,8%)	
	14	36(58,1%)	
Peus	4	5(2,7%)	Test de Fisher p=0,504
	8	6(4,8%)	
	14	3(4,8%)	

Es mostren la freqüència absoluta i percentatge. OR: *odds ratio*; IC del 95%: interval de confiança del 95%

Quan es va analitzar la densitat de nevus (número de nevus/àrea anatòmica) dins de cada grup d'edat, es van observar diferències significatives en la distribució dels nevus entre les

diferents àrees, és a dir, trobàvem almenys una zona amb una densitat de nevus estadísticament diferent de les altres. El tronc va ser l'àrea anatòmica on els nevus eren més comuns i també va ser la regió que va mostrar un augment més ràpid en el número de nevus amb l'edat (**figura 19**).



**Figura 19. Comparació entre el número de nevus/àrea anatòmica dins de cada grup d'edat (4, 8 i 14 anys d'edat).** Es mostra la distribució de la mediana i rang interquartil del número de nevus en cada grup d'edat d'acord a l'àrea anatòmica. SWA: *swimwear area* (àrea del banyador).

Quan es va analitzar la densitat de nevus (número de nevus/àrea anatòmica) dins de cada àrea, a la recerca de diferències entre els diferents grups d'edat, es van trobar diferències significatives en el cap, el tronc, els braços i les cames, observant-se un creixent número de nevus amb l'edat (**Taula 4**).

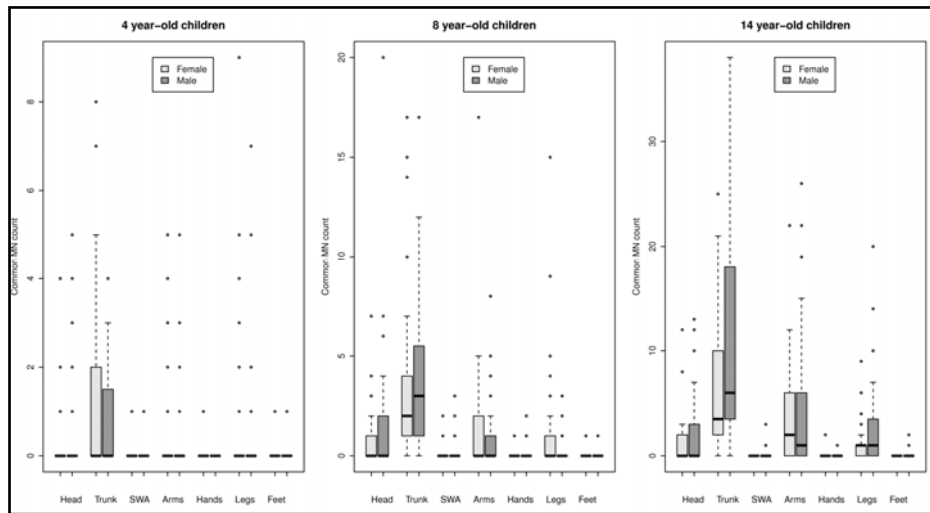


**Taula 4. Densitat de nevus melanocítics per àrea anatòmica i edat en la mostra de nens de 4, 8 i 14 anys d'edat.**

Àrea anatòmica	Edat	Mitjana de nevus/area anatòmica (DE)	Mediana nevus /area anatòmica (RIQ) [min-max]	Diferències
Cap	4	0,3 (0,8)	0 (0-0) [0-5]	<b>p=0,0000005</b>
	8	1,08 (2,32)	0 (0-1) [0-20]	
	14	1,87 (3,31)	0 (0-2) [0-13]	
Tronc	4	0,38 (0,99)	0 (0-2) [0-8]	<b>p&lt;0,0000001</b>
	8	3,6 (3,6)	2 (0-5) [0-17]	
	14	8,92 (8,98)	5 (2,25-14,75) [0-38]	
Àrea del banyador	4	0,06 (0,24)	0 (0-0) [0-1]	p=0,08679
	8	0,17 (0,53)	0 (0-0) [0-3]	
	14	0,06 (0,40)	0 (0-0) [0-3]	
Braços	4	0,38 (0,99)	0 (0-0) [0-5]	<b>p&lt;0,0000001</b>
	8	0,97 (2,02)	0 (0-1) [0-17]	
	14	4,05 (6,04)	1,5 (0-5,75) [0-26]	
Mans	4	0,01 (0,07)	0 (0-0) [0-1]	<b>p=0,05487</b>
	8	0,06 (0,26)	0 (0-0) [0-2]	
	14	0,05 (0,28)	0 (0-0) [0-2]	
Cames	4	0,43 (1,18)	0 (0-0) [0-9]	<b>p=0,0000001</b>
	8	0,87 (2,47)	0 (0-1) [0-20]	
	14	2,10 (3,63)	1 (0-2) [0-20]	
Peus	4	0,03 (0,16)	0 (0-0) [0-1]	p=0,6298
	8	0,05 (0,21)	0 (0-0) [0-1]	
	14	0,05 (0,28)	0 (0-0) [0-2]	

DE: desviació estàndard; RIQ: rang interquartil.

La **figura 20** i la **Taula 5** mostren la mediana i la mitjana del recompte de nevus per cada àrea anatòmica estratificat per edat i sexe. L'anàlisi estadístic va mostrar diferències significatives en la distribució dels nevus només en el grup de nenes de 8 anys d'edat on hi havia un major número de nevus a les cames.



**Figura 20.** Distribució de nevus melanocítics (MN) segons la densitat per àrea anatòmica, l'edat i el sexe en una mostra de nens de 4, 8 i 14 anys d'edat. Es mostren la mediana i rang interquartil dels nevus per a cada àrea anatòmica, estratificada per edat i sexe. SWA: *swimwear area* (àrea del banyador).

**Taula 5.** Densitat de nevus melanocítics per àrea anatòmica, edat i sexe en la mostra de nens de 4, 8 i 14 anys d'edat. DE: desviació estàndard; RIQ: rang interquartil.

Àrea anatòmica	Edat	Sexe				Valor p
		Nens		Nenes		
		Mediana (RIQ) [min-max]	Mitjana (DE)	Mediana (RIQ) [min-max]	Mitjana (DE)	
Cap	4	0,0 (0-0) [0-5]	0,3 (0,8)	0,0 (0-0) [0-4]	0,3 (0,8)	0,55
	8	0,0 (0-2) [0-20]	1,5 (3)	0,0 (0-1) [0-7]	0,7 (1,3)	0,17
	14	0,0 (0-2,3) [0-12]	2 (3,3)	0,0 (0-1,8) [0-13]	1,7 (3,4)	0,71
Tronc	4	0,0 (0-1,3) [0-4]	0,8 (1,1)	0,0 (0-2) [0-8]	1,1 (1,7)	0,81
	8	3 (1-5,5) [0-17]	3,8 (3,7)	2 (1-4) [0-17]	3,3 (3,5)	0,41
	14	6 (3-18,3) [0-38]	11,1 (10,2)	4 (2-9,8) [0-26]	6,6 (6,9)	0,063
Àrea del banyador	4	0,0 (0-0) [0-1]	0,1 (0,2)	0,0 (0-0) [0-1]	0,1 (0,2)	0,93
	8	0,0 (0-0) [0-3]	0,2 (0,7)	0,0 (0-0) [0-2]	0,1 (0,4)	0,19
	14	0,0 (0-0) [0-3]	0,1 (0,6)	0,0 (0-0) [0-0]	0 (0)	0,17
Braços	4	0,0 (0-0) [0-5]	0,4 (1)	0,0 (0-0) [0-5]	0,4 (1)	0,21
	8	0,0 (0-1) [0-8]	0,8 (1,6)	0,0 (0-2) [0-17]	1 (2,3)	0,33
	14	2,5 (0-5,5) [0-22]	4,7 (6,5)	1 (0-6) [0-26]	3,7 (5,7)	0,59
Mans	4	0,0 (0-0) [0-4]	0 (0)	0,0 (0-0) [0-1]	0 (0,1)	0,29
	8	0,0 (0-0) [0-2]	0,1 (0,2)	0,0 (0-0) [0-1]	0 (0,3)	0,34
	14	0,0 (0-0) [0-1]	0,1 (0,2)	0,0 (0-0) [0-2]	0,1 (0,4)	0,64
Cames	4	0,0 (0-0) [0-7]	0,4 (1,1)	0,0 (0-0) [0-9]	0,5 (1,3)	0,41
	8	0,0 (0-0) [0-3]	0,3 (0,7)	0,0 (0-1) [0-15]	1,1 (2,3)	<b>0,023</b>
	14	0,0 (0-1) [0-14]	1,6 (3)	1 (0-3) [0-20]	2,6 (4,2)	0,083
Peus	4	0,0 (0-0) [0-1]	0 (0,1)	0,0 (0-0) [0-1]	0 (0,2)	0,55
	8	0,0 (0-0) [0-1]	0,1 (0,3)	0,0 (0-0) [0-1]	0 (0,2)	0,34
	14	0,0 (0-0) [0-1]	0,1 (0,2)	0,0 (0-0) [0-2]	0,1 (0,4)	0,64

## 1.2. L'ús de fotoprotector i l'exposició solar

En relació als protectors solars i considerant els dos grups (sense tenir en compte el factor de protecció solar (FPS) i si es torna a aplicar cada 2 hores) o bé, especificat com "l'ús de protector solar amb SPF $\geq$ 15 i reaplicat cada 2h") es va observar una tendència decreixent de l'ús de la protecció solar amb l'edat. Es van trobar diferències significatives en l'ús de protecció solar a l'aire lliure i a platges i piscines entre els diferents grups d'edat (**taula 6**).

**Taula 6. Ús de protector solar estratificat per edat en la mostra de nens de 4, 8 i 14 anys d'edat**

Ús de fotoprotector	Edat			Diferències
	4 anys	8 anys	14 anys	
Sempre/quasi sempre	37 (20,3%)	13 (10,4%)	4(6,5%)	Test $\chi^2$ p=0,007289: OR (8 vs. 4) = 0,46, 95% IC=[0,21, 0,93] OR (14 vs. 8) = 0,60, 95% IC=[0,14, 2,04]
Sempre/quasi sempre platges/piscines	146 (80,2%)	100 (80,0%)	37 (59,7%)	Test $\chi^2$ p=0,002389: OR (8 vs. 4) = 0,99, 95% IC=[0,54, 1,83] OR (14 vs. 8) = 0,37, 95% IC=[0,18, 0,77]
Sempre/quasi sempre FPS>15 i cada 2 hores	28 (15,4%)	4 (3,2%)	1 (1,6%)	Test $\chi^2$ p=0,000100: OR (8 vs. 4) = 0,18, 95% IC=[0,05, 0,54] OR (14 vs. 8) = 0,50, 95% IC=[0,01, 5,17]
Sempre/quasi sempre FPS>15 i cada 2 hores platges/piscines	94 (51,6%)	53 (42,4%)	21 (33,9%)	Test $\chi^2$ p=0,036166: OR (8 vs. 4) = 0,69, 95% IC=[0,42, 1,12] OR (14 vs. 8) = 0,70, 95% IC = [0,35, 1,37] OR (14 vs. 4) = 0,48, 95% IC= [0,25, 0,91]

FPS: factor de protecció solar; OR: *odds ratio*; 95% IC: 95% interval de confiança

L'exposició solar total (al llarg de la vida) i la mitjana d'hores anuals del total d'exposició solar es mostren a la **Taula 2**. El percentatge de l'exposició solar total a platges/piscines era el 19,1% als 4 anys d'edat del grup, el 24,3% en el grup de 8 anys d'edat, i el 24,5% en el grup de 14 anys d'edat.

## 1.3. Recompte de nevus en relació amb el fototipus i les cremades solars

L'anàlisi bivariant va mostrar diferències estadísticament significatives en el recompte total de nevus entre els fototipus clars (I-II) i foscos (III-IV) en els nens de 4 i 14 anys d'edat ( $p < 0,05$ ), amb un major número de nevus en fototipus clars (**taula 7**). Tenint en compte la mida dels nevus, la distribució dels nevus petits (2-4,9mm) va presentar les mateixes

diferències significatives que les observades en el grup global ( $p < 0,05$ ). Aquesta troballa pot explicar-se per l'escàs número de nevus grans observats a la mostra.

**Taula 7. Número total de nevus melanocítics comuns segons els fototipus**

N	4 anys		8 anys		14 anys	
	III-IV	I-II	III-IV	I-II	III-IV	I-II
Mitjana	160,000000	21,000000	107,000000	17,000000	48,000000	14,000000
Desv.Std.	1,975000	3,476190	6,616822	7,941176	13,89583	29,000000
Mín	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000	3,000000
Mediana	1,000000	3,000000	4,000000	6,000000	7,000000	19,000000
Màx	17,000000	12,000000	36,000000	40,000000	84,000000	64,000000
Wilcoxon test	Valor $p=0,0485$		Valor $p=0,4419$		Valor $p=0,0030$	

El número de cremades pel sol i la distribució entre cremades solars lleu-moderades (eritema) i cremades greus (butllofes) es mostren a la Taula I. Tot i que no es va observar una correlació significativa entre haver patit cremades solars i el número de nevus (excepte en el grup de 14 anys d'edat), es va veure una tendència a un augment del recompte de nevus en relació amb el número de cremades solars en tots els grups d'edat (**taula 8**).

**Taula 8. Número de nevus comuns segons si ha patit cremades, amb o sense butllofes**

N	4 anys		8 anys		14 anys	
	No	Sí	No	Sí	No	Sí
N	174,000000	7,000000	116,000000	8,000000	41,000000	21,000000
Mitjana	2,109195	3,142857	6,879310	5,625000	15,21951	21,38095
Desv.Std.	3,007625	4,845223	7,685283	3,248626	19,08993	16,49387
Mín	0,000000	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000	2,000000
Mediana	1,000000	1,000000	4,500000	6,000000	7,000000	16,000000
Màx	17,000000	12,000000	40,000000	11,000000	84,000000	64,000000
Wilcoxon Rank sum test	Valor $p = 0,9817$		Valor $p = 0,7790$		Valor $p = 0,0297$	

#### 1.4. L'anàlisi multivariant

Amb l'objectiu d'explicar la relació entre el número de nevus i la resta de les variables, i degut a que les dades van mostrar un excés de dispersió, es va aplicar un model de regressió basat en la distribució binomial negativa. Les variables independents van ser: sexe (masculí), fototipus clar (I-II), el número total d'hores d'exposició solar, el número d'hores a la platja/piscina i el número d'hores a l'aire lliure, la història de cremades solars, l'ús comú de protecció solar i l'ús correcte de protecció solar (**Taules 9 i Taula 10**).

**Grup de quatre anys d'edat.** L'única variable associada amb el número de nevus va ser el total d'hores d'exposició solar. No obstant això, aquesta associació es va relacionar únicament amb el número d'hores a l'aire lliure i no amb l'exposició solar a les platges i piscines. Per tant, un major número d'hores a l'aire lliure (exceptuant el temps a platges/piscines) es va associar amb un major número de nevus en el grup de 4 anys d'edat.

**Grup de vuit anys d'edat.** L'única variable associada amb el número de nevus va ser el total d'hores d'exposició solar. No obstant això, aquesta associació es va relacionar únicament amb el número d'hores a platges i piscines, i no a l'exposició al sol a l'aire lliure. Per tant, un major número d'hores acumulades a platges i piscines es va associar amb un major número de nevus en el grup de 8 anys d'edat.

**Grup de catorze anys d'edat.** El total d'hores acumulades d'exposició solar, el fototipus de pell clar (I-II) i el sexe (masculí) són les variables que expliquen una part significativa de la variabilitat observada en el número de nevus en els nens de 14 anys d'edat. Un cop més, l'associació del número de nevus amb l'exposició solar era només pel número d'hores acumulades a platges i piscines, i no a l'exposició al sol a l'aire lliure, com en el grup de 8 anys d'edat.

En el grup de 14 anys, pel que fa a les variables restants, l'associació estadísticament significativa observada en l'anàlisi bivariant entre l'ús de protector solar amb el número de nevus, desapareix quan l'ús de protector es va ajustar per altres variables en l'anàlisi multivariant. De fet, el número d'hores acumulades d'exposició solar a platges/piscines té una associació significativa amb el número de nevus, depenent de l'ús correcte del protector solar, el que significa que hi ha una interacció significativa. Els resultats estratificats segons l'ús de protector solar ajustat per sexe i fototipus (I-II vs III-IV) van mostrar que l'exposició solar a platges/piscines s'associava a major número de nevus melanocítics només en els nens que havien fet una protecció solar no adequada (**Taula 10**).

**Taula 9. Anàlisi multivariant dels factors associats a nevus melanocítics en la mostra de nens de 4, 8 i 14 anys d'edat**

Variable	GLM negatiu binomial per cada grup d'edat		
	4 anys	8 anys	14 anys
Sexe masculí	0,212	0,149	<b>0,003</b>
Fototipus I-II vs III-IV	0,097	0,573	<b>&lt;0,001</b>
Exposició solar acumulada a l'aire lliure	<b>0,019</b>	0,472	0,834
Exposició solar acumulada a platges/piscines ("A")	0,673	<b>0,011</b>	<b>0,001</b>
Ús de fotoprotecció* a platges/piscines ("B")	0,924	0,568	<b>0,005</b>
Interacció de "A" i "B"	0,476	0,210	<b>0,027</b>

L'ús de protecció solar es defineix com: ús de FPS > 15 i tornar a aplicar cada 2h. Valors  $p$  ajustats per al model de regressió multivariant en el recompte dels nevus melanocítics en cada grup d'edat. Les cremades solars no van mostrar una contribució significativa a cap dels models i per tant no es van incloure. Els valors significatius ( $p < 0,05$ ) es mostren en negreta i remarcats. MLG: models lineals generalitzats. Diferències estadísticament significatives, representades pel valor  $p$

**Taula 10. Mesures d'associació significatives multivariants (després de comprovar l'efecte de confusió)**

Variable	GLM negatiu binomial per cada grup d'edat			
	4 ANYS	8 ANYS	14 ANYS	
			DESPROTEGITS	PROTEGITS
Sexe masculí	-	-	1,79 [1,06, 3,01]	2,55 [1,11, 6,11]
Fototipus I-II vs III-IV	-	-	2,32 [1,31,4,30]	2,93 [1,14, 8,61]
Exposició solar acumulada a l'aire lliure	1,0005 [1,0002,1,0008]	-	-	-
Exposició solar acumulada a platges/piscines	-	1,0004 [1,0002,1,0006]	1,0004 [1,0002,1,0005]	1,0000 [0,9996, 1,0003]

Es mostren l'exponencial dels coeficients i els intervals de confiança del 95% (IC) dels mateixos models presentats a la Taula 9 un cop simplificats eliminant les variables sense contribució estadísticament significativa, és a dir, els factors de confusió (no hi ha canvis en els coeficients de les altres variables explicatives del model de >20% en cas que aquestes desapareguin). Com es mostra, totes les associacions estadísticament significatives amb factors constitucionals són positives, el que significa que el nombre de nevus s'incrementa en qualsevol d'aquestes característiques. MLG: models lineals generalitzats.

## TREBALL 2: Immunoexpressió diferencial de marcadors de senescència, gens supressors de tumors, BRAF/V600E i canals de calci de tipus T en nevus adquirits d'acord amb la seva classificació histopatològica i dermatoscòpica

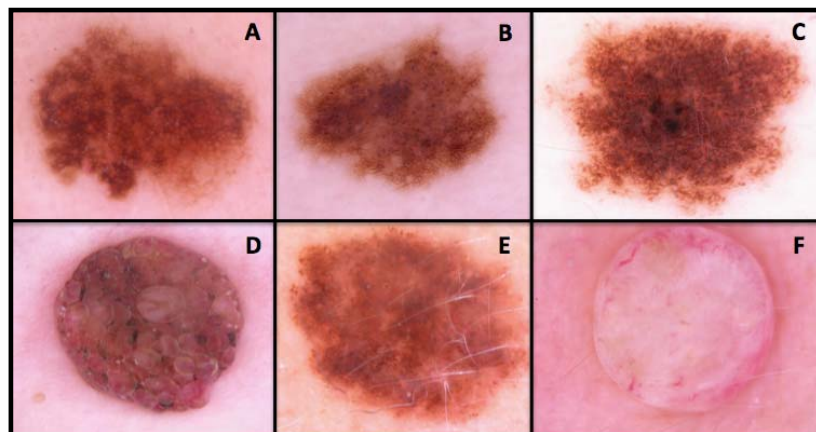
### 2.1. Característiques clíniques dels pacients i els nevus

L'edat mitja dels pacients va ser de 42,8 anys amb una desviació estàndard de 16,9; la mediana d'edat va ser de 39,5 anys (rang 9-90). El 73,7% varen ser dones i el 26,3% homes. El 15% del nevus es varen localitzar a cap i coll, el 5% al tòrax, el 15% a l'abdomen, el 33,75% a la part alta de l'esquena, el 8,75% a la part baixa de l'esquena, el 3,75% a les extremitats superiors i el 18,75% a les extremitats inferiors. Segons aquestes localitzacions, el 15% estaven situats a zones de fotoexposició crònica i el 85% a àrees de fotoexposició intermitent. L'àrea mitja de les lesions va ser de 33,1mm amb una desviació estàndard de 21,26 (Taula 14, 15 i 16).

### 2.2. Característiques dermatoscòpiques del nevus

#### 2.2.1. Patró global segons l'anàlisi de patrons

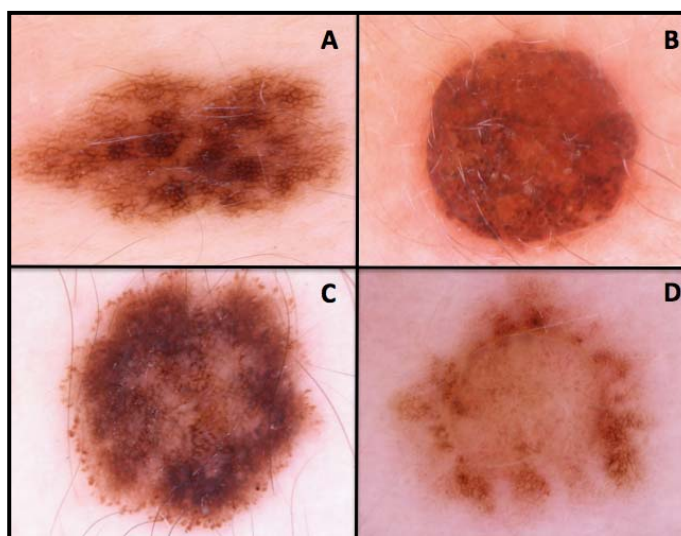
El 31,25% dels nevus presentava un patró reticular, el 21,25% un patró globular/en empedrat, el 7,5% un patró inespecífic, el 21,5% un patró mixt retículo-globular o reticular-en empedrat (R-G/R-E) i el 18,75% un patró multicomponent. No es va identificar cap nevus amb patró homogeni ni amb patró d'esclat d'estrelles (Taula 15 i figura 21).



**Figura 21. Patrons dermatoscòpics globals. A)** Reticular. **B)** Retículo-globular. **C)** Globular. **D)** En empedrat. **E)** Multicomponent. **E)** Inespecífic.

### 2.2.2. Patró dermatoscòpic segons la classificació de I. Zalaudek

El 32,9% dels nevus mostrava un patró reticular, el 30,4% un patró globular/en empedrat, el 29,1% un patró globular o àrea marró sense estructura central i reticle perifèric (GC/RP) i el 7,6% un reticle o àrea marró sense estructura central i glòbuls perifèrics (RC/GP). En 1 cas va ser impossible determinar el patró, pel que es va excloure. Les dades relacionades amb els nevus segons la classificació de I. Zalaudek varen incloure doncs, 79 lesions, en comptes de 80 (Taula 16 i figura 22).



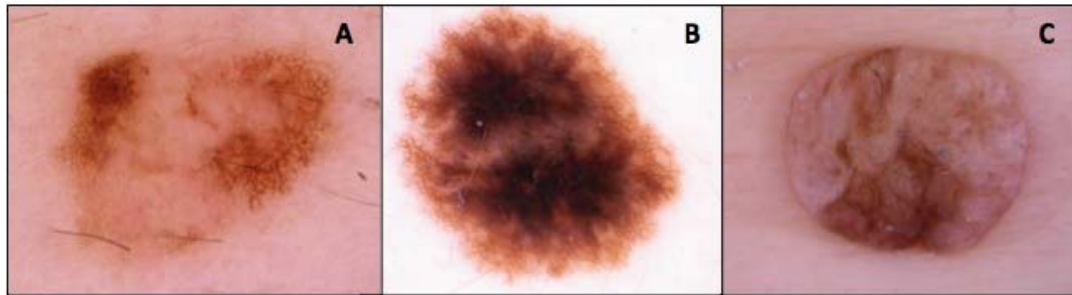
**Figura 22. Patrons dermatoscòpics segons I. Zalaudek. A)** Reticular. **B)** Globular/empedrat. **C)** Reticle o àrea marró sense estructura central i glòbuls perifèrics (RC/GP). **D)** Patró globular o àrea marró sense estructura central i reticle perifèric (GC/RP).

### 2.2.3. Característiques locals dermatoscòpiques

En un 25% dels casos es va observar reticle típic, en un 46,25% reticle atípic i el 28,75% dels casos no mostrava reticle. En un 53,75% dels nevus s'identificaven glòbuls regulars, en un 20% irregulars i en el 26,25% aquests estaven absents. La majoria de les lesions (95%) no presentaven taques de pigment, en el 2,5% de les lesions es varen observar taques de pigment simètriques, en un 2,5% asimètriques. En la majoria dels nevus (98,75%) no es varen identificar projeccions radials. El percentatge de nevus amb projeccions radials irregulars va ser del 1,25% (1 cas); no es varen observar projeccions radials regulars. Es varen identificar vasos en coma en el 35% dels nevus, puntiformes en el 3,75%, lineals irregulars en el 11,25% i vasos i/o eritema a l'interior d'estructures de regressió en el 8,75% del nevus; en



cap de les lesions es varen observar vasos en forquilla o en llevataps. El 15% dels nevus mostraven vel blau-gris, el 5% despigmentació i el 27,5% estructures de regressió (àrees blanques i/o àrees blaves). En un 8,75% de les lesions es varen observar àrees hipopigmentades sense estructura o homogènies. Finalment, el 17,5% de les lesions mostraven traces de pigment marró-gris (**Taules 18, 19, 20 i 21 i figura 23**).

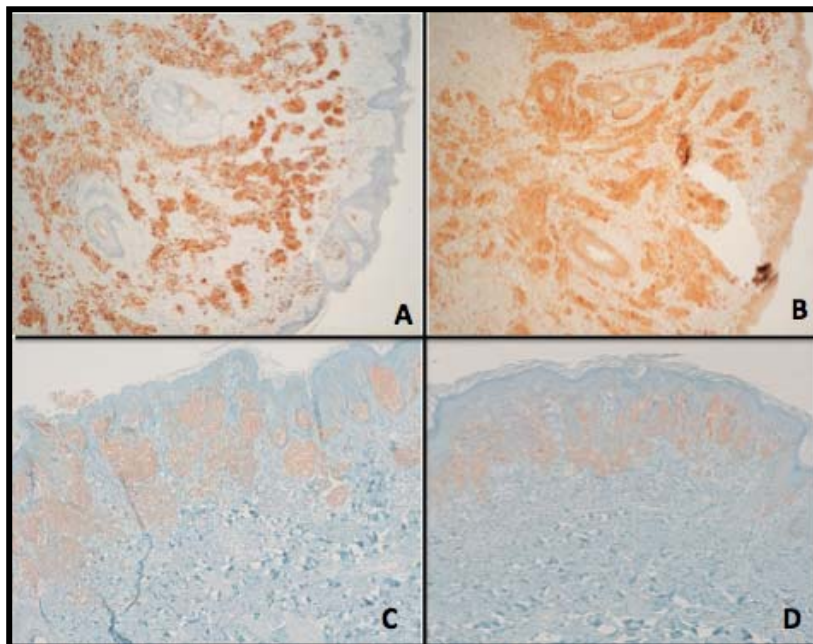


**Figura 23. Característiques dermatoscòpiques locals. A) Àrees de despigmentació. B) Àrees d'hipopigmentació. C) Traces de pigment marró-gris.**

**2.3. Resultats de l'estudi immunohistoquímic**

La mitjana dels *histoscores* i la seva desviació estàndard calculada per cadascun dels marcadors estudiats va ser la següent: Ki67: 10,42 (10,75), Ciclina D1 97,2 (49,52), p16 116,25 (75,48), PTEN 169,25 (62,64), pRB 7,56 (19,29), p53 4,12 (10,15), hTERT 188,75 (21,08),

BRAF/V600E  
(VE1) 72  
17,75  
108,5  
**30, 31, 32**



BRAF/V600E  
(64,75), Cav3.1  
(25,61), Cav3.2  
(46,83) (**Taules  
i 33 i figura 24**).

**Figura 24. Exemples de les tincions immunohistoquímiques en els nevus. A)** p16 en nevus intradèrmic. **B)** PTEN en nevus intradèrmic. **C)** BRAF (VE1) en nevus compost. **D)** BRAF (VE1) en nevus juntural.

## 2.4. Estat mutacional de *BRAF* en la sèrie de nevus i melanomes per seqüenciació directa del gen mitjançant Sanger i/o Cobas

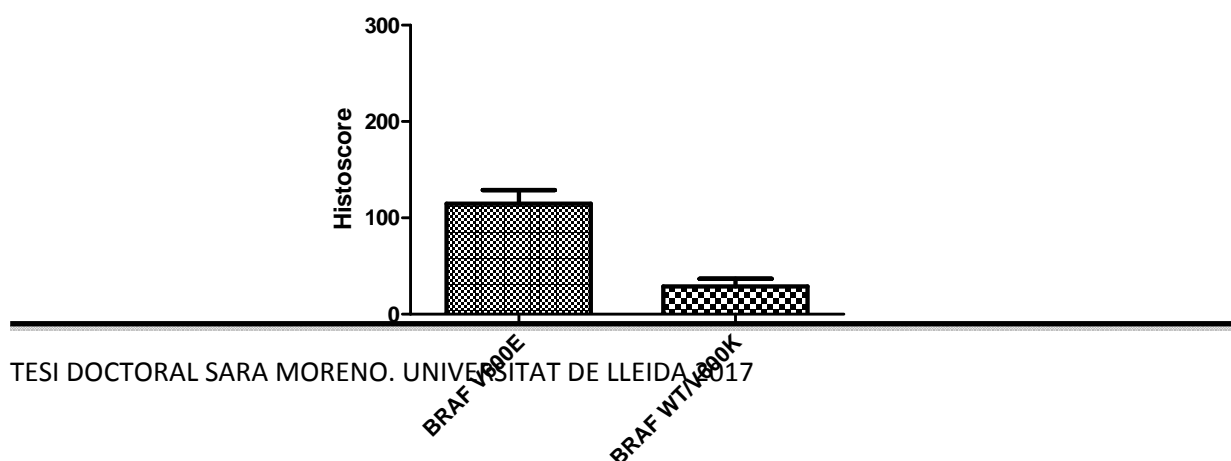
Es va detectar la mutació de *BRAF* en 22 de les 64 mostres de melanoma (34,4%), en 19 la mutació *V600E* (29,7%) i, en 3, la *V600K* (4,7%); les restants 41 mostres varen ser negatives. En quant als nevus melanocítics, 11 dels 20 casos estudiats (55%) presentaven mutació de *BRAF*, tots únicament la mutació *V600E* i cap la *V600K*.

### 2.4.1. Associació entre la positivit/negativitat de *V600E* per seqüenciació i els seus nivells d'expressió detectats per immunohistoquímica (Ac VE1) en nevus i melanoma i determinació d'un punt de tall en l'escala *histoscore* per discriminar la positivit/negativitat de *V600E*

S'observà, de manera molt remarcable que els casos amb presència de la mutació *V600E* (n=30) presentaven uns valors de immunoexpressió determinats per VE1 significativament superiors als casos no mutats (*wild type*/*V600K*, n=54), essent la diferència estadísticament significativa (**Taula 11 i figura 25**).

**Taula 11. Anàlisi d'immunoexpressió entre els casos positius (*V600E*) i negatius (*WT/V600K*)**

	Total (n=84)	PCR		Valor p	
		<i>V600E</i> (n=30)	<i>WT/V600K</i> (n=54)	No paramètric	Paramètric
IHC	59,64 (77,45)	114,80 (77,24)	28,98 (58,71)	<0,00001	<0,00001



**Figura 25. Immunoexpressió dels casos positius (V600E) i negatius (WT/V600K)**

Respecte al punt de tall, s'observà que aquells casos amb un valor d'*histoscore* superior o igual a 45 presentaven una probabilitat de mutació del 72,7% enfront del 11,76% dels casos amb valors inferiors ( $p < 0,00001$ ). La sensibilitat i especificitat eren del 80% (95% IC el 61% - 92%) i 83% (95% IC el 71% - 92%) respectivament (**Taula 12**).

**Taula 12. Sensibilitat i especificitat de la immunotinció amb VE1 considerant un punt de tall de l'*histoscore* de 45/300**

	Total (n=84)	PCR		Valor $p$	
		V600E (n=30)	WT/V600K (n=54)	No paramètric	Paramètric
<b>Tall IHC</b>					
<b>[0,45]</b>	51 (60,71%)	6 (20%)	45 (83,33%)	<0,00001	<0,00001
<b>(45,300]</b>	33 (39,29%)	24 (80%)	9 (16,67%)		

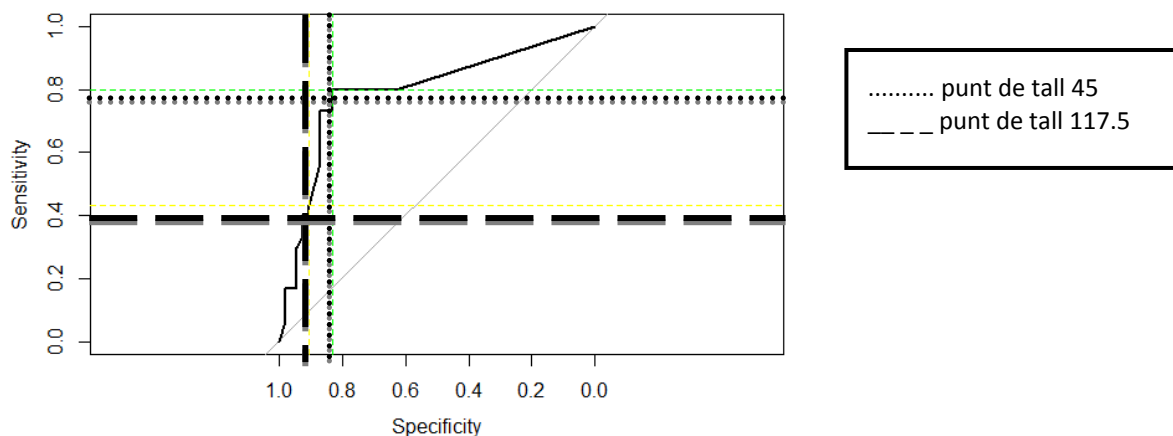
Vàrem intentar determinar un punt de tall en l'escala *histoscore* per discriminar la positivitats/negativitat de V600E amb major especificitat malgrat menor sensibilitat. Vàrem observar que aquells casos amb un valor d'*histoscore* superior o igual a 117,5 presentaven una probabilitat de mutació del 72,7% enfront del 11,76% dels casos amb valors inferiors ( $p = 0,0006$ ). La sensibilitat i especificitat eren del 43% (95% IC 25% - 63%) i 91% (95% IC 80% - 97%) respectivament (**Taula 13**).

**Taula 13. Sensibilitat i especificitat de la immunotinció amb VE1 considerant un punt de tall de l'*histoscore* de 110/300**

	Total (n=84)	PCR		Valor $p$	
		V600E (n=30)	WT/V600K (n=54)	No paramètric	Paramètric
<b>Tall IHC</b>					
<b>[0,110]</b>	66 (78,57%)	17 (56,67%)	49 (90,74%)	0,0006	0,0008
<b>(110,300]</b>	18 (21,43%)	13 (43,33%)	5 (9,26%)		

En conjunt, doncs, tot i intentar augmentar l'especificitat, augmentant el punt de tall del *histoscore* de 45 a 117,5, 5 pacients sense mutació *V600E* seguirien apareixent com a positius (i candidats al tractament amb un inhibidor de BRAF). En canvi en 66 pacients (78,57% del total, que serien considerats com negatius amb aquest punt de tall de l'*histoscore*), s'hauria de realitzar la seqüenciació mitjançant tècniques moleculars per determinar si realment són negatius per *V600E* (*wild type* o *V600K*) (**figura 26**).

El punt de tall de l'*histoscore* que vàrem triar per considerar la immunotinció amb VE1 positiva per la mutació *V600E*, amb millor sensibilitat i especificitat, va ser doncs de 45.



**Figura 26.** Sensibilitat i especificitat de la immunotinció amb VE1 segons els dos possibles punts de tall.

## 2.5. Correlació entre les característiques clíniques i la classificació dels nevus segons criteris histopatològics i dermatoscòpics

### 2.5.1. Correlació entre les variables clíniques i els grups de nevus segons la seva classificació histopatològica

No es varen observar diferències significatives en la distribució dels grups de NMCA vs nevus displàsic entre les diferents característiques clíniques recollides, el que indica que la mostra era homogènia i no estava esbiaixada cap a cap grup clínic en concret (**Taula 14**).

**Taula 14. Anàlisi d'homogeneïtat entre els 2 tipus histopatològics de nevus (NMCA vs displàsic) en relació al sexe, edat, localització, tipus de fotoexposició i àrea (mida) del nevus**

	Total n =80 (100%)	2 Subtipus		Valor p	
		Comuns n = 60 (75%)	Displàsics n = 20 (25%)	No paramètric	Paramètric
<b>Edat</b>	42,75 (16.78)	40,78 (16,56)	48,65 (16,42)	0,08	0,07
<b>Sexe</b>				1	1
Dona	59 (73,75%)	44 (73,33%)	15 (75%)		
Home	21 (26,25%)	16 (26,67%)	5 (25%)		
<b>Àrea anatòmica</b>				0,52	0,39
Cap i coll	12 (15%)	11 (18,33%)	1 (5%)		
Tórax	4 (5%)	4 (6,67%)	0 (0%)		
Abdomen	12 (15%)	9 (15%)	3 (15%)		
Esquena superior	27 (33,75%)	17 (28,33%)	10 (50%)		
Esquena inferior	7 (8,75%)	5 (8,33%)	2 (10%)		
Extremitats superiors	3 (3,75%)	3 (5%)	0 (0%)		
Extremitats inferiors	15 (18,75%)	11 (18,33%)	4 (20%)		
<b>Exposició solar</b>				0,28	0,28
Crònica	12 (15%)	11 (18,33%)	1 (5%)		
Intermitent	68 (85%)	49 (81,67%)	19 (95%)		
<b>Àrea (mm<sup>2</sup>)</b>	33,16 (21,26)	31,89 (20,75)	36,75 (22,81)	0,45	0,41

Es mostren la mitjana (i la desviació estàndard) i la freqüència absoluta (i percentatge). La significació de les diferències es va avaluar amb proves paramètriques (t-test i prova d'independència de Pearson ( $X^2$ )) o proves no paramètriques (Mann-Whitney o la prova exacta de Fisher), segons el més convenient.

### 2.5.2. Distribució dels nevus classificats segons el patró global de l'anàlisi de patrons en relació a les diferents variables clíniques recollides

Es varen observar diferències estadísticament significatives en relació a totes les variables estudiades (**taula 15**).

Respecte a l'edat ( $p=0,03$ ), el patró globular/en empedrat va ser més freqüent entre els pacients més joves (edat mitjana 38,06 anys, DE 15,68) i el multicomponent entre els pacients més grans (51,87 anys, DE 20,45).

Respecte al sexe ( $p=0,01$ ), encara que la mostra contenia més dones que homes, es van observar diferències en el següent sentit: el patró inespecífic va ser més freqüent a les dones (100%), així com el globular/en empedrat (88,24%), mentre que el multicomponent es va veure en un 53,33% als homes i en un 46,67% a les dones i el mixt R-G/R-E en un 35,29% als homes i un 64,75% a les dones; no es va extirpar cap nevus de patró inespecífic als homes (0%).

En quant a la localització ( $p>0,001$ ), el patró globular/en empedrat (41,18%) i el patró inespecífic (50%) varen ser més freqüents a cap i coll i inexistents a la part inferior de l'esquena (0 i 0% respectivament); tampoc es va veure cap nevus de patró inespecífic a l'abdomen, la part superior de l'esquena i les extremitats, tant superiors com inferiors. La localització més freqüent dels nevus amb patró multicomponent va ser la part superior de l'esquena (60%) i, en segon lloc, les extremitats inferiors (20%); no es va recollir cap nevus amb patró multicomponent a la part anterior del tòrax, la part inferior de l'esquena ni les extremitats superiors i tan sols 1 (6,67%) a cap i coll. Entre els nevus amb patró reticular, la localització més freqüent va ser les extremitats inferiors (40%), seguida per la part superior de l'esquena (28%), l'abdomen (16%) i la part inferior de l'esquena (12%); tan sols es va veure 1 a cap i coll (4%) i cap a cara anterior del tòrax i a les extremitats superiors. Finalment, en quant als nevus amb patró mixt R-G/R-E, la majoria d'ells estaven localitzats a la part superior de l'esquena (35,29%), l'abdomen (29,41%) i la part inferior de l'esquena (23,53%), cap a cap i coll o abdomen i tan sols 1 a les extremitats superiors o inferiors (5,88% i 5,88%, respectivament).

Respecte al tipus d'exposició solar, segons la localització ( $p=0,01$ ), els nevus de patró globular/en empedrat i inespecífic es varen localitzar tant a les zones d'exposició crònica com intermitent (41,18% i 58,82%; 50% i 50%, respectivament) mentre que cap nevus de patró mixt R-G/R-E (0%) i tan sols 1 de patró reticular (4%) i 1 de patró multicomponent (6,67%) es varen localitzar a zones d'exposició solar crònica.

Per acabar, en relació a la mida, valorada com l'àrea en mm<sup>2</sup>, dels nevus extirpats, els de patró globular/en empedrat eren els més grans (mitjana 40,74mm, desviació estàndard 19,36) seguits dels de patró multicomponent (38,89mm, DE 22,63), els de patró mixt R-G/R-E (28,5, DE 15,68) i els de patró reticular (25,74, DE 21,32) essent els de patró inespecífic els més petits (18mm, DE 4,94).

**Taula 15. Distribució dels nevus segons el patró dermatoscòpic global de l'anàlisi de patrons (globular/en empedrat, inespecífic, multicomponent, reticular, mixt R-G/R-E) en quant a sexe, edat, localització, fotoexposició solar i àrea (mida) de nevus**

Patró dermatoscòpic global							
	Total n=80 (100%)	Globular/ Empedrat n=17(21,25%)	Inespecífic n=6 (7,5%)	Multi- component n=15(18,75%)	Reticular n=25 (31,25%)	R-G/R-E n=17(21,25%)	Valor p
<b>Edat</b>	42,75 (16,78)	38,06 (15,68)	45,17(10,18)	51,87 (20,45)	42,04 (16,47)	39,59 (16,56)	<b>0,024</b>
<b>Sexe</b>							<b>0,02</b>
Dona	59 (73,75%)	15 (88,24%)	6 (100,00%)	7 (46,67%)	20 (80,00%)	11 (64,71%)	
Home	21 (26,25%)	2 (11,76%)	0 (0,00%)	8 (53,33%)	5 (20,00%)	6 (35,29%)	
<b>Àrea anatòmica</b>							<b>&lt;0,001</b>
Cap i coll	12 (15,00%)	7 (41,18%)	3 (50,00%)	1 (6,67%)	1 (4,00%)	0 (0,00%)	
Tórax	4 (5,00%)	3 (17,65%)	1 (16,67%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	
Abdomen	12 (15,00%)	1 (5,88%)	0 (0,00%)	2 (13,33%)	4 (16,00%)	5 (29,41%)	
Esquena superior	27 (33,75%)	3 (17,65%)	2 (33,33%)	9 (60,00%)	7 (28,00%)	6 (35,29%)	
Esquena inferior	7 (8,75%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	3 (12,00%)	4 (23,53%)	
Extr. Superiors	3 (3,75%)	2 (11,76%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (5,88%)	
Extr. Inferiors	15 (18,75%)	1 (5,88%)	0 (0,00%)	3 (20,00%)	10 (40,00%)	1 (5,88%)	
<b>Exposició solar</b>							<b>0,001</b>
Crònica	12 (15,00%)	7 (41,18%)	3 (50,00%)	1 (6,67%)	1 (4,00%)	0 (0,00%)	
Intermitent	68 (85,00%)	10 (58,82%)	3 (50,00%)	14 (93,33%)	24 (96,00%)	17 (100,00%)	
<b>Àrea (mm<sup>2</sup>)</b>	33.16 (21.26%)	40,72 (19,36)	18 (4,94)	39,89 (22,63)	25,74 (21,32)	28,5 (15,68)	<b>0,01</b>

Es mostren la mitjana (i desviació estàndard) i freqüència absoluta (i percentatge). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques Kruskal-Wallis o la prova exacta de Fisher, segons el més convenient). R-G/R-E: patró mixt reticulo-globular o reticular-en empedrat.

### 2.5.3. Distribució dels nevus classificats segons el patró dermatoscòpic de la classificació de I. Zalaudek en relació a les diferents variables clíniques recollides

Es varen observar diferències estadísticament significatives en quant al sexe, la localització i la fotoexposició solar (**Taula 16**).

Respecte al sexe ( $p < 0,001$ ), donat que la mostra contenia més nevus de dones que d'homes, a diferència del que succeïa a l'anàlisi de patrons, en tots el grups varen ser més abundants els nevus en dones que en homes. Malgrat això, el patró globular/en empedrat va ser molt més freqüent a les dones (91,67%) que als homes (8,33%), mentre que en els altres patrons no es varen observar tantes diferències (60,87% de nevus amb patró GC/RP, 73,08% de nevus amb patró reticular i 66,7% de nevus amb patró RC/GP a les dones).

En relació a la localització ( $p < 0,001$ ), la majoria de nevus amb patró globular/en empedrat provenien de cara i coll (41,67%), seguit de la part alta de l'esquena (25%) i la part anterior del tòrax (16,36%); no es va observar cap nevus amb aquest patró (0%) a la part inferior de l'esquena i tan sols 1 a l'abdomen (4,17%) i les extremitats inferiors (4,17%). Respecte al patró GC/RP, la majoria de nevus es varen localitzar a la part superior de l'esquena (52,17%), seguida de la zona inferior de l'esquena (17,39%) i a parts iguals l'abdomen (13,04%) i les extremitats inferiors (13,04%); cap nevus amb aquest patró provenia de cap i coll o de la zona anterior del tòrax i tan sols 1 (4,34%) de les extremitats superiors. Entre els nevus amb patró reticular, la localització més freqüent va ser les extremitats inferiors (38,46%), seguida per la part superior de l'esquena (30,77%) i, a distància, l'abdomen (15,38%) i la part inferior de l'esquena (11,54%); tan sols es va veure 1 a cap i coll (3,85%) i cap a cara anterior de tòrax i a les extremitats superiors. Finalment, en quant als nevus amb patró RC/GP, la majoria estaven situats a l'abdomen (66,67%), seguits a distància i a parts iguals per la part superior de l'esquena (16,7%) i les extremitats inferiors (16,7%); no es va extirpar cap nevus amb aquest patró de cap i coll, cara anterior del tòrax, part inferior de l'esquena ni extremitats superiors.

En quant al tipus d'exposició solar, segons la localització ( $p < 0,001$ ), els nevus de patró globular/en empedrat es distribuïen tant a les zones d'exposició crònica com intermitent (41,67% i 58,33, respectivament) mentre que cap nevus de patró GC/RP ni RC/GP (0% i 0%) i tan sols 1 de patró reticular (3,85%) provenien de zones d'exposició solar crònica.



**Taula 16. Distribució dels nevus segons el patró dermatoscòpic de la classificació de I. Zalaudek (globular/en empedrat, GC/RP, reticular, RC/GP) en quant a sexe, edat, localització, fotoexposició solar i àrea (mida) del nevus**

Patró dermatoscòpic segons Zalaudek						
	Global n=79 (100%)	Globular/ empedrat n=24 (30,38%)	GC/RP n=23 (29,11%)	Reticular n=26 (32,91%)	RC/GP n=6 (7,59%)	Valor p
<b>Edat</b>	42,35 (16,5)	42,43 (16,66)	42,14(16,78)	45,08 (17,45)	36,17 (11,96)	0,88
<b>Sexe</b>						<b>&lt;0,001</b>
Dona	59 (74,68%)	22 (91,67%)	14(60,87%)	19 (73,08%)	4 (66,67%)	
Home	20 (25,32%)	2 (8,33%)	9 (39,13%)	7 (26,92%)	2 (33,33%)	
<b>Àrea anatòmica</b>						<b>&lt;0,001</b>
Cap i coll	11(13,75%)	10 (41,67%)	0 (0,00%)	1 (3,85%)	0 (0,00%)	
Tórax	4 (5,00%)	4 (16,367%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	
Abdomen	12 (15,00%)	1 (4,17%)	3 (13,04%)	4 (15,38%)	4 (66,67%)	
Esquena superior	27 (33,75%)	6 (25%)	12 (52,17%)	8 (30,77%)	1 (16,67%)	
Esquena inferior	7 (8,75%)	0 (0,00%)	4 (17,39%)	3 (11,54%)	0 (0,00%)	
Ext. Superiors	3 (3,75%)	2 (8,33%)	1 (4,34%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	
Ext. Inferiors	15 (18,75%)	1 (4,17%)	3 (13,04%)	10 (38,46%)	1 (16,67%)	
<b>Exposició solar</b>						<b>&lt;0,001</b>
Crònica	11 (13,75%)	10 (41,67%)	0 (0,00%)	1( 3,85%)	0 (0,00%)	
Intermitent	68 (85,00%)	14 (58,33%)	23 (100,00%)	25 (96,15%)	6 (100,00%)	
<b>Àrea (mm<sup>2</sup>)</b>	33,33 (21,35)	35,85 (20,87)	33,76 (21,46)	32,17 (23,11%)	40,17 (19,69%)	0,3

Es mostren la mitjana (i desviació estàndard) i freqüència absoluta (i percentatge). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques Kruskal-Wallis o la prova exacta de Fisher (segons el més convenient). GC/RP: glòbuls o àrea sense estructura marró central i reticle perifèric. RC/GP: reticle o àrea sense estructura marró central i glòbuls perifèrics.

## 2.6. Correlació entre les diferents classificacions (histològiques vs dermatoscòpiques)

Tant si separem els nevus adquirits en dos grups (NMCA vs nevus displàsic), com si tenim en compte els 3 grups de NMCA (juntural, compost i intradèrmic) trobem una correlació estadísticament significativa quan comparem ambdues classificacions (classificació histològica vs classificació segons l'anàlisi de patrons o classificació histològica vs classificació de I. Zalaudek) (**Taula 17**).

En la distribució dels NMCA i nevus displàsics respecte als patrons globals de l'anàlisi de patrons ( $p=0,001$ ), la majoria dels NMCA (28,33%) tenien un patró globular/en empedrat, seguit d'aprop pels patrons reticular (25%) i mixt R-G/R-E (21,25%) i, en menor grau, patrons inespecífic (10%) i multicomponent (11,67%). En els nevus histològicament displàsics vàrem descriure una majoria (50%) de lesions amb patró reticular, seguit del patró multicomponent (40%); en tan sols 2 lesions patró mixt R-G/R-E (10%) i en cap un patró globular/en empedrat o inespecífic.

En la distribució dels NMCA i nevus displàsics respecte als patrons de la classificació de I. Zalaudek ( $p=0,01$ ), la gran majoria dels NMCA presentaven patró globular (40,67%), després era més freqüent el patró GC/RP (27,11%), seguit del reticular (26,75%) i, per últim, el patró RC/GP (6,77%). Els nevus histològicament displàsics mostraven majoritàriament un patró reticular (55%), seguit del patró GC/RP (35%); tan sols 2 nevus es varen classificar en el patró RC/GP (10%) i cap en patró globular/en empedrat.

En la comparació entre els 4 tipus de nevus melanocítics adquirits respecte als patrons globals de l'anàlisi de patrons ( $p<0,001$ ), als nevus junturals el patró predominant era el reticular (40%), seguit del patró mixt R-G/R-E (35%) i del multicomponent (20%) amb tan sols 1 classificat com a patró globular/en empedrat (5%) i cap amb patró inespecífic. Els nevus compostos mostraven majoritàriament patró mixt R-G/R-E (40%) i reticular (35%) amb un 15% de patró multicomponent i un 10% (2 casos) de patró globular/en empedrat; cap mostrava un patró inespecífic. En cap dels nevus intradèrmics es va identificar un patró multicomponent (0%), reticular (0%) o mixt R-G/R-E (0%); tots mostraven o un patró globular/en empedrat (70%) o inespecífic (30%). En els nevus displàsics, com ja s'ha comentat, es va identificar una majoria (50%) de lesions amb patró reticular (50%), seguit del

patró multicomponent (40%); en tan sols 2 lesions patró mixt R-G/R-E (10%) i en cap un patró globular/en empedrat o inespecífic.

En la comparació entre els 4 tipus de nevus melanocítics adquirits respecte als patrons de la classificació de I. Zalaudek ( $p < 0,001$ ), als nevus junturals, els patrons predominants varen ser el reticular (42,11%) o GC/RP (42,11%), sent molt menys freqüents el patró RC/GP (10,52%) i el patró globular/en empedrat (5,26%). Als nevus compostos, el patrons predominants varen ser el GC/RP (40%) i el reticular (35%) i sent molt menys freqüents els patrons globular/en empedrat (15%) i RC/GP (10%). En quant els nevus intradèrmics, el 100% van presentar un patró globular/en empedrat. De nou el patró dermatoscòpic que vàrem trobar en els nevus displàsics extirpats ja està descrit en el segon paràgraf d'aquest apartat; en aquestes lesions es va identificar majoritàriament un patró reticular (55%), seguit del patró GC/RP (35%) i RC/GP (10%). Cap nevus displàsic va presentar patró globular o en empedrat.

**Taula 17. Avaluació de la comparació entre les diferents classificacions de nevus (histològiques vs dermatoscòpiques)**

	Total n = 80 (100%)	2 Subtipus		Valor p	4 subtipus				Valor p
		NMCA n = 60 (75%)	ND n = 20 (25%)		NJ n = 20 (25%)	NC n = 20 (25%)	NI n = 20 (25%)	ND n = 20 (25%)	
<b>PATRÓ GLOBAL</b>									
				<b>&lt;0,001</b>					<b>&lt;0,001</b>
Globular/empedrat	17 (21,25%)	17 (28,33%)	0 (0%)		1 (5%)	2 (10%)	14 (70%)	0 (0%)	
Inespecífic	6 (7,5%)	6 (10%)	0 (0%)		0 (0%)	0 (0%)	6 (30%)	0 (0%)	
Multicomponent	15 (18,75%)	7 (11,67%)	8 (40%)		4 (20%)	3 (15%)	0 (0%)	8 (40%)	
Reticular	25 (31,25%)	15 (25%)	10 (50%)		8 (40%)	7 (35%)	0 (0%)	10 (50%)	
R-G/R-E	17 (21,25%)	15 (25%)	2 (10%)		7 (35%)	8 (40%)	0 (0%)	2 (10%)	
<b>PATRÓ ZALAUDEK</b>									
				<b>0,01</b>					<b>&lt;0,001</b>
Globular/empedrat	24 (30,38%)	24 (40,67%)	0 (0%)		1 (5,26%)	3 (15%)	20 (100%)	0 (0%)	
GC/RP	23 (29,11%)	16 (27,11%)	7 (35%)		8 (42,11%)	8 (40%)	0 (0%)	7 (35%)	
RC/GP	6 (7,59%)	4 (6,77%)	2 (10%)		2 (10,52%)	2 (10%)	0 (0%)	2 (10%)	
Reticular	26(32,91%)	15 (25,42%)	11 (55%)		8 (42,11%)	7 (35%)	0 (0%)	11 (55%)	

Es mostren la freqüència (i percentatge). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (prova exacta de Fisher). R-G/R-E: retículo-globular/retículo-empedrat. GC/RP: glòbuls o àrea sense estructura marró central i reticle perifèric. RC/GP: reticle o àrea sense estructura marró central i glòbuls perifèrics. NJ: nevus juntural, NC: nevus compost, NI: nevus intradèrmic, ND: nevus displàsic.

## 2.7. Associació entre les característiques dermatoscòpiques locals i els diferents grups de les classificacions dermatoscòpiques i histològiques

### 2.7.1. Associació entre les característiques dermatoscòpiques locals i els diferents grups de les classificacions dermatoscòpiques

Els resultats es poden veure a les **taules 18 i 19**.

**2.7.1.1.** Respecte a la distribució de les característiques dermatoscòpiques locals i la classificació segons els patrons globals de l'anàlisi de patrons, es varen trobar diferències estadísticament significatives respecte a l'absència/presència i/o característiques dels següents 11 paràmetres: del reticle ( $p < 0,001$ ), glòbuls ( $p < 0,001$ ), vasos en coma ( $p < 0,001$ ), vasos puntiformes ( $p = 0,02$ ), vasos lineals irregulars ( $p = 0,007$ ), vasos i/o eritema a l'interior d'estructures de regressió ( $p = 0,008$ ), vel blau-gris ( $p < 0,001$ ), estructures de regressió ( $p < 0,001$ ), despigmentació ( $p = 0,046$ ), àrees hipopigmentades sense estructura o homogènies ( $p = 0,005$ ) i traces de pigment marró-gris ( $p < 0,001$ ).

**Taula 18.** Avaluació de l'associació entre les característiques dermatoscòpiques locals amb les categories de la classificació dermatoscòpica basada en els patrons globals de l'anàlisi de patrons

Característica dermatoscòpica local	Total n=80 (100%)	Patró dermatoscòpic global					Valor p
		Globular/ empedrat (n = 17; 21,25%)	inespecífic (n = 6; 7,5%)	Multicomponent (n = 15; 18,75%)	Reticular (n = 25; 31,25%)	R-G/R-E (n = 17; 21,25%)	
<b>Reticle</b>							<b>&lt;0,001</b>
Típic	20 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (13,33%)	13 (52%)	5 (29,42%)	
Atípic	37 (46,25%)	0 (0%)	0 (0%)	13 (86,67%)	12 (48%)	12 (70,58%)	
NO reticle	23 (28,75%)	17 (100%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Glòbuls</b>							<b>&lt;0,001</b>
Regulars	43 (53,75%)	16 (94,12%)	3 (50%)	4 (26,67%)	7 (28%)	13 (76,47%)	
Irregulars	16 (20%)	1 (5,88%)	0 (0%)	9 (60%)	2 (8%)	4 (23,53%)	
NO glòbuls	21 (26,25%)	0 (0%)	3 (50%)	2 (13,33%)	16 (64%)	0 (0%)	
<b>Taques de pigment</b>							0,21
Simètriques	2 (2,5%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (4%)	1 (5,88%)	
Asimètriques	2 (2,5%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (13,33%)	0 (0%)	0 (0%)	
NO taques pigm.	76 (95%)	17 (100%)	6 (100%)	13 (86,67%)	24 (96%)	16 (94,12%)	
<b>Projeccions radials</b>							-
Regulars	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Irregulars	1 (1,25%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,67%)	0 (0%)	0 (0%)	
NO projeccions	79 (98,75%)	17 (100%)	6 (100%)	14 (93,33%)	25 (100%)	17 (100%)	
<b>Vasos en coma</b>							<b>&lt;0,001</b>
Sí	28 (35%)	16 (94,12%)	6 (100%)	1 (6,67%)	1 (4%)	4 (23,53%)	
NO	52 (65%)	1 (5,88%)	0 (0%)	14 (93,33%)	24 (96%)	13 (76,47%)	
<b>Vasos puntiformes</b>							<b>0,02</b>
Sí	3 (3,75%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (17,65%)	
NO	77 (96,25%)	17 (100%)	6 (100%)	15 (100%)	25 (100%)	14 (82,35%)	
<b>Vasos lineals irregulars</b>							<b>0,007</b>
Sí	9 (11,25%)	5 (29,41%)	2 (33,33%)	2 (13,13%)	0 (0%)	0 (0%)	
NO	71 (88,75%)	12 (70,58%)	4 (66,67%)	13 (86,67%)	25 (100%)	17 (100%)	
<b>Vasos i/o eritema dins d'estructures de regressió</b>							<b>&lt;0,001</b>
Sí	8 (8,75%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (40%)	1 (4%)	1 (5,88%)	
NO	72 (91,25%)	17 (100%)	6 (100%)	9 (60%)	24 (96%)	16 (94,12%)	
<b>Vel blau-gris</b>							<b>&lt;0,001</b>

SÍ	12 (15%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (54,33%)	3 (12%)	1 (5,88%)
NO	68 (85%)	17 (100%)	6 (100%)	7 (46,67%)	22 (88%)	16 (94,12%)
<b>Regressió</b>						<b>&lt;0,001</b>
SÍ	22 (27,5%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (80%)	4 (6%)	6 (35,3%)
NO	58 (72,5%)	17 (100%)	6 (100%)	3 (20%)	21 (84%)	11 (64,7%)
<b>Hipopigmentació</b>						<b>&lt;0,001</b>
SÍ	7 (8,75%)	0 (0%)	0 (0%)	5 (33,33%)	2 (8%)	0 (0%)
NO	73 (91,25%)	17 (100%)	6 (100%)	10 (66,67%)	22 (92%)	17 (100%)
<b>Despigmentació</b>						<b>0,046</b>
SÍ	4 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	3 (20%)	0 (0%)	1 (5,88%)
NO	76 (95%)	17 (100%)	6 (100%)	12 (80%)	25 (100%)	16 (94,12%)
<b>Traces pigment marró-gris</b>						<b>&lt;0,001</b>
SÍ	14 (17,5%)	7 (41,18%)	6 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5,88%)
NO	66 (82,5%)	10 (58,82%)	0 (0%)	25 (100%)	15 (100%)	16 (94,12%)

Es mostren la freqüència (i percentatge). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (prova exacta de Fisher). R-G/R-E: retícul-globular/retícul-empedrat.

Comentem els següents exemples sobre les variables significatives:

Òbviament en els patrons globular/en empedrat i inespecífic no es va observar reticle, mentre que aquest sí va ser present en els altres 3 patrons (multicomponent, reticular i mixt R-G/R-E), la majoria dels nevus amb patró multicomponent varen presentar reticle atípic (86,67%), però forces nevus amb patró mixt R-G/R-E (70,58%) també el varen presentar. En la majoria de nevus amb patró globular/en empedrat i inespecífic es varen identificar glòbuls regulars (94,12%) i en la majoria de nevus amb patró multicomponent glòbuls irregulars (60%). Els nevus en què varen predominar els vasos en coma varen ser en els de patró globular/en empedrat i inespecífic (94,12% i 100% dels mateixos, respectivament) mentre que es va descriure en 1 sol cas (4%) de nevus amb patró reticular. Malgrat que no es van veure amb molta freqüència vasos i/o eritema dins d'estructures en regressió (8,75% del total de nevus), es varen identificar en el 40% de nevus amb patró multicomponent i en cap (0%) dels nevus de patró globular/en empedrat i inespecífic. El vel blau-gris, tampoc molt freqüent en el conjunt (15%) es va concentrar en el 54,3% de nevus amb patró multicomponent, sent també nul (0%) en nevus de patró globular/en empedrat i inespecífic. Es varen observar estructures de regressió en el 80% del nevus de patró multicomponent i en el 35,3% de nevus amb patró mixt R-G/R-E, però en cap (0%) de patró globular/en empedrat i inespecífic. Les àrees hipopigmentades sense estructura o homogènies i la despigmentació, també poc comuns al global dels nevus (8,75% i 5%), varen estar presents en força nevus de patró multicomponent (33,3% i 20%). Finalment va ser en els nevus amb patró inespecífic on varen predominar les traces de pigment marró-gris (en el 100% dels

mateixos), mentre que estaven absents (0%) en els de patró multicomponent o reticular i es varen observar en 1 sol cas (5,88%) de nevus de patró mixt R-G/R-E.

**2.7.1.2.** En quant a la distribució de les característiques dermatoscòpiques locals i la classificació segons els patrons definits per I. Zalaudek, es varen trobar diferències estadísticament significatives respecte a l'absència/presència i/o característiques dels següents 7 paràmetres: del reticle ( $p < 0,001$ ), glòbuls ( $p < 0,001$ ), vasos en coma ( $p < 0,001$ ), vasos lineals irregulars ( $p = 0,002$ ), vel blau-gris ( $p = 0,02$ ), estructures de regressió ( $p = 0,003$ ) i traces de pigment marró-gris ( $p < 0,001$ ).

**Taula 19. Avaluació de l'associació entre les característiques dermatoscòpiques locals amb les categories de la classificació dermatoscòpica segons els patrons definits per I. Zalaudek**

Sí	6 (8,75%)	0 (0%)	2 (12%)	3 (0%)	1 (16,67%)	
<b>Patró dermatoscòpic segons Zalaudek</b>						
Despigmentació						0,25
Característica dermatoscòpica	Total (n = 79)	empèdima (n = 24) (30,39%)	multicomponent (n = 23) (29,11%)	reticular (n = 26) (32,90%)	RC/GR (n = 6) (7,60%)	Valor p
<b>Traces pigment marró-gris</b>						<b>&lt;0,001</b>
<b>Reticle</b>	14 (18,75%)	13 (60%)	1 (4,17%)	0 (0%)	0 (0%)	<b>&lt;0,001</b>
Típic	29 (36,71%)	11 (40%)	22 (95,23%)	2 (100%)	1 (100%)	
Atípic	36 (45,57%)	1 (4,35%)	17 (70,83%)	13 (50%)	5 (83,33%)	
NO reticle	23 (29,11%)	23 (95,65%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Glòbuls</b>						<b>&lt;0,001</b>
Regulars	43 (54,43%)	19 (79,16%)	14 (60,87%)	7 (26,92%)	3 (50%)	
Irregulars	15 (18,99%)	1 (4,34%)	8 (33,34%)	3 (11,54%)	3 (50%)	
NO glòbuls	21 (26,58%)	4 (16,67%)	1 (4,34%)	16 (61,54%)	0 (0%)	
<b>Taques de pigment</b>						0,09
Simètriques	2 (2,53%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3,85%)	1 (16,67%)	
Asimètriques	2 (2,53%)	0 (0%)	2 (8,33%)	0 (0%)	0 (0%)	
No taques de pigment	75 (94,94%)	24 (100%)	21 (91,67%)	25 (96,15%)	5 (83,33%)	
<b>Projeccions radials</b>						0,48
Regulars	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Irregulars	1 (1,25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (16,67%)	
No projeccions	78 (98,73%)	24 (100%)	23 (100%)	26 (100%)	5 (83,33%)	
<b>Vasos en coma</b>						<b>&lt;0,001</b>
Sí	28 (35,44%)	22 (91,3%)	5 (25%)	1 (4%)	0 (0%)	
NO	51 (64,56%)	2 (8,7%)	17 (75%)	25 (96%)	6 (100%)	
<b>Vasos puntiformes</b>						0,27
Sí	3 (4%)	0 (0%)	3 (12,5%)	0 (0%)	0 (0%)	
NO	76 (96%)	24 (100%)	20 (87,5%)	26 (100%)	6 (100%)	
<b>Vasos lineals irregulars</b>						<b>0,001</b>
Sí	8 (10%)	7 (30%)	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	
NO	71 (90%)	17 (70%)	22 (97%)	26 (100%)	6 (100%)	
<b>Vasos i/o eritema dins d'estructures de regressió</b>						0,41
Sí	7 (8,75%)	0 (0%)	4 (15,5%)	2 (7,69%)	1 (16,67%)	
NO	72 (91,25%)	24 (100%)	19 (84,5%)	24 (92,31%)	5 (83,33%)	
<b>Vel blau-gris</b>						<b>0,02</b>
Sí	12 (15%)	0 (0%)	5 (20%)	4 (11,54%)	3 (50%)	
NO	67 (85%)	24 (100%)	18 (80%)	22 (88,46%)	3 (50%)	
<b>Regressió</b>						<b>0,002</b>
Sí	21 (26,25%)	0 (0%)	11 (41,67%)	6 (23,08%)	4 (60%)	
NO	59 (73,75%)	24 (100%)	12 (58,33%)	20 (76,92%)	2 (40%)	
<b>Hipopigmentació</b>						0,40

Es mostren la freqüència (i percentatge). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (prova exacta de Fisher). GC/RP: glòbuls o àrea sense estructura marró central i reticle perifèric. RC/GP: reticle o àrea sense estructura marró central i glòbuls perifèrics.

Comentem els següents exemples sobre les variables significatives:

Respecte al reticle, aquest va estar absent en el 95,65% dels casos de patró globular/en empedrat i òbviament present en el 100% dels casos de patró reticular, sent en aquests en el 50% típic i en el 50% atípic. Els percentatges de reticle atípic en el patrons GC/RP i RC/GP varen ser més alts (70,83% i 83,33%, respectivament). En quant als glòbuls, tendien a estar presents i ser regulars (79,16%) en el patró globular/en empedrat, mentre que en el patró de predomini reticular hi havia un 61,54% de lesions sense glòbuls. Encara que es varen trobar 4 casos sense glòbuls en el patró globular/en empedrat, s'ha de considerar que en la classificació de I. Zalaudek no es contempla la possibilitat de patró inespecífic utilitzada a la classificació per patrons globals pels nevus intradèrmics acròmics o intensament hipocròmics en el que tan sols es veien traces de pigment. Els vasos en coma predominaven al patró globular/en empedrat (91,3% de les lesions), estant totalment absents al patró RC/GP. De la mateixa manera, els vasos lineals irregulars, malgrat ser poc comuns al global (10%), es concentraven al grup de nevus de patró globular/en empedrat (30%), estant presents en el 0% de les lesions amb patró reticular o RC/GP. Mai es va veure vel blau-gris als nevus de patró globular/en empedrat (0%) i en quantitat variable als altres patrons, sent el patró RC/GP el que presentava en més alta proporció aquesta característica (50% de les lesions). Les estructures de regressió tampoc es van observar al patró globular/en empedrat (0%) sent el grup de nevus de patró RC/GP els que les va presentar amb major freqüència (60% de les lesions). Finalment, les traces de pigment marró-gris, tot i no ser molt freqüents en el global (18,75%) es varen concentrar en els nevus de patró globular/en empedrat (60% dels mateixos).

**2.7.2. Associació entre les característiques dermatoscòpiques locals i els diferents grups de les classificacions histològiques**

Els resultats es poden veure a les **taules 20 i 21**.

**2.7.2.1.** Respecte a la distribució de les característiques dermatoscòpiques locals i la **classificació histològica entre NMCA i nevus displàsics**, es varen trobar diferències estadísticament significatives respecte a l'absència/presència i/o característiques dels següents 9 paràmetres: del reticle ( $p < 0,001$ ), glòbuls ( $p = 0,005$ ), vasos en coma ( $p < 0,001$ ), vasos lineals irregulars ( $p = 0,03$ ), vasos i/o eritema a l'interior d'estructures de regressió ( $p = 0,009$ ), vel blau-gris ( $p = 0,008$ ), estructures de regressió ( $p = 0,04$ ) i traces de pigment marró-gris ( $p = 0,02$ ).

Taula	SÍ	12 (15%)	5 (8,33%)	7 (35%)	
	NO	68 (85%)	55 (91,67%)	13 (65%)	
	<b>Regressió</b>				<b>0,04</b>
	SÍ	31 (36,25%)	13 (20%)	9 (45%)	
	NO	53 (63,75%)	42 (60%)	11 (55%)	
	<b>Tipus histopatològic</b>				
	Hipopigmentació dermatoscòpica local	n = 73 (88,75%)	n = 55 (78,57%)	n = 18 (90%)	valor p = 1
	Despigmentació				0,15
	Tipic	29 (35%)	11 (16,33%)	9 (45%)	
	Atípic	32 (38,75%)	26 (37,33%)	11 (55%)	
	NO	76 (91,25%)	57 (82,67%)	19 (95%)	
	<b>Traces pigment marró-gris</b>				<b>0,015</b>
	glòbuls				<b>0,008</b>
	Regulars	14 (17,5%)	14 (20,22%)	0 (0%)	
	Irregulars	47 (56,25%)	41 (59,33%)	6 (30%)	
	NO glòbuls	66 (78,75%)	44 (63,67%)	20 (100%)	
	NO taques de pigment	12 (15%)	6 (10%)	6 (30%)	
	<b>Taques de pigment</b>				0,49
	Simètriques	2 (2,5%)	1 (1,67%)	1 (5%)	
	Asimètriques	2 (2,5%)	1 (1,67%)	1 (5%)	
	<b>Projeccions radials</b>				0,25
	Regulars	79 (93,75%)	60 (85,71%)	19 (95%)	
	Irregulars	1 (1,25%)	0 (0%)	1 (5%)	
	NO projeccions	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
	<b>Vasos en coma</b>				<b>&lt;0,001</b>
	SÍ	28 (35%)	27 (45%)	1 (5%)	
	NO	52 (65%)	27 (45%)	0 (0%)	
	<b>Vasos puntiformes</b>				1
	SÍ	3 (3,75%)	3 (5%)	0 (0%)	
	NO	77 (96,25%)	57 (95%)	20 (100%)	
	<b>Vasos lineals irregulars</b>				<b>0,03</b>
	SÍ	9 (11,25%)	9 (15%)	0 (0%)	
	NO	71 (88,75%)	51 (85%)	20 (100%)	
	<b>Vasos i/o eritema dins d'estructures de regressió</b>				<b>&lt;0,001</b>
	SÍ	8 (8,75%)	3 (5%)	5 (25%)	
	NO	72 (91,25%)	57 (95%)	15 (75%)	
	<b>Vel blau-gris</b>				<b>&lt;0,001</b>



**Avaluació de l'associació entre les característiques dermatoscòpiques locals amb les 2 categories de la classificació histopatològica, NMCA i nevus displàsics**

Es mostren la freqüència (i percentatge). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (prova exacta de Fisher).

Comentem els següents exemples sobre les variables significatives:

Dintre dels nevus displàsics, no hi ha cap cas (0%) que no mostri reticle i en una majoria (55%) aquest és atípic; malgrat això, també es va observar reticle que es va considerar atípic

---

en un 43,33% de NMCA. Tant la presència de glòbuls com el fet de que aquests fossin regulars va ser una característica del 68,33% dels NMCA. Dintre del grup dels nevus displàsics, molt pocs varen mostrar vasos en coma o vasos lineals irregulars (5% i 0%) que, en canvi, varen estar presents en el 45% i el 15% del NMCA, respectivament. Pel contrari, malgrat ser una característica poc freqüent del global de nevus (8,75%), es varen identificar vasos i/o eritema dins d'estructures de regressió en el 25% del nevus displàsics i tan sols en el 5% dels NMCA. El vel blau-gris i les estructures de regressió també varen ser força més freqüents als nevus displàsics (35% i 45%, respectivament) que als NMCA que tan sols presentaven aquestes característiques en un 8,33% i un 20% dels mateixos. Les àrees hipopigmentades sense estructura o homogènies i la despigmentació varen ser poc comuns al global dels nevus (8,75% i 5%) i van estar presents de manera similar als nevus displàsics (10% i 5%) i als NMCA (8,33% i 5%) respectivament. Finalment, cap nevus displàsic va presentar traces de pigment marró-gris (0%), mentre que aquestes es varen identificar en el 23,33% dels NMCA.

**2.7.2.2.** Respecte a la distribució de les característiques dermatoscòpiques locals i la **classificació histològica entre els diferents tipus de NMCA (juntural, compost, intradèrmic) i nevus displàsics**, es varen trobar diferències estadísticament significatives respecte a l'absència/presència i/o característiques dels següents 8 paràmetres: del reticle ( $p < 0,001$ ), glòbuls ( $p = 0,003$ ), vasos en coma ( $p < 0,001$ ), vasos lineals irregulars ( $p = 0,02$ ), vasos i/o eritema a l'interior d'estructures de regressió ( $p = 0,01$ ), vel blau-gris ( $p = 0,02$ ), estructures de regressió ( $p = 0,005$ ) i traces de pigment marró-gris ( $p < 0,001$ ).

**Taula 21. Avaluació de l'associació entre les característiques dermatoscòpiques locals amb les 4 categories de la classificació histopatològica, nevus junturals, compostos, intradèrmics i displàsics**

Característiques dermatoscòpiques local	Total N=80 (100%)	Tipus histopatològic				Valor p
		NJ n = 20	NC n = 20	NI n = 20	ND n = 20	
		-25%	-25%	-25%	-25%	

<b>Reticle</b>						<b>&lt;0,001</b>
Típic	20 (25%)	4 (20%)	7 (35%)	0 (0%)	9 (45%)	
Atípic	37 (46,25%)	15 (75%)	11 (55%)	0 (0%)	11 (55%)	
NO reticle	23 (28,75%)	1 (5%)	2 (10%)	20 (100%)	0 (0%)	
<b>Glòbuls</b>						<b>0,02</b>
Regulars	43 (53,75%)	9 (45%)	11 (55%)	17 (85%)	6 (30%)	
Irregulars	16 (20%)	5 (25%)	5 (25%)	0 (0%)	6 (30%)	
NO glòbuls	21 (26,25%)	7 (35%)	4 (20%)	2 (10%)	8 (40%)	
<b>Taques de pigment</b>						<b>0,19</b>
Simètriques	2 (2,5%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	1 (5%)	
Asimètriques	2 (2,5%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	
NO taques de pigment	76 (95%)	19 (95%)	19 (95%)	20 (100%)	18 (90%)	
<b>Projeccions radials</b>						<b>1</b>
Regulars	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Irregulars	1 (1,25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (5%)	
NO projeccions	79 (98,75%)	20 (100%)	20 (100%)	20 (100%)	19 (95%)	
<b>Vasos en coma</b>						<b>&lt;0,001</b>
SÍ	28 (35%)	2 (10%)	5 (25%)	20 (100%)	1 (10%)	
NO	52 (65%)	18 (90%)	15 (75%)	0 (100%)	19 (95%)	
<b>Vasos puntiformes</b>						<b>1</b>
SÍ	3 (3,75%)	1 (5%)	2 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	
NO	77 (96,25%)	19 (95%)	18 (90%)	20 (100%)	20 (100%)	
<b>Vasos lineals irregulars</b>						<b>0,03</b>
SÍ	9 (11,25%)	1 (5%)	2 (10%)	6 (30%)	0 (0%)	
NO	71 (88,75%)	19 (95%)	18 (90%)	17 (70%)	20 (100%)	
<b>Vasos i/o eritema dins d'estructures de regressió</b>						<b>0,02</b>
SÍ	8 (8,75%)	2 (10%)	1 (5%)	0 (0%)	5 (25%)	
NO	72 (91,25%)	18 (90%)	19 (95%)	20 (100%)	15 (75%)	
<b>Vel blau-gris</b>						<b>0,02</b>
SÍ	12 (15%)	3 (15%)	2 (10%)	0 (0%)	7 (35%)	
NO	68 (85%)	17 (85%)	18 (90%)	20 (100%)	13 (65%)	
<b>Regressió</b>						<b>&lt;0,001</b>
SÍ	21 (26,25%)	7 (35%)	5 (25%)	0 (0%)	9 (45%)	
NO	59 (73,75%)	13 (65%)	15 (75%)	20 (100%)	11 (55%)	
<b>Hipopigmentació</b>						<b>0,5</b>
SÍ	7 (8,75%)	2 (10%)	3 (15%)	0 (0%)	2 (10%)	
NO	73 (91,25%)	18 (90%)	17 (85%)	20 (100%)	18 (90%)	
<b>Despigmentació</b>						<b>0,61</b>
SÍ	4 (5%)	0 (0%)	3 (15%)	0 (0%)	1 (5%)	
NO	76 (95%)	20 (100%)	17 (85%)	20 (100%)	19 (95%)	
<b>Traces pigment marró-gris</b>						<b>&lt;0,001</b>
NO	14 (17,5%)	0 (0%)	1 (5%)	13 (65%)	0 (0%)	
SÍ	66 (82,5%)	20 (100%)	19 (95%)	7 (35%)	20 (100%)	

Es mostren la freqüència (i percentatge). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (prova exacta de Fisher). NJ: nevus juntural, NC: nevus compost, NI: nevus intradèrmic, ND: nevus displàsic.

Comentem els següents exemples sobre les variables significatives:

En quant al reticle, va estar absent a tots els nevus intradèrmics, tant típic com atípic. Malgrat això es va descriure el reticle com atípic en el 55% dels nevus displàsics, però també en el 75% dels junturals i el 55% dels compostos. Els glòbuls estaven presents en la majoria

de nevus intradèrmics, sent a més regulars (85%), els displàsics varen presentar de forma idèntica glòbuls regulars o irregulars (30% i 30%) i en els junturals i compostos, si presentaven glòbuls, aquests solien ser regulars (45% i 55%). Els vasos en coma es varen observar en el 100% dels nevus intradèrmics, en un 30% dels compostos, en 2 junturals (10%) i en un únic displàsic (5%). Els vasos lineals irregulars també es varen observar amb més freqüència als nevus intradèrmics (30%) i compostos (10%) i a cap displàsic (0%). En canvi, es varen identificar vasos i/o eritema a l'interior d'estructures de regressió en un 25% de nevus displàsics, tan sols 2 (10%) junturals, 1 compost (5%) i 0% intradèrmics. De la mateixa manera, les estructures de regressió estaven presents en quasi la meitat dels nevus displàsics (45%), 35% dels junturals, tan sols en 5 compostos (25%) i cap intradèrmic. Com hem comentat, les àrees hipopigmentades sense estructura o homogènies i la despigmentació varen ser poc comuns al global dels nevus (8,75% i 5%); la primera característica va estar present de forma similar als diferents grups de nevus; 10% dels displàsics, 10% dels junturals, 15% dels compostos, encara que en cap intradèrmic (0%); mentre que la despigmentació va ser més freqüent als nevus compostos (15%), en un 10% dels displàsics i cap juntural o intradèrmic (0% i 0%). Finalment, les traces de pigment marró-gris es varen concentrar en els nevus intradèrmics (65% dels mateixos); pel que fa a la resta, es varen veure en 1 compost (5%) i en cap juntural o displàsic (0% i 0%).

## **2.8. Positivitat per *BRAF/V600E* en els diferents tipus de nevus**

### **2.8.1. Presència de la mutació *BRAF/V600E* determinada per seqüenciació en els diferents tipus histològics de nevus**

Malgrat ser un grup massa reduït de nevus ( $n=20$ ), amb 4 subtipus diferents, per buscar diferències estadísticament significatives, es pot fer una descripció dels resultats, que es mostren a les **taules 22, 23 i figura 27**.

Com ja s'ha comentat a l'apartat 4, cap dels nevus melanocítics adquirits estudiats va presentar mutacions de *BRAF* diferents a la *V600E* (ni *V600K* ni altres). Dels 11 nevus melanocítics adquirits amb mutació *BRAF/V600E*, el grup de NMCA eren portadors de la mutació en un 53,3% i el grup de nevus displàsics en un 60% dels casos. Si considerem els

diferents tipus de NMCA per separat, els nevus intradèrmics eren portadors de la mutació en el 100% dels casos, els compostos en el 40% i els junturals en el 20%.

**Taula 22. Mutació *BRAF/V600E* determinada per seqüenciació als NMCA vs nevus displàsics**

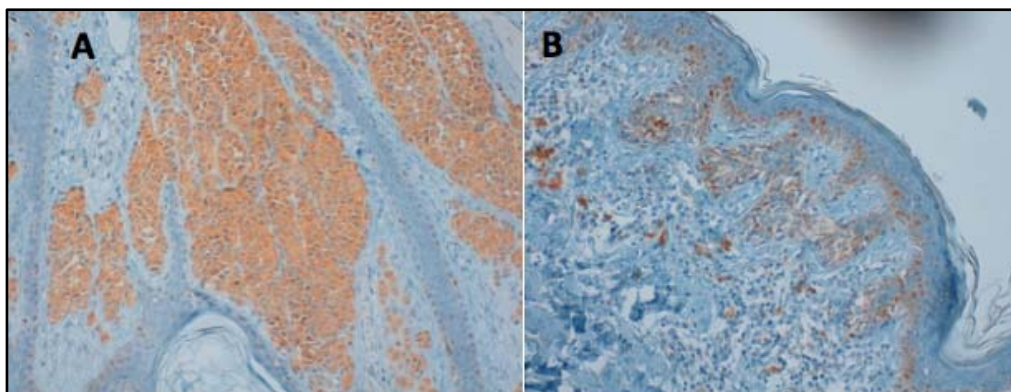
	TOTAL	NMCA	ND
	n=20 (100%)	n=15 (75%)	n=5 (25%)
<b><i>BRAF/V600E</i></b>	11 (55%)	8 (53,3%)	3 (60%)
<b><i>Wild type</i></b>	9 (45%)	7 (46,7%)	2 (40%)

NMCA: nevus melanocítics comuns adquirits, ND: nevus displàsics

**Taula 23. Mutació *BRAF/V600E* determinada per seqüenciació als 4 tipus diferents de nevus adquirits**

	TOTAL	NJ	NC	NI	ND
	n=20 (100%)	n=5 (25%)	n=5 (25%)	n=5 (25%)	n=5 (25%)
<b><i>BRAF/V600E</i></b>	11 (55%)	1 (20%)	2 (40%)	5 (100%)	3 (60%)
<b><i>Wild type</i></b>	9 (45%)	4 (80%)	3 (60%)	0 (0%)	2 (40%)

NJ: nevus junturals, NC nevus compostos, NI nevus intradèrmics, ND nevus displàsics



**Figura 27. Immunoexpressió de *BRAF/V600E* en diferents subtipus histològics.** Cas positiu per *BRAF/V600E* en un nevus intradèrmic (A) i cas negatiu (B) en un nevus displàsic. La pigmentació marró de la imatge B correspon a melanina.

## 2.8.2. Presència de la mutació *BRAF/V600E* determinada per immunohistoquímica mitjançant l'anticòs VE1

### 2.8.2.1. Avaluació immunohistoquímica de la presència o absència de la mutació *BRAF/V600E* als diferents grups histològics de nevus emprant un punt de tall a l'*histoscore*

Utilitzant el punt de tall de 45 respecte a l'*histoscore* de la immunotinció amb l'anticòs VE1 (calculat en l'estudi de sensibilitat i especificitat, apartat 4.1), la presència o absència de la

mutació BRAF/V600E als diferents grups histològics de nevus es pot observar a les **taules 24 i 25**.

Considerant globalment els NMCA, es va observar un percentatge major d'immunopositivitat per BRAF/V600E entre el nevus comuns (60% dels mateixos) que en els nevus displàsics (35%) ( $p=0,046$ ). Si separem els NMCA per grups histològics, de nou la positivitat dels nevus intradèrmics era del 100%, com en l'estudi per seqüenciació. En els nevus compostos era del 55%, també superior que als displàsics, però en el grup de nevus junturals es veia tan sols en el 25% dels mateixos ( $p<0,001$ ).

**Taula 24. Mutació BRAF/V600E determinada per immunohistoquímica als NMCA vs nevus displàsics**

	TOTAL	NMCA	ND	
	n=80 (100%)	n=60 (75%)	n=20 (25%)	Valor p
VE1 (+) >45	43 (53%)	36 (60%)	7 (35%)	0,048
VE1 (-) ≤45	37 (47%)	24 (40%)	13 (65%)	

Taula de contingència analitzant el nombre de casos positius i negatius per VE1 segons el punt de tall de l'*histoscore* (> o ≤45) tenint en compte el tipus de nevus (NMCA vs ND). Es mostren la freqüència (i percentatge). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (prova exacta de Fisher). NMCA: nevus melanocítics comuns adquirits, ND: nevus displàsics.

**Taula 25. Mutació BRAF/V600E determinada per immunohistoquímica als 4 tipus diferents de nevus adquirits**

	TOTAL	NJ	NC	NI	ND	
	n=80 (100%)	n=20 (25%)	n=20 (25%)	n=20 (25%)	n=20 (25%)	Valor p
BRAF (+) >45	43 (53%)	5 (25%)	11 (55%)	20 (100%)	7 (35%)	<0,001
BRAF (-) ≤45	37 (47%)	15 (75%)	9 (45%)	0 (0%)	13 (65%)	

Taula de contingència analitzant el nombre casos positius i negatius per VE1 segons el punt de tall de l'*histoscore* (> o ≤45) tenint en compte el tipus de nevus (NJ vs NC vs NI vs ND). Es mostren la freqüència (i percentatge). S'ha utilitzat la prova exacta de Fisher per analitzar la significança. NJ: nevus junturals, NC nevus compostos, NI nevus intradèrmics, ND nevus displàsics.

### 2.8.2.2. Avaluació immunohistoquímica de la mutació BRAF/V600E als diferents grups histològics i dermatoscòpics mitjançant *histoscore*

Si en comptes d'emprar un punt de tall, s'utilitza l'*histoscore* com una variable contínua, els resultats obtinguts es poden observar a les **taules 26, 27, 28 i 29**.

Com es pot veure a les dos primeres taules, la valoració amb *histoscore* de la immunotinció de BRAF/V600E, encara que va ser menor als nevus displàsics (mitjana 49) que al grup de NMCA (79,67), no va mostrar diferències significatives. Les diferències sí varen ser estadísticament significatives quan es varen comparar els 4 tipus histopatològics de nevus, essent el valor especialment alt als nevus intradèrmics (110,5), mitjà als compostos (81,72), baix als displàsics (54,57) i encara menor als junturals (33), el que concorda amb la positivitats/negativitat mesurada pel punt de tall de l'*histoscore*. Malgrat això, si es compara cada grup de NMCA amb els nevus displàsics, es veu que tan sols hi ha una diferència significativa en front als nevus intradèrmics.

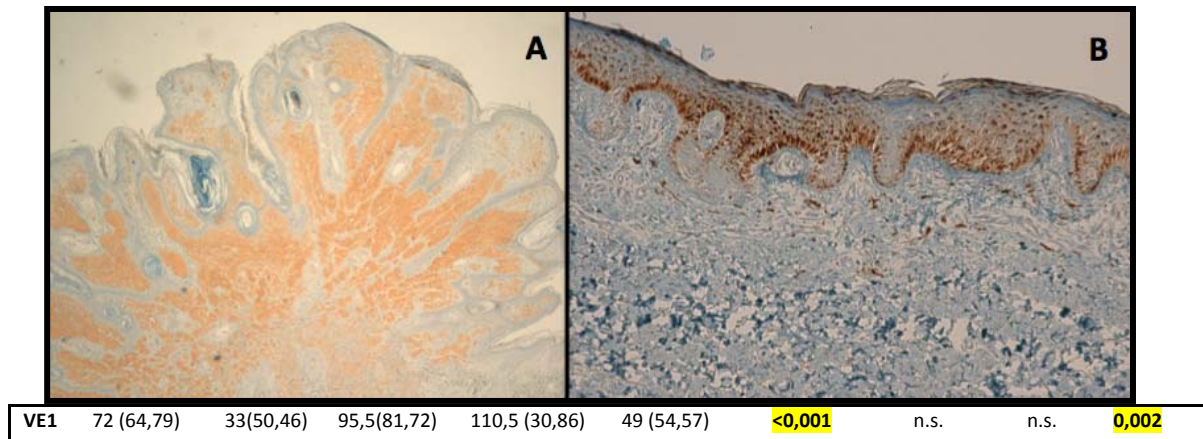
**Taula 26.** *Histoscore* de la immunotinció de BRAF/V600E mitjançant l'anticòs VE1 als NMCA vs nevus displàsics

	TOTAL	NMCA	ND	valor p
	n=80 (100%)	n=60 (75%)	n=20 (25%)	
<b>VE1</b>	72 (64,79)	79,67 (66,5)	49 (54,57)	0,14

Es mostren la mitjana i la desviació estàndard (DE). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (prova de Mann-Whitney). NMCA: nevus melanocítics comuns adquirits, ND: nevus displàsics.

**Taula 27.** *Histoscore* de la immunotinció de BRAF/V600E mitjançant l'anticòs VE1 als 4 grups histològics de nevus adquirits

TOTAL	NJ	NC	NI	ND	Diferències globals		Diferències vs ND	
n=80 (100%)	n=20 (25%)	n=20 (25%)	n=20 (25%)	n=20 (25%)	NJ vs ND	NC vs ND	NI vs ND	



Es mostren la mitjana i la desviació estàndard (DE). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (prova de Kruskal-Wallis amb post-hoc de Bonferroni comparison test). NJ: nevus junturals, NC: nevus compostos, NI: nevus intradèrmics, ND: nevus displàsics. n.s: diferència estadísticament no significativa.

Com es pot veure a les dos següents taules, la valoració amb *histoscore* de la immunotinció de BRAF/V600E als diferents grups dermatoscòpics de nevus va donar diferències globals estadísticament significatives en les dos classificacions. En la classificació per patrons globals, els valors més baixos els varen mostrar els nevus de patró multicomponent (48) i reticular (50,2), mentre que els més alts varen ser els dels nevus de patró globular/en empedrat (102,35) i inespecífic (100) (**figura 28**). En la classificació de I. Zalaudek, el valor més baix de l'*histoscore* el varen mostrar de nou els nevus de patró reticular (42,50), però el més alt el varen mostrar les lesions de patró RC/GP (125), seguides d'aprop per les de patró globular/en empedrat (102,02); les de patró GC/RP varen mostrar un valor mig (61,88).

**Taula 28. Histoscore de la immunotinció de BRAF/V600E mitjançant l'anticòs VE1 als grups dermatoscòpics de nevus adquirits classificats segons els patrons globals**

	Total	Globular/empedrat	Inespecífic	Multicomponent	Reticular	R-G/R-E	Valor p
	n=80 (100%)	n=17 (21,25%)	n=6 (7,5%)	n=15 (18,75%)	n=25 (31,25%)	n=17 (21,25%)	
VE1	72 (64,79)	102,35 (42,06)	100 (28,28)	48 (55,83)	50,2 (73,18)	85 (72,2)	0,02

Es mostren la mitjana i la desviació estàndard (DE). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (prova de Kruskal-Wallis). R-G/R-E: mixt retículo-globular/retículo-empedrat.



**Figura 28. Immunoexpressió de BRAF/V600E en nevus de diferent patró global. A)** Es mostra la positivitat de la immunotinció d'un nevus amb patró globular/en empedrat. **B)** Es mostra la negativitat de la immunotinció d'un nevus amb patró reticular. La pigmentació marró de la imatge B correspon a melanina.

**Taula 29. Histoscore de la immunotinció de BRAF/V600E mitjançant l'anticòs VE1 als grups dermatoscòpics de nevus adquirits classificats segons els patrons de I. Zalaudek**

	Total	Globular/empedrat	GC/RP	Reticular	RC/GP	Valor p
	n=79 (100%)	n=24(30,38%)	n=23(29,11%)	n=26 (32,91%)	n= 6 (7,59%)	
<b>VE1</b>	72,91 (64,69)	102,02 (44,20)	61,88 (63,91)	42,50 (64,02)	125 (62,85)	<b>&lt;0,001</b>

Es mostren la mitjana i la desviació estàndard (DS). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (prova de Kruskal-Wallis). GC/RP: glòbuls o àrea sense estructura marró central i reticle perifèric. RC/GP: reticle o àrea sense estructura marró central i glòbuls perifèrics.

## 2.9. Immunoexpressió diferencial dels biomarcadors estudiats entre els grups de nevus de les diferents classificacions histopatològiques i dermatoscòpiques

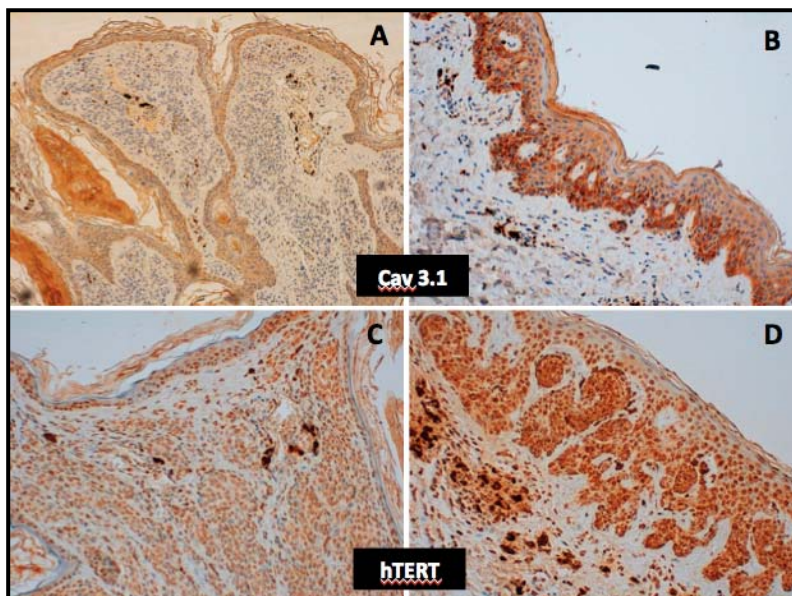
Les diferències d'immunoexpressió dels biomarcadors estudiats en els diferents grups de nevus (marcadors de proliferació: Ki67; de cicle cel·lular: ciclina D1; de senescència induïda per oncogens: p16, pRB i p53; de senescència replicativa: hTERT; PTEN, mutació BRAF/V600E -mitjançant l'anticòs VE1-; isoformes dels canals de calci de tipus T, Cav3.1 i Cav3.2) es poden veure a les **taules 30, 31, 32 i 33**.

Taula 30. Immunoexpressió diferencial dels biomarcadors estudiats entre els grups de NMCA vs nevus displàsic

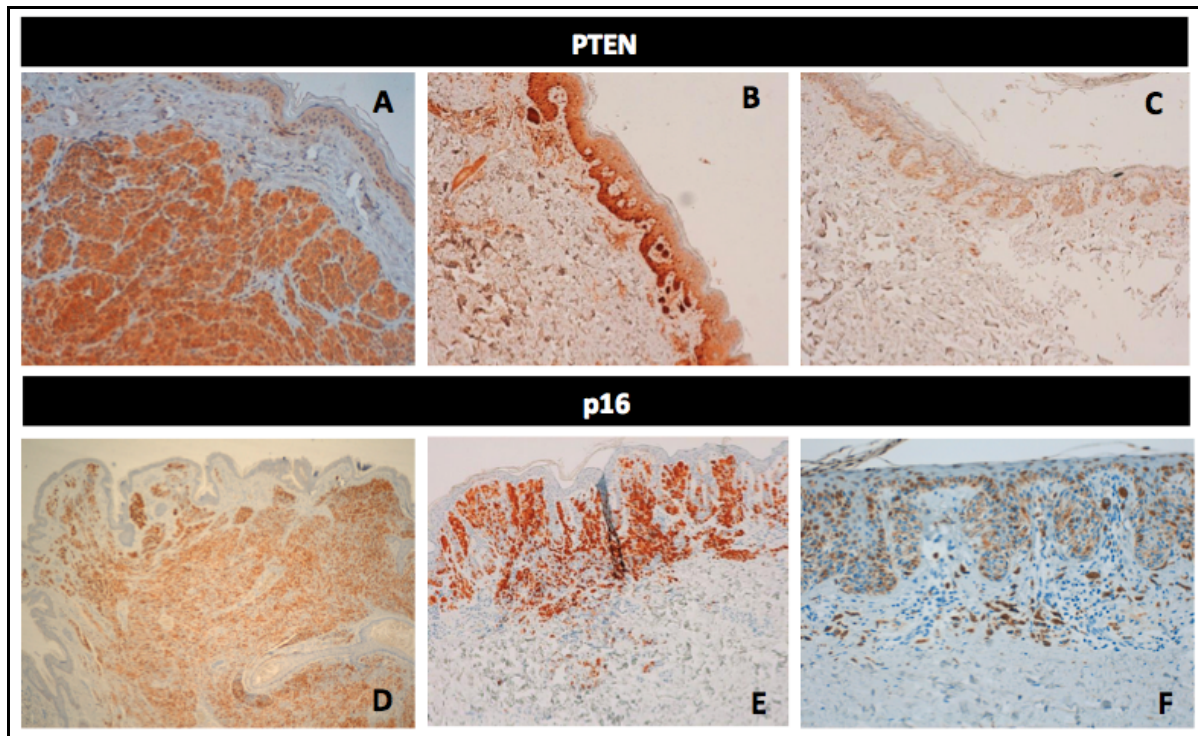
	Tipus histològic nevus (2 subtipus)			Valor p
	Total (n = 80; 100%)	Displàsics (n = 20; 25%)	Comuns (n = 60; 75%)	
Ki67	10,42 (10,75)	13 (13,9)	9,3 (9,02)	0,4
Cicl D1	97,2 (49,52)	87,75 (50,54)	101,3 (49,06)	0,24
p16	116,25 (75,48)	95,5 (72,94)	123,17 (75,63)	0,18
PTEN	169,25 (62,64)	146 (78,43)	177 (55,03)	0,1
pRB	7,56 (19,29)	0,5 (2,24)	9,92 (21,77)	<b>0,007</b>
p53	4,12 (10,15)	1 (2,62)	5,17 (11,46)	0,15
hTERT	188,75 (21,08)	205,5 (20,12)	183,2 (25,94)	<b>&lt;0,001</b>
VE1	72 (64,79)	49 (54,57)	79,67 (66,5)	0,14
Cav3.1	17,75 (25,61)	38,5 (30,66)	10,83 (19,51)	<b>&lt;0,001</b>
Cav3.2	108,5 (46,83)	108 (48,73)	108,67 (46,59)	0,97

Es mostren la mitjana (i desviació estàndard) de l'*histoscore*. La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (Mann-Whitney test).

Com es pot veure a la **taula 30**, si es compara el grup de NMCA vs els nevus displàsics, tan sols s'observen diferències significatives en la immunoexpressió segons *histoscore* de pRB (retinoblastoma), que és menor als nevus displàsics, i hTERT (telomerasa) i Cav.3.1, que és major als nevus displàsics. Encara que l'expressió dels supressors de tumors p16, PTEN i p53 és menor als nevus displàsics, la diferència no és estadísticament significativa (**figures 29 i 30**).



**Figura 29. Immunoexpressió de Cav 3.1 i hTERT. A)** Negativitat per Cav3.1 en nevus intradèrmic. **B)** Positivitat per Cav3.1 en nevus displàsic. **C)** Presència de moderada tinció citoplasmàtica i poc nuclear d'hTERT en un nevus intradèrmic. **D)** Tinció molt intensa tant nuclear com citoplasmàtica d'hTERT en un nevus displàsic.



**Figura 30. Immunoexpressió de PTEN i p16. A i D) Nevus intradèrmic.** S’observa positivitat intensa per PTEN i per p16. **B i E) Nevus compost.** S’observa positivitat per PTEN i p16. **C i F) Nevus displàsic.** S’observa negativitat per ambdues tincions. La pigmentació marró de les imatges C i F correspon a melanina.

**Taula 31. Immunoexpressió diferencial dels biomarcadors estudiats entre els 4 grups histopatològics de nevus adquirits**

	Tipus histològic nevus (4 subtipus)					Diferències globals 4 grups (Tots els subtipus)	Diferències vs grup nevus displàsic		
	Total n = 80 (100%)	Displàsic n = 20 (25%)	Compost n = 20 (25%)	Intradèrmic n = 20 (25%)	Juntural n = 20 (25%)		NC vs ND	NI vs ND	NJ vs ND
<b>Ki67</b>	10,42 (10,75)	13 (13,9)	13,15 (9,05)	3,25 (4,67)	16,67 (8,16)	<0,001	n.s	<b>0,0009</b>	n.s
<b>Cicl D1</b>	97,2 (49,52)	87,75 (50,54)	110 (45,19)	93 (50,48)	100 (60,33)	0,47	-	-	-
<b>p16</b>	116,25 (75,48)	95,5 (72,94)	129,5 (61,94)	168 (69,91)	72 (64,2)	<0,001	n.s	<b>0,006</b>	n.s
<b>PTEN</b>	169,25 (62,64)	146 (78,43)	171,5 (50,29)	192,5 (42,16)	167 (68,6)	0,19	-	-	-
<b>pRB</b>	7,56 (19,29)	0,5 (2,24)	16,5 (30,53)	0,25 (1,12)	13 (19,63)	<0,001	<b>0,003</b>	n.s	<b>&lt;0,001</b>
<b>p53</b>	4,12 (10,15)	1 (2,62)	14 (16,35)	1,5 (4,01)	-	<0,001	<b>&lt;0,001</b>	n.s	n.s
<b>hTERT</b>	188,75 (21,08)	205,5 (20,12)	183,5 (29,43)	167,5 (20,74)	198,5 (16,94)	<0,001	n.s	<b>&lt;0,001</b>	n.s
<b>VE1</b>	72 (64,79)	49 (54,57)	95,5 (81,72)	110,5 (30,86)	33 (50,46)	<0,001	n.s	<b>0,002</b>	n.s
<b>Cav3.1</b>	17,75 (25,61)	38,5 (30,66)	18,5 (30,14)	3 (5,71)	11 (10,71)	<0,001	<b>0,007</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>0,001</b>
<b>Cav3.2</b>	108,5 (46,83)	108 (48,73)	105 (58,26)	117 (30,11)	104 (48,28)	0,93	-	-	-

Es mostren la mitjana (i desviació estàndard). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (prova Mann-Whitney o prova Kruskal-Wallis, segons el més convenient).

Com s'observa a la **taula 31** si es comparen globalment els 4 grups de nevus melanocítics adquirits, les diferències significatives afecten a l'*histoscore* de molts més biomarcadors (Ki67, p16, pRB, p53, hTERT, VE1 i Cav3.1). Al comparar cada subgrup de NMCA amb els nevus displàsics, veiem que les diferències significatives observades es deuen especialment a diferències entre els nevus displàsics i intradèrmics (que no afecten als altres dos grups de NMCA) respecte als següents biomarcadors: l'expressió de Ki67 i hTERT és més alta als nevus displàsics, mentre que l'expressió de p16 i, com ja hem comentat, BRAF/V600E (VE1) és més baixa als displàsics. En el cas de pRB, també està infraexpressat als nevus displàsics però en front dels junturals i compostos. p53 està infraexpressat als nevus displàsics al comparar-los amb els de patró compost. Finalment, l'expressió de la isoforma Cav3.1 dels canals de calci tipus T és més alta als nevus displàsics respecte al tres tipus de NMCA.

**Taula 32. Immunoexpressió diferencial dels biomarcadors estudiats entre els grups dermatoscòpics de nevus classificats pel seu patró global**

Patró dermatoscòpic global							
	Total n = 80 (100%)	Globular/ empedrat n = 17 (21,25%)	Inespecífic n = 6 (7,5%)	Multi- component n = 15 (18,75%)	Reticular n = 25 (31,25%)	R-G/R-E n = 17 (21,25%)	Valor p
<b>Ki67</b>	10,42 (10,75)	5,35 (6,24)	1,67 (2,58)	13,46 (12,14)	15 (12,62)	12,08 (9,72)	<b>0,001</b>
<b>Cicl D1</b>	97,2 (49,52)	112,94 (48,19)	58,33 (40,7)	95,38 (61,46)	95,88 (41,54)	98,08 (48,03)	0,23
<b>p16</b>	116,25 (75,48)	152,35 (70,11)	196,67 (68,31)	82 (61,09)	84,4 (65,13)	128,82 (73,9)	<b>0,002</b>
<b>PTEN</b>	169,25 (62,64)	200 (34,64)	171,67 (47,5)	124 (84,33)	166,8 (52,66)	181,18 (63,23)	<b>0,03</b>
<b>pRB</b>	7,56 (19,29)	3,53 (14,55)	0,83 (2,04)	8,33 (20,85)	11 (25,21)	8,24 (15,41)	0,14
<b>p53</b>	4,12 (10,15)	2,65 (5,62)	2,5 (6,12)	1,67 (3,62)	5 (12,58)	7,06 (14,04)	0,89
<b>hTERT</b>	188,75 (21,08)	164,7 (22,39)	170,0 (17,89)	190,7 (19,07)	201,6 (23,40)	198,8 (23,95)	<b>&lt;0,001</b>
<b>VE1</b>	72 (64,79)	102,35 (42,06)	100 (28,28)	48 (55,83)	50,2 (73,18)	85 (72,2)	<b>0,02</b>
<b>Cav3.1</b>	17,75 (25,61)	2,35 (5,62)	6,67 (8,16)	27,33 (28,9)	25,6 (30,29)	17,06 (24,43)	<b>0,001</b>
<b>Cav3.2</b>	108,5 (46,83)	121,76 (37,79)	101,67 (33,71)	102,67 (56,5)	109,6 (37,8)	101,18 (61,73)	0,78

Es mostren la mitjana (i desviació estàndard). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (prova Kruskal-Wallis). R-G/R-E: retículo-globular/reticular-empedrat

A la **taula 32** es poden veure les diferències estadísticament significatives en la immunoexpressió dels biomarcadors quan es comparen de forma global els 5 grups de nevus classificats segons el patró global de l'anàlisi de patrons. Els *histoscores* de Ki67 i hTERT són

especialment alts al patró reticular, seguits d'aprop pel patró multicomponent, mentre que són baixos als nevus de patró globular/en empedrat i inespecífic. La immunoexpressió de p16 i PTEN és especialment baixa als nevus de patró multicomponent, seguits del patró reticular, essent més alta a la resta de patrons. Com ja s'ha comentat a l'apartat 8.1.2, els valors més baixos de l'*histoscore* per BRAF/V600E (VE1) els varen mostrar els nevus de patró multicomponent i reticular, mentre que els més alts varen ser els dels nevus de patró globular/en empedrat i inespecífic. Per acabar, els nevus de patró multicomponent són els que varen mostrar nivells més alts de Cav3.1, especialment al comparar-los amb els de patró globular/en empedrat i inespecífic.

**Taula 33. Immunoexpressió diferencial dels biomarcadors estudiats entre els grups dermatoscòpics de nevus classificats segons els patrons definits per I. Zalaudek**

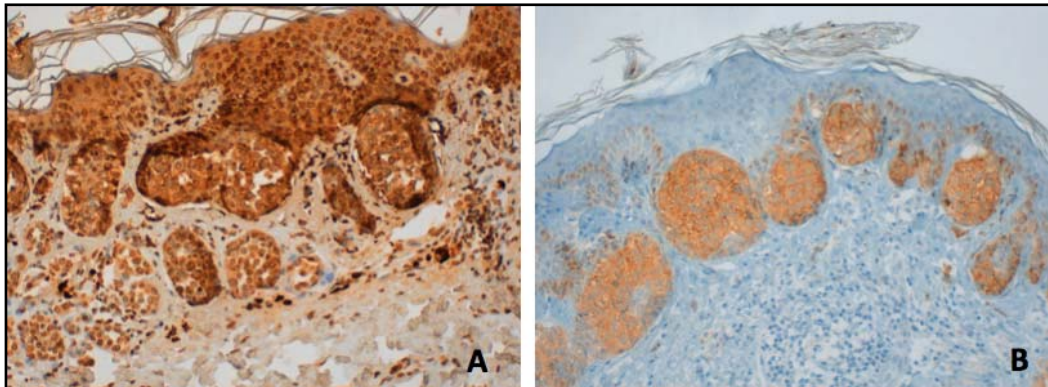
Patró dermatoscòpic Zalaudek						
	Total n = 79 (100%)	Globular/empedrat n = 24 (30,38%)	GC/RP n = 23 (29,11%)	Reticular n = 26 (32,91%)	RC/GP n = 6 (7,59%)	Valor p
Ki67	10,43 (10,84)	5,88 (9,17)	12,94 (11,05)	13,16 (11,93)	13,4 (8,38)	0,006
Cicl D1	97,62 (49,79)	101,3 (52,03)	104,1 (47,44)	77,63 (43,35)	134 (53,2)	0,14
p16	116,58 (75,9)	160,4 (71,46)	105,2 (81,62)	86,92 (64,73)	113,33 (41,31)	0,011
PTEN	170,63 (61,8)	192,1 (38,56)	152,6 (76,23)	158,8 (58,4)	205 (65,35)	0,11
pRB	7,66 (19,4)	7,7 (26,86)	10,65 (20,30)	5,96 (10,86)	3,33 (8,16)	0,2
p53	4,18 (10,2)	5,0 (12,94)	5,0 (11,18)	2,5 (5,15)	5 (12,25)	0,91
hTERT	188,75 (21,08)	165,8 (21,04)	194,8 (22,74)	201,5 (22,92)	201,7 (17,22)	<0,001
VE1	72,91 (64,69)	106,3 (43,52)	58,91 (63,64)	42,50 (64,02)	125 (62,85)	<0,001
Cav3.1	17,59 (25,73)	4,17 (7,17)	14,78 (22,54)	27,69 (31,54)	38,33 (30,61)	<0,001
Cav3.2	119,62 (46,03)	117,5 (36,62)	90,87 (58,54)	111,9 (38,89)	140 (34,64)	0,12

Es mostren la mitjana (i desviació estàndard). La significació de les diferències es va avaluar amb proves no paramètriques (prova Kruskal-Wallis).

Tenint en compte la classificació de patrons dermatoscòpics segons I. Zalaudek (**taula 33**), al comparar globalment els 4 grups, podem veure les següents diferències: tant els *histoscores* de Ki67, com hTERT, com BRAF/V600E (VE1), com Cav3.1 són especialment alts als nevus de patró RC/GP; en el cas de Ki67, hTERT i Cav3.1 seguits d'aprop pels nevus de patró reticular, però, en el cas de BRAF/V600E (VE1), seguits pels nevus de patró globular/en empedrat.



Finalment p16 és forçament immunoexpressat pels nevus de patró globular/en empedrat i poc pels de patró reticular (**figura 31**).



**Figura 31.** Tincions immunohistoquímiques de nevus amb patró RC/GP (reticle central/glòbuls perifèrics). S'observa positivitat intensa per hTERT (A) i BRAF/V600E (VE1) (B)

### **TREBALL 3: Fenomen d'autoinvolució**

#### **3.1. Estudi descriptiu segons imatges de SIAscòpia del fenomen d'autoinvolució en pacients amb síndrome del nevus amb atípia clínica que es trobaven sota seguiment digital en aquest sistema**

##### **3.1.1. Recompte de pacients i nevus inclosos a l'estudi**

El número total de pacients enregistrats al sistema de SIAscòpia des d'abril del 2007 fins juliol del 2014 va ser de 119. Es van excloure: 1 pacient amb nevus congènit gegant, 19 pacients seguits amb mapes regionals, 12 pacients que varen abandonar el seguiment digital (excepte 1 pacient que en aquell moment portava més de 8 anys de seguiment) i 14 pacients amb seguiment inferior a 3 anys. El número total de pacients amb mapes corporals totals avaluats va ser doncs, de 74.

El número total de nevus total registrats va ser 783. La mitjana de nevus registrats per pacient va ser de 10,35 amb una desviació estàndard de 4,23. La mediana va ser de 9 lesions per pacient amb un rang de 4-25.

La mitjana d'edat dels pacients era de 48,1 anys en el moment de la recollida de dades amb una desviació estàndard de 11,85 i una mediana de 46 anys (rang de 27-78 anys). La proporció d'homes i dones va ser del 68% i 32% respectivament.

##### **3.1.2. Recompte de pacients amb nevus en regressió**

El número de pacients amb nevus en regressió va ser 60 (81% del total de pacients). El número total de nevus en regressió va ser de 198 (25% del total de nevus enregistrats en el sistema). La mitjana de nevus en regressió per pacient va ser de 3,3 amb una desviació

estàndard de 1,84. La mediana va ser 3 amb un rang de 1-8. En 12 dels 60 pacients hi havia una única lesió en regressió.

La mitjana d'edat dels pacients que presentaven nevus en regressió va ser de 47,7 anys amb una desviació estàndard de 11,5 i una mediana de 46 amb un rang de 27 a 78 anys. La proporció d'homes i dones va ser del 63 i 37% respectivament. L'edat mitjana a l'inici de la regressió de les lesions va ser de 42,7 anys amb una desviació estàndard de 11,4 i una mediana de 40 amb un rang de 21-76 anys.

Dels nevus amb fenòmens de regressió inclosos a l'estudi, es van extirpar 3 lesions per sospita de malignització. D'aquests 3 nevus extirpats, un va ser un melanoma *in situ* sobre nevus displàsic, un altre un nevus displàsic i el tercer un nevus compost amb canvis regressius.

### **3.1.3. Característiques constitucionals de pigmentació, antecedents de càncer cutani, història d'exposició solar, cremades solars i hàbits de fotoprotecció dels pacients inclosos a l'estudi amb nevus en regressió**

La distribució dels pacients amb nevus en regressió per fototipus va ser la següent: 7 pacients presentaven fototipus 1 (11,7%), 39 pacients fototipus 2 (65%), 10 pacients fototipus 3 (16,7%) i 4 pacients fototipus 4 (6,7%). 42 pacients tenien el cabell de color castany (70%), 8 negre (13,3%), 9 ros (15%) i 1 pèl-roig (1,7%). El color dels ulls va ser clar en 27 pacients (45%) i fosc en 33 (55%).

Un 21,1% dels pacients tenia antecedents personals de melanoma i un 8,8% antecedents personals de càncer cutani no melanoma. El 71,2% dels pacients tenien algun familiar amb síndrome del nevus amb atípia clínica i un 15,8% tenia antecedents familiars de melanoma. Cap pertanyia a una família amb melanoma familiar.

Del total de pacients, un 47,5% referia haver presentat una exposició solar intensa durant la infància i un 29,8% durant l'edat adulta. En relació a la radiació ultraviolada artificial, un 15,8% dels pacients reconeixia haver estat exposat de manera ocasional. Un 41,1% referien



haver-se cremat entre 1-5 vegades durant la seva infància, un 10,7% entre 6 i 10 vegades i un 9% més de 10 vegades. Un 39,3% dels pacients negaven haver patit cremades durant la seva infància. En relació a les cremades a l'edat adulta, un 40,4% referien haver-se cremat de 1-5 vegades, un 3,5% entre 6-10 i un 3,5% referien haver-se cremat >10 vegades. Un 50,6% dels pacients inclosos negaven haver presentat episodis de cremades durant l'edat adulta.

Pel que fa a l'ús de fotoprotector, només un 3,5% referien haver fet una protecció amb pantalla total i FPS50, tant durant la seva infància com d'adults, i un altre 3,5% referien haver utilitzat fotoprotector amb FPS>30 durant aquestes 2 etapes de la vida. Un 57,9% dels casos referien haver fet una mala o nul·la fotoprotecció durant la infància, encara que utilitzaven un fotoprotector amb FPS>30 durant l'edat adulta. Un 19,3% dels pacients referien haver fet una mala o nul·la fotoprotecció durant la infància i usar un FPS<30 durant l'edat adulta. Per últim, un 15,8% dels pacients referien no utilitzar fotoprotector ni durant la infància ni durant l'edat adulta.

#### **3.1.4. Distribució regional dels nevus en regressió**

La distribució regional dels 198 nevus en regressió va ser la següent: 67 a esquena superior, 35 a tòrax, 33 a abdomen, 28 a esquena inferior, 23 a les cames, 6 als braços, 5 a les natges i 1 nevus a cap i coll.

#### **3.1.5. Temps de regressió**

El temps mig de regressió des del primer control fins a la finalització de l'estudi dels nevus va ser de 46,7 mesos amb una desviació estàndard de 20,2 i una mediana de 47 amb un rang de 6-84 mesos.

En un 74,2% dels casos, els nevus presentaven fenomen de regressió en la primera imatge del seguiment. El 95,9% dels nevus encara presentaven signes de regressió a l'últim control registrat (any 2014 o 2n semestre del 2013).

En 5 nevus es va observar una regressió completa amb un temps mig de 16 mesos, una desviació estàndard de 8,8, una mediana de 17 i un rang de 6 a 27 mesos.

Si separem els temps de despigmentació entre els dos tipus de despigmentació que vam considerar (homogènia i heterogènia), vam veure com els nevus que van presentar una despigmentació homogènia van fer-ho amb una mitja de 50,2 mesos amb una desviació estàndard de 18,6 i una mediana de 50 amb un rang de 8 a 83. En el cas de la despigmentació heterogènia, la mitjana va ser de 43,9 mesos amb una desviació estàndard de 20,9 i una mediana de 45 amb un rang de 6 a 84.

### **3.1.6. Característiques dermatoscòpiques (veure taula 34)**

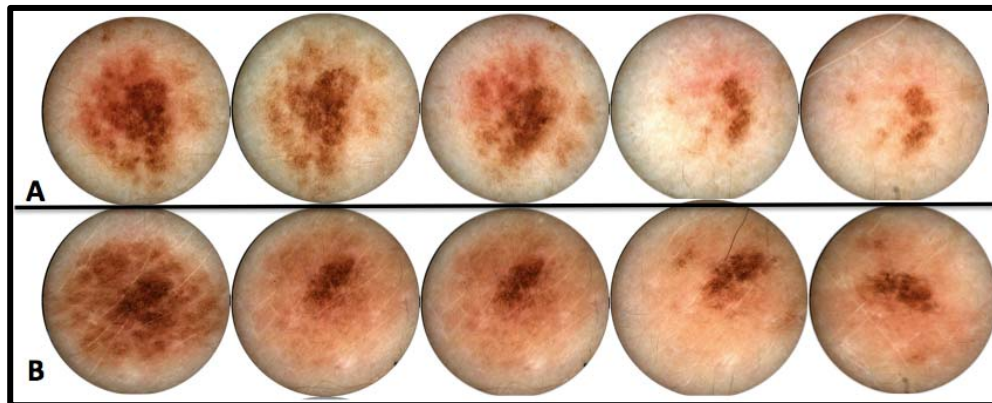
#### *Patró estructural global*

El patró estructural predominant observat en dermatoscòpia va ser per aquest ordre de freqüència: patró reticular (78,3%), patró retículo-globular (18%), patró globular/en empedrat (7,6%) i altres (1%).

El patró retículo-globular es va classificar en patró amb glòbuls centrals i reticle perifèric (5,6% del total de casos), patró amb reticle central i glòbuls perifèrics (4% del total de casos) i patró retículo-globular que no es podia englobar en cap de les descripcions anteriors (3,5% dels casos).

#### *Característiques de la despigmentació*

En un 49,5% dels casos es va observar una despigmentació de tipus homogeni i en un 50,5% dels casos una despigmentació de tipus heterogeni (**figura 32**). En els nevus que van presentar regressió completa sobtada (6 mesos) entre dos controls no es va poder valorar aquesta característica (2 nevus).



**Figura 32. Tipus de despigmentació. A) Heterogènia. B) Homogènia**

En relació al percentatge de despigmentació observada al final de l'estudi, un 44,4% dels nevus va presentar una despigmentació inferior o igual al 10% respecte al primer control. En un 82,3% dels casos la despigmentació va ser inferior o igual al 50% respecte al primer control. Només en un 3,1% dels nevus la despigmentació va ser quasi completa en el darrer control (>90%).

#### Presència d'estructures de regressió

Es va observar la presència de punts blau-grisos en 24 nevus (12,1%).

El fenomen de l'halo només va ser present en 3 casos (1,5%). D'aquests 3 casos, en una de les lesions es va observar una regressió completa, en la segona de més del 95% i en la tercera del 50%, durant o al final de l'estudi.

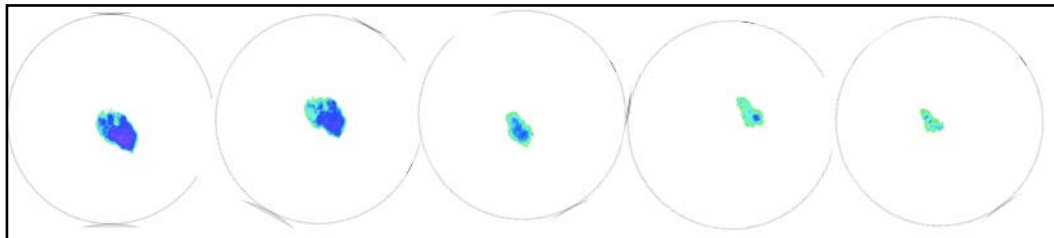
La presència de fibrosi va observar-se en 16 nevus del total (8,1%).

Es van observar estructures vasculars en 67 dels nevus (33,8%).

Disminució de la melanina total i melanina dèrmica en els siagràfics

Es va observar una disminució progressiva de la melanina total en 156 nevus (78,8%).

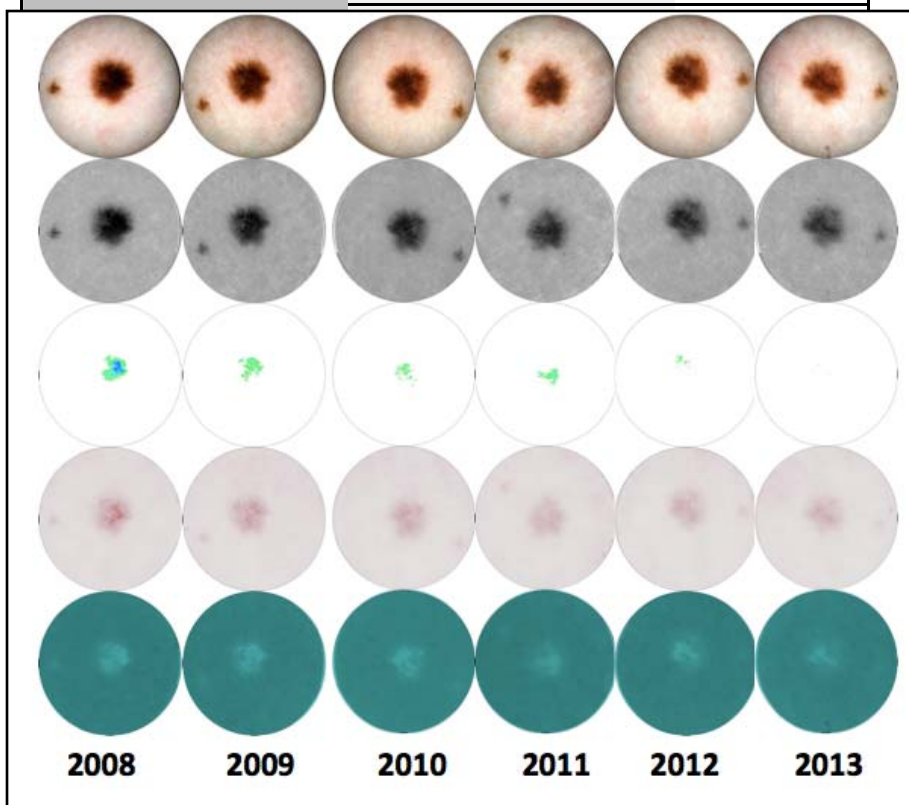
En 55 nevus es va detectar la presència de melanina dèrmica en el siagràfic inicial (27,8%). En els nevus en què es va detectar la presència de melanina dèrmica, en 24 aquesta havia desaparegut totalment al final de l'estudi i en 1 cas va augmentar. Respecte a la profunditat de la melanina dèrmica, en 22 dels casos la imatge dels siagràfics no va canviar de color, en 4 casos va canviar de color verd a blau clar i blau fosc (de més superficial a més profunda), i en 2 casos a la inversa (de més profunda a més superficial) (**figura 33**); 1 de blau fosc a blau clar i verd i 1 de blau fosc i clar a verd. En cap cas, es va observar melanina dèrmica en capes molt profundes (colors lila i vermell).



**Figura 33. Canvi de pigmentació de la melanina dèrmica.** S'observa un canvi del color de la melanina de color blau fosc a verd, és a dir, de melanina més profunda a més superficial.

Taula 34. Recull de les principals característiques dermatoscòpiques dels nevus en autoinvolució

Característiques dermatoscòpiques	Percentatge	
<b>Patró estructural global</b>	Patró reticular	<b>78,3%</b>
	Patró retículo-globular	<b>18%</b>
	Patró globular/en empedrat	<b>7,6%</b>
	Altres	<b>1%</b>
<b>Despigmentació</b>	Homogènia	<b>49,5%</b>
	Heterogènia	<b>50,5%</b>
<b>% despigmentació</b>	<10%	<b>44,4%</b>
	<50%	<b>82,3%</b>
	>90%	<b>3,1%</b>
<b>Estructures de regressió</b>	Punts blaus-grisos	<b>12,1%</b>
	Halo	<b>1,5%</b>
	Fibrosi	<b>8,1%</b>



**Figura 34. Exemple de siagràfics d'un nevus en autoinvolució.** Es pot observar una pèrdua de la melanina total molt gradual (segona filera) i una pèrdua total de la melanina dèrmica (tercera filera).

### **3.2. Estudi descriptiu de les característiques dermatoscòpiques, estudi histopatològic i immunohistoquímic dels nevus en autoinvolució**

#### **3.2.1. Subtipus histològics**

Dels 14 casos de nevus en autoinvolució, que varen ser extirpats per estudi histològic i immunohistoquímic, la distribució segons el tipus histològic va ser la següent: 3 nevus junturals, 10 nevus compostos i 1 nevus intradèrmic.

La distribució dels 11 casos controls, seleccionats a l'atzar, va ser: 1 nevus juntural, 5 nevus compostos i 5 nevus displàsics.

#### **3.2.2. Valoració semiquantitativa (0-3) i descriptiva de les característiques histològiques**

Els resultats de la valoració semiquantitativa i descriptiva de les característiques histològiques es poden veure a la **taula 35**.

##### **3.2.2.1. Quantitat de nevus restant**

En els casos, la valoració semiquantitativa de la quantitat de nevus restant va mostrar una mitjana de 1,93 amb una desviació estàndard de 0,7 i una mediana de 2,5 amb un rang de 0 a 3. En els controls, la mitjana de la quantitat de nevus restant va ser de 2,82 amb una desviació estàndard de 0,40 i una mediana de 3 amb un rang de 2 a 3.

##### **3.2.2.2. Infiltrat inflamatori**

Pel que fa a l'infiltrat inflamatori, la mitjana de la puntuació semiquantitativa en els casos va ser de 0,89 amb una desviació estàndard de 0,45 i una mediana de 1 amb un rang de 0,5 a 2. En els controls, la mitjana va ser de 1,91 amb una desviació estàndard de 0,94 i una mediana de 2 amb un rang de 1 a 3.

Si calculem la mitjana de la quantitat d'infiltrat inflamatori dins el grup control dividint el grup en nevus comuns i displàsics respectivament, les mitjanes obtingudes van ser 1,5 i 2,4 respectivament.

En relació a la distribució d'aquest infiltrat, en el 92,9% dels casos aquest es va distribuir de manera parxejada i en un 7,1% dels casos, de manera continua. En el grup control, en el 27,3% dels nevus controls l'infiltrat es va distribuir de manera parxejada, en el 27,3% de manera continua i en el 45,5% dels casos només de manera focal.

### **3.2.2.3. Melanofàgia**

La puntuació semiquantitativa de la quantitat de melanofàgia en els casos va resultar de 0,79 de mitjana, amb una desviació estàndard de 0,96 i una mediana de 0,5 amb un rang de 0 a 3. En els controls, la mitjana va ser de 1,1 amb una desviació estàndard de 0,54 i una mediana de 1 amb un rang de 0 a 2.

La distribució de la melanofàgia, en els casos, es distribuïa de la següent manera: en els casos: en el 21,4% era focal, en el 14,3% casos parxejada, el 21,4% continua i en el 42,9% casos era absent. En els controls: el 18,2% era focal, en el 54,5% dels casos parxejada, el 18,2% continua i en el 9,1% dels casos era absent.

### **3.2.2.4. Fibrosi**

La mitjana de la quantitat de fibrosi en els casos va ser de 1,29 amb una desviació estàndard de 0,51 i una mediana de 1 amb un rang de 0,5 a 2. En els controls la mitjana va ser de 1,18 amb una desviació estàndard de 0,40 i una mediana de 1 amb un rang de 1 a 2.

En el 85,7% dels casos es va detectar una fibrosi laminar, també en el 85,7% hi havia fibrosi delicada i en un 7,1% dels casos clarament compacta. En el 28,6% dels casos es va observar fibrosi compacta de manera focal. En el 36,4% dels controls es va observar fibrosi laminar, en el 81,8% delicada i en cap nevus control la fibrosi era compacta.

En el 85,7% dels casos i en el 72,7% dels controls es va observar accentuació subepidèrmica.

### **3.2.2.5. Cèl·lules apoptòtiques**

No es va observar la presència de cèl·lules apoptòtiques ni en els casos ni en els controls però en 3 dels casos sí que es va veure una necrosi focal de queratinòcits.



### 3.2.2.6. Atròfia epidèrmica

En el 50% dels casos i en el 36,4% dels nevus control hi havia atròfia epidèrmica.

### 3.2.2.7. Augment de vasos

En relació a l'augment de vasos, la mitjana de la seva valoració semiquantitativa en els casos va ser de 1,29 amb una desviació estàndard de 0,47 i una mediana de 1 amb un rang de 1 a 2. En els controls, la mitjana va ser de 0,82 amb una desviació estàndard de 0,60 i una mediana de 1 amb un rang de 0 a 2.

Taula 35. Resum de les característiques histològiques més significatives

	CASOS	CONTROLS	Valor p
<b>Q nevus</b>	1,93 (0,7)	2,82 (0,40)	
<b>Q infiltrat inflamatori</b>	0,89 (0,44)	1,91 (0,94)	<b>0,0038</b>
Parxejat	13 (92,9%)	3 (27,3%)	
Continu	1 (7,1%)	3 (27,3%)	
Focal	0 (0%)	5 (45,5%)	
Absent	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Q melanofàgia</b>	0,79 (0,96)	1,1 (0,54)	0,1389
Parxejada	2 (14,3%)	6 (54,5%)	
Continu	3 (21,4%)	2 (18,2%)	
Focal	3 (21,4%)	2 (18,2%)	
Absent	6 (42,9%)	1 (9,1%)	
<b>Q fibrosi</b>	1,29 (0,51)	1,18 (0,40)	0,6167
Delicada	12 (85,7%)	9 (81,8%)	0,6043
Laminar	12 (85,7%)	4 (36,4%)	<b>0,0159</b>
Compacta	5 (35,7%)	0 (0%)	<b>0,0377</b>
Accentuació subepidèrmica	12 (85,7%)	9 (72,7%)	0,3783
<b>Cèl·lules apoptòtiques</b>	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Atròfia epidèrmica</b>	7 (50%)	4 (36,4%)	0,3925
<b>Augment de vasos</b>	1,29 (0,47)	0,82 (0,60)	<b>0,0497</b>

Es mostren la mitjana i desviació estàndard o la freqüència absoluta i percentatge segons el més convenient.

En negreta i remarcat es senyalen els valors significatius. Q: quantitat.

### 3.2.3. Valoració semiquantitativa dels diferents marcadors immunohistoquímics

Els resultats de la valoració de la immunoexpressió (percentatge o *histoscore*) dels marcadors immunohistoquímics estudiats es pot veure a la **taula 36**.

La mitjana dels percentatges i dels *histoscores* i la seva desviació estàndard calculada per cadascú dels marcadors estudiats va ser la següent en els casos: CD3: 59,55 (15,72), CD4: 60,45 (17,53), CD8: 28,64 (14,33), TIA1: 9 (8,1), FoxP3: 7,73 (7,54), CD123: 3,5 (7,78), PD1: 15,56 (12,36), Granzima B: 2,73 (2,61), Caspasa 3 activada: 72 (60,15), BRAF: 44,55 (64,24).

En els controls: CD3: 50,71 (17,85), CD4: 47,86 (13,26), CD8: 19,29 (16,04), TIA1: 5,36 (6,92), FoxP3: 7,5 (8,26), CD123: 0,71 (1,82), PD1: 15,71 (10,72), Granzima B: 3,21 (2,49), Caspasa 3 activada: 24,29 (25,93), BRAF: 67,21 (64,12).

**(figures 36, 37, 38 i 39)**

Cal destacar que la immunoexpressió de caspasa 3 va ser citoplasmàtica en tots els casos.

En tots els casos va existir un predomini de cèl·lules CD4 positives respecte a les CD8 positives (**figura 35**). La mitjana del percentatge de cèl·lules CD8 positives dividint el grup control en nevus displàsics i nevus comuns, va ser del 33% i del 25% respectivament.

Al calcular la *ratio* CD123/TIA1 en els casos es va obtenir una mitjana de 0,13 amb un desviació estàndard de 0,33 i una mediana de 0 amb un rang de 0 a 1. En els controls, la mitjana va ser de 0,79 amb una desviació estàndard de 1,86 i una mediana de 0 amb una *ratio* de 0 a 5.

Taula 36. Estudi dels biomarcadors relacionats amb involució en casos i controls

BIOMARCADORS	CONTROLS				CASOS				Valor $p$
	Mitjana	DE	Min	Màx	Mitjana	DE	Min	Màx	
CD3	59,55	15,72	45	85	50,71	17,85	25	75	0,15
CD4	60,45	17,53	45	85	47,86	13,26	35	75	0,06
CD8	28,64	14,33	5	55	19,29	16,04	5	65	0,07
TIA1	9	8,1	0	25	5,36	6,92	0	25	0,22
FoxP3	7,73	7,54	0	25	7,5	8,26	0	25	0,83
CD123	3,5	7,84	0	25	0,71	1,82	0	5	0,34
PD1	15,56	12,36	0	35	15,71	10,72	5	45	1,0
Granzima B	2,73	2,61	0	5	3,21	2,49	0	5	0,65
Casp 3 Activa	72	60,15	0	170	24,29	25,93	0	70	<b>0,03</b>
BRAF	44,55	64,24	0	150	67,21	67,12	0	200	0,37

En les diferents columnes es mostren els valors de la mitjana, desviació estàndard, el valor mínim i el màxim. A més es va realitzar un anàlisi estadístic mitjançant el test no paramètric Mann-Whitney per avaluar les diferències entre els biomarcadors en ambdós grups. En negreta i remarcats es senyalen els valors significatius.

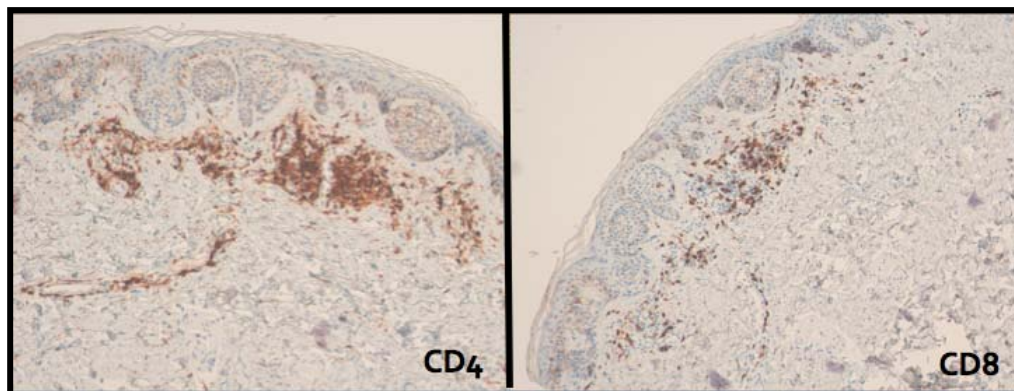
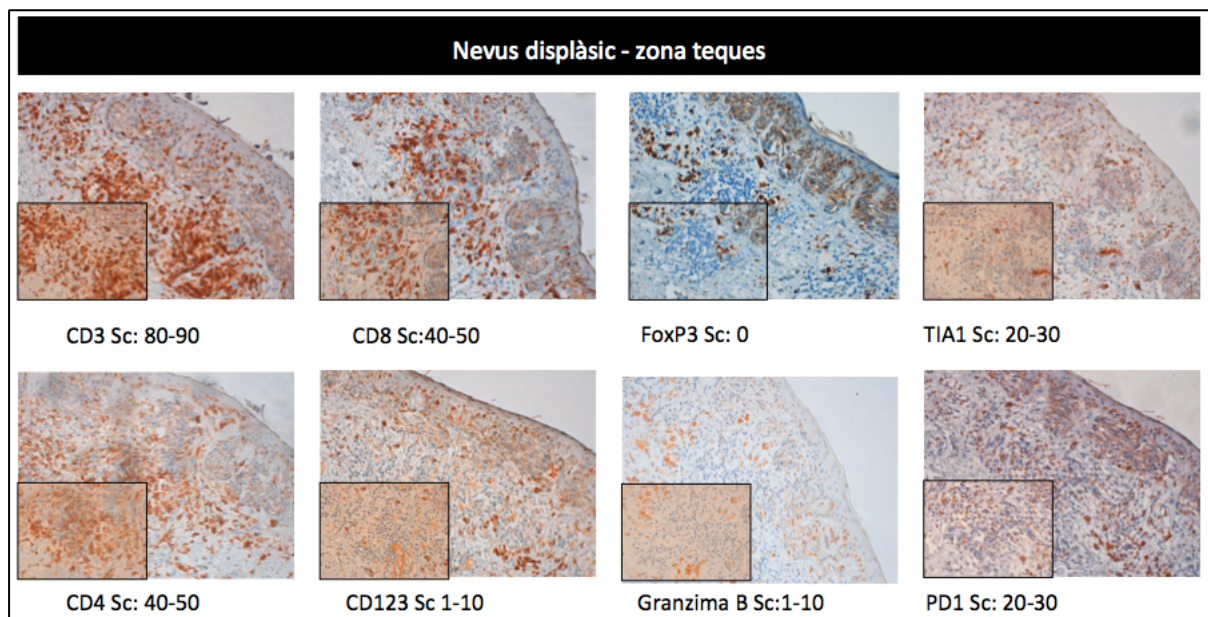
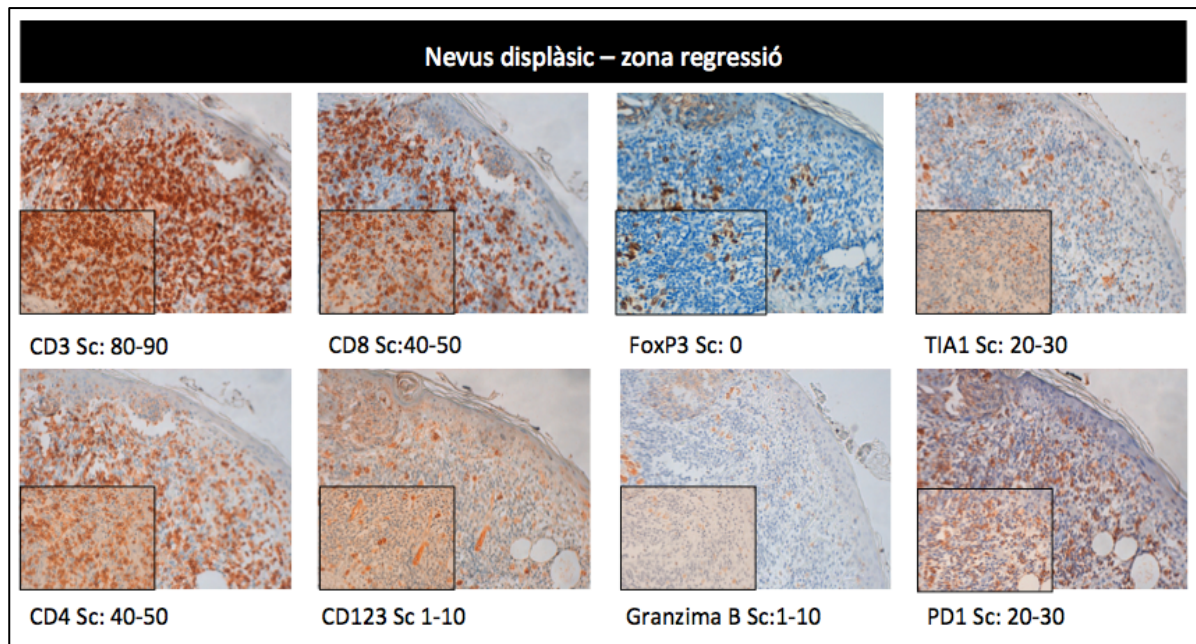
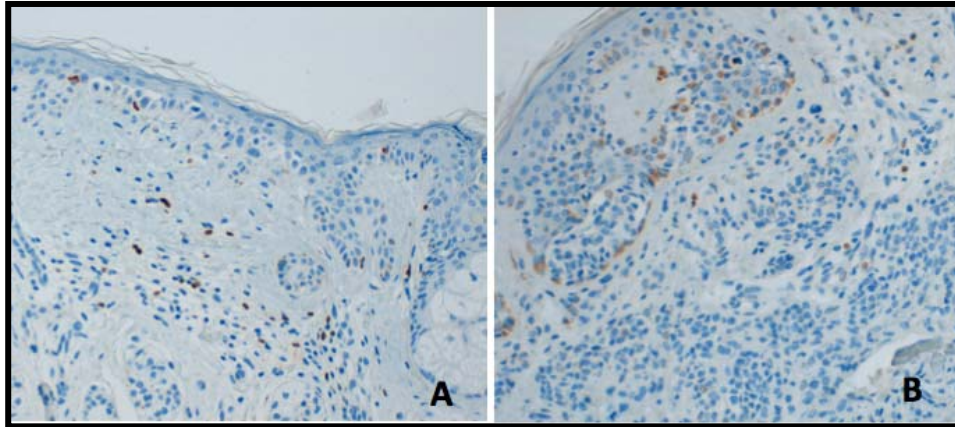


Figura 35. Tinció immunohistoquímica de cèl·lules T CD4+ i CD8+ en l'infiltrat inflamatori d'un nevus en autoinvolució. S'observa un predomini de CD4+.

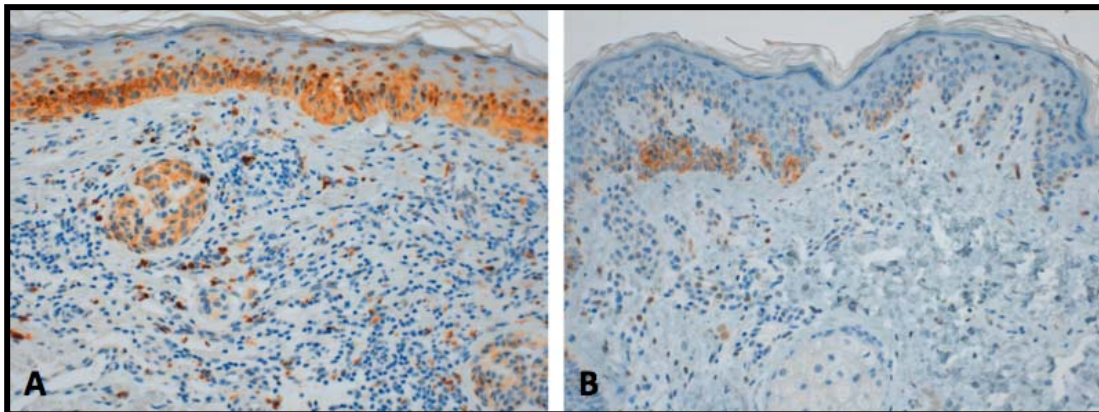


**Figures 36 i 37. Tincions immunohistoquímiques en nevus en autoinvolució.** Es mostren les diferents tincions realitzades i el seu *Histoscore* (Sc) en un nevus control (tipus nevus displàsic). A la imatge superior s’observa una zona de regressió i en la imatge inferior una zona de teques. El percentatge de positivitat està calculat pel global, no per zones.





**Figura 38. Tinció FoxP3.** S'observa un exemple de tinció positiva (A) i una tinció positiva débil (B) en dos nevus



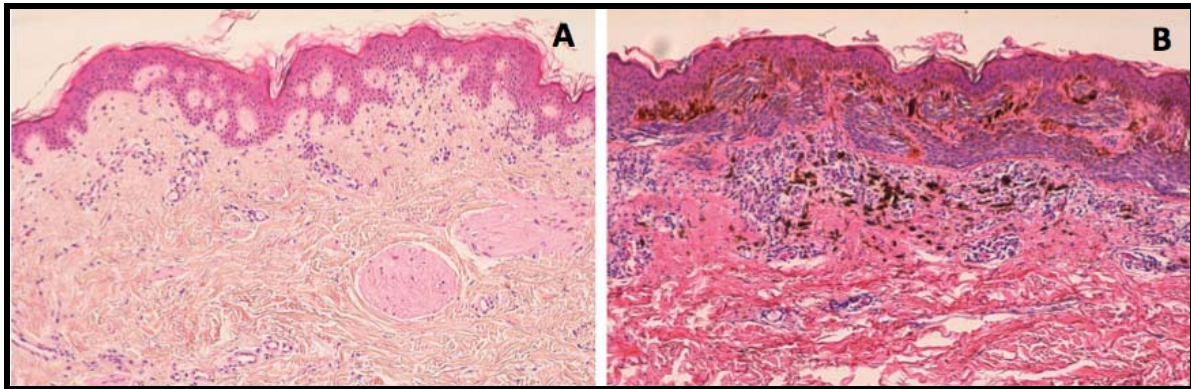
en autoinvolució.

**Figura 39. Tinció de la Caspasa 3 activada.** Observem una tinció intensament positiva en un dels controls (A) i una tinció dèbilment positiva en un dels casos dels nevus en autoinvolució (B).

### 3.2.4. Estudi comparatiu de les dades histològiques (veure taula 35)

Es van observar diferències estadísticament significatives entre els casos i controls respecte a les següents característiques: en la quantitat d'infiltrat inflamatori amb una major intensitat en el grup control ( $p=0,0038$ ), en la presència d'una fibrosi de tipus laminar i compacta que varen ser més freqüents en els casos ( $p=0,0159$  i  $p=0,0377$ , respectivament) i en l'augment de vasos ( $p=0,0497$ ), que va ser més freqüent en els casos (**figura 40**).

No es van observar diferències estadísticament significatives entre casos i controls respecte a la intensitat de la melanofàgia, la intensitat de la fibrosi, la presència de fibrosi delicada o de l'accentuació subepidèrmica de la mateixa ni respecte a la presència d'atròfia epidèrmica.



**Figura 40. Quantitat d'infiltrat inflamatori.** S'observa un infiltrat molt lleu en un dels casos de nevus en autoevolució (A) i un infiltrat molt intens amb intensa melanofàgia en un dels controls (de tipus nevus displàsic) (B).

### 3.2.5. Estudi comparatiu de la dades immunohistoquímiques

En relació als diferents marcadors immunohistoquímics estudiats, només es van observar diferències estadísticament significatives entre els casos i controls en la Caspasa 3 activa amb una major immunoexpressió en els controls ( $p=0,03$ ) (veure **taula 37**).

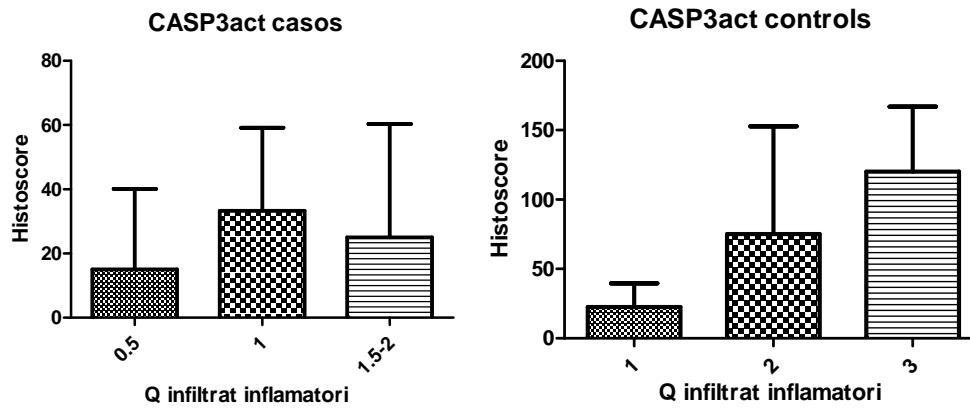
També es va comparar la *ratio* CD123/TIA1 entre els casos i els controls sense observar-se diferències estadísticament significatives.

### 3.2.6. Correlació entre alguns marcadors immunohistoquímics seleccionats

#### 3.2.6.1. Correlació entre la caspasa amb la intensitat de l'infiltrat inflamatori

Al correlacionar la quantitat d'infiltrat inflamatori amb l'expressió de la caspasa 3 activa, en el grup control només es van trobar diferències estadísticament significatives ( $p>0,05$ ) quan es comparaven els nevus amb lleu infiltrat inflamatori (1) respecte als que el presentaven molt intens (3) segons l'escala gradual (veure punt 3.2.2.C de material i mètodes) (**Figura 41**).

En els casos no es van trobar diferències estadísticament significatives en la comparació de cap dels grups.



**Figura 41. Correlació entre la quantitat d'infiltrat inflamatori i la caspasa activada.** Es mostra la relació entre la intensitat d'infiltrat inflamatori i la quantitat de caspasa 3 activada (*histoscore*) en casos i controls.

**3.2.6.2. Correlació de la caspasa 3 activa amb els marcadors immunohistoquímics (CD3, CD4, CD8, TIA1, FoxP3, CD123, PD1, Granzima B)**

Es va fer una correlació entre la immunoexpressió de la caspasa 3 activa i els diferents marcadors estudiats (**taula 37**).

En els casos, no es va observar cap correlació significativa.

En el grup control, es van veure diferències estadísticament significatives ( $p=0,025$ ) únicament en la correlació entre l'*histoscore* de la caspasa 3 activada i el percentatge de cèl.lules CD8+.

Caspasa vs	CASOS	CONTROLS
CD3	0,6272	0,2340
CD4	0,8964	0,5399
CD8	0,4291	<b>0,0250</b>
TIA-1	0,3187	0,3332
FOXP3	0,2598	0,7180
CD123	0,7509	0,2599
PD1	0,5986	0,1312
GRANZIMA B	0,3150	0,2701

**Taula 37. Correlació activada amb els biomarcadors en els casos i**

**de la caspasa 3 diferents immunohistoquímics controls.**





# Discussió



**TREBALL 1: Epidemiologia dels nevus a la infància a la regió sanitària de Lleida**

La tendència a l'augment de les taxes mundials de melanoma es reflecteix també en el nostre àmbit en un estudi multicèntric publicat fa pocs anys on es reporten els pacients amb melanoma diagnosticats en 23 hospitals catalans, durant el període de 2000 a 2007 (107). El nostre centre, que va participar en aquest estudi, és el principal hospital de la zona de Lleida i cobreix una població d'aproximadament 450.000 habitants.

La mitjana del número de nevus en nens de 4, 8 i 14 anys de la nostra àrea geogràfica van ser d'1, 5 i 10, respectivament. El fenomen de desenvolupament de nous nevus durant la infància i adolescència ha estat prèviament establert (65,67-69,108). Al comparar els nostres resultats amb els d'altres estudis realitzats en països mediterranis situats en una latitud similar, vam poder observar el següent: (i) en un estudi de nens italians (109), es va observar una mitjana d'11 nevus entre els nens d'edats compreses entre els 13-14 anys; això és comparable al nostre resultat de 10 nevus en el grup de 14 anys d'edat. (ii) En un estudi realitzat a Turquia (110) la mitjana de nevus va ser 6,53 en nens de 0-16 anys; un número molt proper a la mitjana de la nostra població (6,28 nevus). (iii) Aguilera et al. (9) van reportar una mitjana de 17,5 nevus entre els nens de Barcelona amb edats entre els 1-15 anys. En aquest últim estudi, van trobar un major número de nevus que el nostre i altres estudis. Això podria ser degut al fet que en l'estudi d'Aguilera es van incloure nevus de <2 mm de diàmetre. (iv) En un estudi més recent realitzat a Granada van observar una mitjana de nevus de 19,38 entre els nens de 8-10 anys d'edat. Aquest valor és més alt que la mitjana de 5 nevus observada en el nostre de grup 8 anys d'edat. Aquest resultat podria atribuir-se de nou a la inclusió de nevus <2mm de diàmetre (111).

En comparar els nostres resultats amb els d'estudis realitzats en països en diferents latituds, es va observar un menor número de nevus en comparació amb els nens de la mateixa edat. (v) Els nens australians de 3 anys (12) presentaven una mitjana de 10 nevus, que és superior a la mitjana del nostre grup de 4 anys d'edat (1 nevus). Nosaltres van obtenir una mitjana de 5 nevus en el grup de 8 anys d'edat. En comparar amb els nens de diferents regions d'Austràlia i d'Escòcia, Whiteman *et al.* (12) van assenyalar l'existència d'una associació

inversa entre la latitud i el número de nevus, el que dona més suport a la idea que l'exposició solar juga un paper clau en la proliferació de nevus melanocítics en la primera infància. No obstant això, Synnerstad *et al.* (14) de Suècia, va reportar una mitjana de 8 nevus en nens de 8-9 anys, el que suggereix que, a més del patró d'exposició solar, altres factors com el fenotip poden jugar un paper important.

Les variacions en la densitat dels nevus segons el sexe, amb un major número de nevus en els nens en comparació amb les nenes, s'ha documentat en repetides ocasions (11, 66). Tot i que existeixen dades discrepants (112), aquests resultats podrien explicar-se per un possible paper diferencial en els dos sexes del creixement i les hormones sexuals en el desenvolupament dels nevus (9, 113). En la nostra sèrie, el sexe masculí era un factor independent de presentar major número de nevus ( $p=0,003$ ) només en el grup de 14 anys d'edat. Com es mostra a la **Taula 10**, donades les altres variables com constants, un nen de 14 anys d'edat, tenia el doble de nevus melanocítics en comparació amb una nena. El fet que les diferències entre el sexe només s'observessin a l'edat de 14 anys podria explicar-se per una potència estadística més forta en relació amb un major número de nevus observat a aquesta edat i/o degut a canvis secundaris a la influència hormonal.

En quant a la distribució anatòmica, els nevus eren presents amb major freqüència al tronc, seguit de les cames, els braços, el cap, àrea del banyador i peus i mans. Aquesta distribució és coherent amb la distribució dels nevus (114,115) i el melanoma en els adults en la població espanyola (5). Aquesta distribució dels nevus es va observar en tots els grups d'edat, encara que en els nens més petits només es van observar nevus al tronc. Els adolescents mostraven una distribució similar als adults; més nevus al tronc, seguit de les extremitats (braços i cames). El número de nevus a la zona del banyador i peus i mans va ser extremadament baix en tots els grups d'edat. Es van trobar diferències significatives en la densitat dels nevus en àrees d'exposició solar intermitent (tronc, braços i cames). D'altra banda, no es van obtenir diferències estadístiques en les àrees no foto-exposades (àrea del banyador i peus). Les troballes a les zones exposades al sol de manera crònica són més difícils d'explicar (van obtenir diferències significatives en la densitat dels nevus al cap però no a les mans). Potser el comportament de les àrees exposades crònicament es relaciona més amb les característiques biològiques de la pell en aquestes regions que a la influència de

l'exposició solar. De fet, els melanomes que sorgeixen a les mans i els peus comparteixen característiques epidemiològiques i clíniques comuns i no estan relacionats amb l'exposició solar, mentre que els melanomes al cap són epidemiològicament i clínicament diferents i estan relacionats amb l'exposició solar crònica (116). Aquesta hipòtesi ha estat proposada anteriorment per altres autors, en base a estudis epidemiològics i experimentals en ratolins (12, 18).

La distribució regional dels nevus i el melanoma maligne cutani mostren diferents patrons en homes i dones adults. Els homes tenen més nevus i melanoma al tronc, mentre que les dones tenen més nevus i melanoma a les cames (17). D'acord amb això, i amb altres estudis anteriors de la distribució de nevus en nens (14, 112), trobem diferències estadísticament significatives entre els 2 sexes en el recompte de nevus a les cames, on les nenes tenen un major nombre de nevus que els nens en aquesta regió. Així mateix, es va observar una tendència a un major nombre de nevus al tronc en els nens. Un cop més, el creixement i les hormones sexuals que afecten els sexes de manera diferent podrien tenir importància per al desenvolupament de nevus.

Es va trobar una associació significativa entre el fototipus més clar (I-II) i major nombre de nevus com una variable independent, només en el grup de 14 anys ( $p=0,0002$ ). Per exemple, com es mostra a la **Taula 10**, donades les altres variables com constants, un nen de 14 anys d'edat amb fototipus de pell I-II va mostrar un nombre de nevus d'aproximadament 2,5 vegades superior que els nens amb fototipus III-IV. L'associació del fototipus amb el nombre de nevus és controvertida. Diversos estudis observacionals han mostrat aquesta associació amb pell clara (117, 118). No obstant, alguns estudis en adults han demostrat una associació entre la pell fosca i un major nombre de nevus (116).

El principal factor ambiental associat amb el desenvolupament de nevus melanocítics és l'exposició solar (112,119). Existeixen evidències que tant l'exposició crònica com la intermitent són importants. La variabilitat topogràfica en la densitat dels nevus, amb un major nombre de nevus en zones exposades al sol, observat en molts estudis, així com en el nostre, és compatible amb l'associació de l'exposició UV tant crònica com intermitent amb el desenvolupament de nevus. A la nostra sèrie, l'anàlisi multivariant va mostrar diferències en

el número de nevus en relació a la quantitat d'hores d'exposició solar en els 3 grups d'edat. Per als nens menors de 4 anys, només va ser significativa ( $p=0,01$ ) l'exposició solar a l'aire lliure (excloent el temps a platges/piscines). Aquest fet es podria explicar per una conducta adequada dels pares evitant l'exposició a platges i piscines en aquesta franja d'edat. En els grups de 8 i 14 anys d'edat, l'exposició al sol a les platges i piscines es va identificar com un factor independent (amb valors de  $p$  de 0,02 i 0,01, respectivament). D'altra banda, en el grup de 14 anys d'edat, l'ús de protector solar va modificar l'efecte de l'exposició solar total en el número de nevus, amb un major número de nevus observats en nens que feien un ús no adequat de la protecció solar (**Taules 9 i 10**). En resum, els resultats d'aquest estudi confirmen la influència de l'exposició solar en el desenvolupament dels nevus i la funció protectora de la crema solar.

En relació a l'ús de protector solar, es va observar una disminució del seu ús amb l'edat, amb diferències estadísticament significatives entre el grup de 14 i els grups de 8 i 4 anys d'edat, o entre els grups de 14 i 8 anys vs els grup de 4 anys, en funció del mètode d'avaluació de l'ús de protector solar (sempre vs gairebé sempre, sempre/gairebé sempre a la platja/piscina, sempre/gairebé sempre  $FPS \geq 15$  i cada 2h, etc.). Creiem que això podria explicar-se perquè els nens més grans són menys propensos a aplicar protector solar i estan menys controlats pels seus pares. De fet, en un estudi realitzat el 2004 a la nostra regió (117), es va observar que només el 14,6% de la nostra població general utilitza protector solar adequadament. Si comparem aquest resultat amb l'obtingut en el present estudi (47,8%), ens trobem amb un percentatge clarament més alt d'ús correcte del protector solar en els nens. Hi ha 2 explicacions per a aquestes diferències. En primer lloc, els subjectes de l'estudi són nens que estan sota la supervisió dels seus pares i el nostre estudi anterior es va realitzar en adults (majors de 50 anys). En segon lloc, podria reflectir l'èxit de les campanyes de prevenció del càncer de pell realitzats al nostre país en els últims anys.

La relació entre l'ús de protector solar i el número de nevus també és objecte de controvèrsia. L'ús regular de protecció solar s'ha associat amb un menor número de nevus en els nens en un estudi aleatoritzat (112, 120) i en alguns estudis observacionals. Contràriament, altres estudis han demostrat una associació entre l'ús de protector solar i un augment del número de nevus (71, 121). Els autors van suggerir que l'ús de protector solar

pot donar als pares una falsa sensació de seguretat i fa que els nens estiguin exposats al sol durant més temps. No obstant això, com ja s'ha esmentat, en el nostre estudi el protector solar sembla tenir un paper protector per al desenvolupament de nevus clarament demostrat en el grup de nens de 14 anys.

Finalment, es va observar un número creixent de cremades amb l'edat. Com en el cas de l'ús de protectors solars, aquests resultats podrien reflectir el comportament dels adolescents, sent menys probable que apliquin protector solar ja que estan menys controlats pels seus pares. En l'estudi bivariant es va obtenir una correlació significativa entre haver patit cremades solars i el número de nevus en el grup de 14 anys d'edat ( $p < 0,05$ ) i una tendència en els grups de 4 i 8 anys. Malgrat això, no hem trobat associació significativa entre les cremades solars i el recompte de nevus en cap dels 3 grups en l'anàlisi multivariant. Una possible explicació d'aquests resultats podria ser la potència de l'estudi (baix número de cremades solars en els 3 grups d'edat). Per altra banda, la manca d'associació entre aquestes 2 variables també s'ha documentat en altres estudis (110).

En conclusió, el nostre estudi va recollir el número i distribució dels nevus melanocítics adquirits en una àmplia mostra de nens de la nostra regió i es va analitzar la seva associació amb l'edat, el gènere, fototipus i diferents factors ambientals (l'exposició solar, la història de cremades solars i l'ús de fotoprotector). A diferència d'altres treballs, els nens explorats pertanyien a tres grups d'edat clarament diferenciats (4, 8 i 14 anys), el que li dona a l'estudi fort valor estadístic ja que no hi ha variabilitat dins dels grups a causa de l'edat. Per tant, permet el càlcul de les diferències en el número de nevus entre els grups d'edat amb la màxima precisió.

L'anàlisi estadístic d'aquest estudi va avaluar diversos factors de risc associats amb la densitat i la distribució dels nevus ja reportats prèviament per altres autors, com ara l'edat, el gènere, el fototipus i l'exposició al sol. La densitat de nevus va augmentar amb l'edat. Els nens tenien més nevus en el tronc i les nenes tenien més nevus a les cames. Els nevus eren més nombrosos al tronc i les extremitats. Els nens amb fototipus clar tenien més nevus que aquells amb fototipus fosc. Una major quantitat d'exposició solar acumulada es relacionava amb una major número de nevus. Tot i que no es va observar una correlació significativa

entre haver patit cremades i el número de nevus (excepte en el grup de 14 anys d'edat, en l'anàlisi univariant), es va observar una tendència a un creixent número de nevus en relació al número de cremades solars en tots els grups d'edat.

Particularment d'interès, l'anàlisi multivariant del nostre estudi ha confirmat el paper protector de l'ús de filtres solars en el desenvolupament de nevus melanocítics adquirits. Aquesta conclusió, a més a més de destacar el fet que els hàbits de protecció solar es perden progressivament en els nens de més edat, remarca la necessitat de campanyes de promoció per a la salut per educar en els hàbits de fotoprotecció per tal de reduir el desenvolupament de nevus i, a llarg termini, per prevenir el melanoma maligne a la vida adulta.

A manera de resum: tot i que la majoria dels factors de risc associats als nevus adquirits avaluats pel nostre estudi s'han descrit anteriorment, els punts a destacar del nostre treball són l'avaluació dels nevus en tres grups d'edat pediàtrica clarament diferenciats i, sobretot, el fet de que els resultats proporcionen dades que recolzen un paper protector dels filtres solars en el desenvolupament de nevus melanocítics adquirits.



---

**TREBALL 2: Immunoexpressió diferencial de marcadors de senescència, gens supressors de tumors, BRAF/V600E i canals de calci de tipus T en nevus adquirits d'acord amb la seva classificació histopatològica i dermatoscòpica**

El principal objectiu d'aquest treball va ser investigar les diferències entre diversos grups de nevus melanocítics adquirits, establerts segons la seva classificació histològica i dermatoscòpica, en la immunoexpressió de les següents molècules: BRAF/V600E, marcadors de senescència induïda per oncogens i replicativa (p16, pRB, p53, hTERT), marcadors de proliferació i cicle cel·lular (Ki67 i ciclina D1), la proteïna supressora de tumors PTEN i dos isoformes dels canals de calci de tipus T (Cav3.1 i Cav3.2). No obstant, aquest estudi va ser precedit per una valoració de la sensibilitat i especificitat de la immunotinció de la proteïna BRAF/V600E mitjançant l'anticòs VE1 i una sèrie d'estudis de correlació entre les diferents classificacions histològiques i dermatoscòpiques, entre elles mateixes, amb algunes característiques clíniques dels pacients i els nevus i amb característiques dermatoscòpiques locals, que varen donar consistència als resultats de l'objectiu principal.

En l'*estudi de sensibilitat i especificitat de la immunotinció de la proteïna BRAF/V600E mitjançant l'anticòs VE1*, el percentatge de melanomes amb les mutacions V600E/K determinades per tècniques moleculars (5) va ser una mica inferior al descrit als melanomes de la nostra població, que està establert al voltant del 40% (122). No obstant, potser el fet de que entre els melanomes primaris s'incloguessin 6 (15,4%) casos de melanoma nodular, 6 (15,4%) de melanoma lentiginós acral i 6 (15,4%) de melanoma sobre lentigen maligne, que, per una part, presenten en un baix percentatge mutacions de BRAF i que, en segon lloc, especialment el melanoma lentiginós acral, són bastant menys freqüents que el melanoma d'extensió superficial (5) que, en canvi, és el que més comunament les presenta (123), podria explicar en part aquests resultats.

Establint un punt de tall de l'*histoscore* a 45 (d'un rang de 0 a 300), la sensibilitat i especificitat de la detecció immunohistoquímica de la mutació BRAF/V600E respecte a la seva confirmació molecular varen ser bones, en concret del 80% i 83% respectivament, però una mica més baixes que les obtingudes en altres articles (100, 124). Malgrat això, segons els

nostres resultats, no varen ser suficientment bones com per pensar que aquest test pogués substituir al diagnòstic molecular com a prova de cribratge per identificar aquells pacients amb melanoma metastàtic candidats a tractament amb inhibidors de BRAF, encara que tindria una clara aplicació en investigació (com és el cas d'aquest treball) i altres fins de diagnòstic histopatològic.

En quant a la **correlació entre les característiques clíniques i la classificació dels nevus segons criteris histopatològics i dermatoscòpics**, encara que els nevus es varen triar amb la finalitat de tenir grups homogenis segons els tipus histològics (20 nevus de cada subtipus) i, per tant, no representaven exactament el que es troba a la població general respecte al global de nevus, sí que reflecteixen algunes característiques ja descrites. En primer lloc, tan sols es varen extirpar dos nevus de pacients menors de 18 anys (en concret de 9 i 15 anys) pel que els resultats de la nostra sèrie no es poden comparar al descrit en la població infantil i juvenil; el que repercuteix també en haver recollit tan sols 6 nevus amb el patró expansiu RC/GP, descrit per I. Zalaudek, típic dels nevus en període de creixement. Per altra part, el fet d'observar major nombre de nevus de patró globular/en empedrat o inespecífic a les dones, pensem que simplement és el resultat de que més dones varen estar d'acord en que li fos extirpat un nevus melanocític intradèrmic (que solen presentar aquests patrons) per motius estètics. En canvi, respecte a la localització, sí que alguns resultats concorden amb la literatura (114,125,126). Per exemple, s'han descrit més nevus de patró globular/en empedrat (al que, en el nostre estudi, s'hauria d'afegir l'inespecífic) a cap i coll, més nevus amb patró reticular a la part superior de l'esquena i més nevus de patró RC/GP al terç mig del tronc, tant anterior com posterior. Com també era d'esperar, la segona localització dels nevus de patró reticular, després de les extremitats, va ser l'esquena superior. Finalment, els nevus de patró multicomponent predominaven a la part superior de l'esquena, és a dir, on més sovint trobem nevus clínicament atípics. En relació a la mida (valorada com l'àrea en mm), els nevus de patró globular/en empedrat (que solen ser nevus intradèrmics) eren els més grans, seguits dels de patró multicomponent (que solen ser nevus displàsics), com podriem esperar.

Respecte a la **correlació de les diferents classificacions histopatològiques i dermatoscòpiques entre sí**, veiem com, de forma lògica, en les dos classificacions

dermatoscòpiques, dins dels nevus intradèrmics es varen trobar el 100% de nevus de patró globular/en empedrat (i inespecífic) i com al voltant del 40% de nevus junturals mostraven un patró reticular, mentre que els nevus compostos solien mostrar amb més freqüència patrons mixtes. En la classificació per patrons globals, el patró multicomponent (que reflecteix atípia morfològica) s'associava amb més freqüència als nevus displàsics, mentre que en la classificació dermatoscòpica segons I. Zalaudek (que no reflecteix l'atípia, sinó el patró de creixement) els nevus displàsics estaven distribuïts entre els altres patrons (exceptuant el globular/en empedrat), especialment en el reticular i en el GC/RP.

En relació a la ***distribució de les característiques dermatoscòpiques locals als diferents grups de les classificacions dermatoscòpiques i histopatològiques***, veiem com, en l'estudi estadístic en què varen trobar més associacions significatives (n=11) era el que va relacionar les característiques dermatoscòpiques locals amb les categories de la classificació dermatoscòpica basada en els patrons globals. Això és lògic, tenint en compte que ambdues valoracions s'utilitzen de forma complementària en la segona etapa del diagnòstic dermatoscòpic basat en l'anàlisi de patrons. Dintre d'aquest estudi, aquestes associacions mostraven un comportament coherent. Per exemple, dintre del patró multicomponent es concentraven les característiques relacionades amb atípia (com glòbuls irregulars, vasos i/o eritema dins d'estructures de regressió, vel blau-gris, regressió i despigmentació blanca cicatricial); i dins dels patrons globular/en empedrat i inespecífic les típiques dels nevus intradèrmics (com l'absència de reticle, glòbuls regulars, vasos en coma i traces de pigment marró-gris). El segon i tercer estudis estadístics, en què es varen trobar més associacions significatives (n=8) eren els que relacionaven les característiques dermatoscòpiques locals amb les categories de la classificació histològica, tant en l'estudi NMCA vs nevus displàsics com en l'estudi que tenia en compte els quatre grups de nevus melanocítics adquirits. En aquesta classificació, malgrat que sabem que no sempre hi ha una bona correlació histopatològica entre les característiques d'atípia clínica i atípia histològica (25, 26), tornaven a tenir molt pes les característiques dermatoscòpiques locals associades a atípia, que es concentraven als nevus displàsics, encara que les podíem trobar en ocasions a alguns nevus comuns per múltiples motius, no analitzats en aquesta Tesi com, per exemple, la regressió histològica. En l'estudi que relacionava les característiques dermatoscòpiques locals amb les quatre categories de la classificació histològica dels nevus melanocítics, el número (n=8) i

tipus d'associacions significatives varen ser les mateixes, agrupant-se als nevus intradèrmics característiques dermatoscòpiques pròpies dels mateixos com glòbuls regulars, absència de reticle, traces de pigment marró-gris i vasos en coma. El darrer estudi estadístic, en ordre, en que es varen trobar menys associacions significatives (n=7) era el que relacionava les característiques dermatoscòpiques locals amb les categories de la classificació dermatoscòpica de I. Zalaudek. Aquest resultat també era esperable, ja que la classificació de I. Zalaudek no conté cap grup de nevus específicament de característiques atípiques, sinó que està basada en diferents patrons de creixement. De tota manera, mostrava algunes associacions lògiques com l'absència de criteris d'atípia (vel blau-gris, regressió, etc.) en el patró globular/en empedrat (que sol correspondre a nevus intradèrmics) i la presència en el mateix de glòbuls regulars, absència de reticle, vasos en coma i traces de pigment marró-gris. Potser la característica dermatoscòpica que s'ajustava menys a l'esperat va ser la presència de reticle atípic ja que, encara que era més freqüent als nevus displàsics (i especialment als de patró dermatoscòpic multicomponent), la seva baixa freqüència als nevus comuns es devia a una total absència als nevus intradèrmics, però era una característica força comuna als compostos i especialment als junturals. Potser ha existit una sobrevaloració d'aquesta característica per part dels dermatòlegs avaluadors de la dermatoscòpia que, a més, ha pogut estar influenciada per fenòmens histopatològics que no s'han valorat en aquesta Tesi com l'eliminació transepidermica de melanina o la presència de melanofàgia.

Respecte a la **distribució de la mutació BRAF/V600E als diferents grups de nevus**, en l'estudi molecular, malgrat que sigui una n petita (20 nevus, 5 de cada grup histopatològic) cal remarcar, en primer lloc, que no es va trobar cap nevus amb mutació de *BRAF* diferent a la *V600E* i, en segon lloc, que el 100% dels nevus intradèrmics eren portadors d'aquesta mutació. De fet en un estudi publicat al 2005 (127) en el que es varen estudiar les mutacions de lesions melanocítiques adjacents a melanomes i el melanoma corresponent i es varen classificar histopatològicament en lesions clarament benignes, lesions intermitges probablement benignes, lesions intermitges probablement malignes, melanoma *in situ*, melanoma invasiu T1, T2, T3 i T4 i metàstasi de melanoma, cap de les lesions del grup inequívocament benigna presentava una mutació de *BRAF* diferent a la *V600E*. Les mutacions de tipus *V600K* o altres mutacions de *BRAF* (com *K601E*) ja es veien als dos grups

de lesions intermitges. En un altre estudi, que també comparava les mutacions de melanomes, nevus associats i nevus control (102), d'un total de 71 nevus, varen trobar un sol cas de nevus portador de la mutació *V600K*, però no assenyalaven si aquest era un nevus amb cert grau d'atípia histològica o no. Altres estudis moleculars de nevus en què s'han detectat algunes mutacions de *BRAF* diferents a la *V600E*, s'han fet en poblacions de pacients amb nevus displàsics (128, 129), encara que en un altre dels articles revisats es recollien dos nevus classificats com compostos amb la mutació *K601E* (130).

En l'estudi immunohistoquímic, ja sigui utilitzant el punt de tall establert de l'*histoscore* (puntuació de 45) com si s'utilitzava l'*histoscore* com una variable contínua, vàrem observar que, una vegada més, els nevus intradèrmics eren els que mostraven major nivell de positivitat (positivitat en el 100% dels casos, segons punt de tall), seguits, per ordre, pels nevus compostos, els displàsics i els junturals. Globalment, els nevus displàsics mostraven un nivell d'immunoexpressió menor que els NMCA. Des del punt de vista de la significació estadística, es va observar que la utilització d'un punt de tall discriminava millor que l'*histoscore* sobre les diferències en la immunoexpressió de *BRAF/V600E* entre els NMCA vs displàsics, ja que aquesta diferència era estadísticament significativa a l'utilitzar el punt de tall, mentre que aquesta significació es perdia a l'utilitzar la puntuació global de l'*histoscore*.

El percentatge de nevus melanocítics adquirits amb mutació *BRAF/V600E* varia d'uns articles a altres. En un article de revisió, publicat al 2015 (131), assenyalen percentatges de positivitat variables en diferents estudis; pels nevus displàsics entre el 22 i el 80% i pels NMCA entre el 56% i el 88%. Els nostres resultats són consistents amb estudis previs moleculars que descriuen que els NMCA són més sovint portadors de mutacions de *BRAF* que els displàsics (49% vs 24% i 60% vs 17%) (128). També són coherents amb treballs publicats sobre NMCA, que mostren que els nevus intradèrmics són significativament més propensos a tenir mutacions de *BRAF* que els nevus de la unió (132, 133) i que els nevus *BRAF/V600E* positius tenen menys probabilitats de tenir un component juntural o un creixement lentiginós que els nevus *WT* per *BRAF* (102).

Si, a més, tenim en compte la classificació dermatoscòpica, veiem que els nostres resultats indiquen que els nevus amb menor *histoscore* per *BRAF/V600E* són, en la classificació per

patrons globals, els de patró multicomponent, és a dir, dermatoscòpicament atípics (*histoscore* de 48) i els de patró reticular (*histoscore* de 50,2) i, en la classificació de I. Zalaudek (que no té en compte l'atípia), els de patró reticular (*histoscore* de 42,5). En aquest sentit, existeix un treball interessant (104) que mira, també amb l'anticòs VE1 la immunoexpressió de les mutacions de BRAF/V600E en nevus amb diferents patrons dermatoscòpics i histològics i demostra que la presència de glòbuls vs reticle (des del punt de vista dermatoscòpic) i la de creixement intradèrmic o en nius grans vs l'absència dels mateixos (des del punt de vista histopatològic), s'associa clarament a un major percentatge de mutacions de BRAF. Aquest treball també assenyala una tendència no estadísticament significativa entre l'absència de desordre arquitectònic i atípia citològica i la immunopositivitat per BRAF/V600E. Coherentment amb tot l'anterior, en el nostre estudi, els nevus de patró globular/en empedrat i inespecífic (que es corresponien el 100% amb nevus intradèrmics) eren els que mostraven nivells d'*histoscore* més alts (102,35 i 100, respectivament en la classificació per patrons globals i 106,3 en la classificació d'I. Zalaudek) amb l'excepció dels nevus de patró RC/GP que encara mostraven un valor més alt de l'*histoscore* (125). Aquest patró, descrit per I. Zalaudek com un patró expansiu o de nevus en creixement no tindria traducció en la classificació histopatològica convencional (per exemple, en el nostre estudi inclou 2 nevus displàsics, 2 compostos i 2 junturals). De fet, la mateixa I. Zalaudek ja va descriure, també en una sèrie curta, estudiada en aquest cas mitjançant tècniques moleculars (130), que el 90,9% dels nevus amb el patró RC/GP eren portadors de la mutació BRAF/V600E. Com nosaltres el que hem fet és una valoració amb *histoscore* de la quantitat de proteïna i no tan sols de l'absència o presència de la mutació, ens podríem aventurar a dir que els nevus amb aquest patró expansiu no tan sols són portadors de la mutació sinó que estan sintetitzant una gran quantitat de proteïna en el moment evolutiu en el que es va fer la biòpsia. No obstant, com els nevus amb patró RC/GP només representaven el 7,59% de la nostra sèrie (6/80), és obvi que caldrien fer més estudis per corroborar aquestes dades.

En resum, segons els nostres resultats, des del punt de vista immunohistoquímic, els nevus displàsics són portadors de la mutació BRAF/V600E amb menys freqüència que els NMCA, encara que aquesta diferència és tan sols significativa quan els comparem amb el nevus intradèrmics dels quals, en la nostra sèrie, el 100% eren BRAF/V600E positius, tant en el

l'estudi immunohistoquímic com molecular. En l'estudi molecular no vàrem trobar cap nevus amb mutació de *BRAF* diferent a la *BRAF/V600E*, com la *V600K* o altres i, segons el que hem recollit de la literatura, aquestes no es veuen en lesions melanocítiques inequívocament benignes. En la nostra sèrie, els nevus que presentaven la mitjana més baixa de l'*histoscore* per la mutació *BRAF/V600E* (o que eren amb més freqüència negatius si utilitzaven un punt de tall) eren els nevus junturals. En consonància, en la classificació dermatoscòpica, el patró reticular s'associava amb un *histoscore* baix i els patrons globular/en empedrat i inespecífic amb un *histoscore* alt. No obstant, en la classificació per patrons globals, el patró multicomponent (que englobava nevus displàsics, però també algun nevus juntural i compost) era el que presentava els valors d'*histoscore* més baixos i, en la classificació de I. Zalaudek, el patró RC/GP era el que presentava els valors d'*histoscore* més alts.

En relació a la ***immunoexpressió diferencial dels biomarcadors de proliferació i cycle cel·lular, senescència induïda per oncogens i replicativa, i supressor de tumors PTEN***, tal com hem comentat als resultats, al comparar els nevus displàsics amb els NMCA, tan sols es detectaven diferències estadísticament significatives respecte a pRB i hTERT, mentre que si es feia la comparativa amb els subtipus de NMCA, les diferències significatives s'estenien a Ki67 (displàsics vs intradèrmics), p16 (displàsics vs intradèrmics) i p53 (displàsics vs compostos). Com hem mencionat en la introducció de la Tesi, diversos estudis, encara que amb diferències entre ells, ja han assenyalat l'augment de marcadors de proliferació, com Ki67, i la presència de mutacions de p53 i pèrdues al·lèliques de p16 en els nevus displàsics (78, 79). Un altre treball també reporta una major expressió de hTERT als nevus displàsics que als NMCA, encara que menor que al melanoma (134). En l'article ja comentat de Shain *et al.*, descriuen les mutacions del promotor de *hTERT* com unes de les alteracions més precoces que tenen lloc a les lesions melanocítiques histopatològicament intermitges (probablement benignes o malignes) i en el melanoma *in situ*. En aquest tipus de lesions també troben pèrdua heterozigota de *CDKN2A*, que podria comportar una menor expressió de p16, mentre que la pèrdua homozigota de p16 és exclusiva del melanoma invasor i metastàtic (127). Aquestes troballes estarien totalment en consonància amb els nostres resultats. En canvi, aquests autors tan sols detecten mutacions de p53 (encara que això no és el mateix que canvis en l'expressió de la proteïna) en melanomes invasors o metastàtics. Tenint en compte que la mutació de p53 donaria lloc a un augment d'expressió de la

proteïna, no sabem com explicar les diferències en la immunotinció de p53 que va resultar significativament més intensa en els nevus compostos que en els displàsics.

Si mirem la immunoexpressió diferencial dels biomarcadors als diferents grups de nevus de les classificacions dermatoscòpiques, veiem que el patró multicomponent de la classificació per patrons globals (que és el que s'associaria amb atípia dermatoscòpica) no tan sols era el que expressava nivells significativament més alts de Ki67, sinó també nivells més baixos de p16 i PTEN. L'existència d'una intensa expressió citoplasmàtica de PTEN als nevus melanocítics ja ha estat descrita, així com la seva pèrdua al melanoma (135-137), especialment als casos avançats el que dona suport a un paper de la pèrdua de PTEN en la patogènesi del melanoma. No obstant, no hem trobat que s'hagi reportat una diferència en l'expressió de PTEN entre els NMCA i els displàsics, encara que sí s'han descrit mutacions de *PTEN* als nevus atípics en la situació particular dels pacients amb *xeroderma pigmentosum* (138). Shain *et al.* (127) també descriuen la presència d'alteracions genètiques bial·lèliques de PTEN com una característica exclusiva de melanomes profunds o metastàtics. Malgrat tot això, nosaltres sí hem observat una distribució diferencial significativa de l'expressió de PTEN quan els nevus es classifiquen segons el patró dermatoscòpic global, sent l'expressió particularment baixa als nevus de patró multicomponent. Potser aquest fet es podria explicar per algun mecanisme post-transcripcional. Finalment, el patró RC/GP de la classificació dermatoscòpica de I. Zauladek es va associar a nivells més alts de Ki67 i hTERT, el que sembla lògic donat que aquest patró s'ha descrit com un tret típic de nevus en fase de creixement).

En quant a ***l'expressió de les isoformes Cav3.1 i Cav3.2 dels canals de calci de tipus T***, de forma coherent al que hem publicat recentment (56) (estudi en el que a més es va utilitzar la mateixa sèrie de nevus melanocítics adquirits), no vàrem trobar diferències significatives en la distribució de Cav3.2, mentre que els nevus displàsics mostraven un *histoscore* significativament més alt de Cav3.1 (38,5) que els NMCA (10,83). A més, en la comparació per parells entre els nevus displàsics i els subtipus de NMCA, Cav3.1 va ser l'únic biomarcador que va mostrar diferències estadísticament significatives en totes les comparacions (junturals vs displàsics, compostos vs displàsics i intradèrmics vs displàsics). Aquest anàlisi no s'havia fet amb anterioritat, ni per part nostra ni per altres autors. Al analitzar la distribució de Cav3.1 en els grups de nevus de les classificacions



dermatoscòpiques, en la classificació per patrons globals, l'*histoscore* més alt el va mostrar el patró multicomponent (dermatoscòpicament atípic) (27,33) i, en la classificació d'I. Zalaudek, l'*histoscore* més alt el va mostrar el patró RC/GP (38,33), que és el que també mostrava, com hem comentat, nivells més alts de BRAF/V600E, Ki67 i hTERT, que concorda amb un comportament de nevus en període expansiu o en creixement.

En conjunt, doncs, malgrat que existeix certa coherència en la immunoexpressió diferencial dels biomarcadors estudiats segons la seva classificació histopatològica o dermatoscòpica, pensem que la dermatoscòpia aporta informació addicional a la histopatologia convencional sobre el comportament biològic dels nevus melanocítics, com la presència de valors d'*histoscore* especialment baixos de p16 i PTEN al patró multicomponent de la classificació per patrons globals o especialment alts de BRAF/V600E, Ki67, hTERT i Cav3.1 al patró RC/GP de la classificació de I. Zalaudek.

### TREBALL 3: Fenomen d'autoinvolució

#### 3.1. Estudi descriptiu segons imatges de SIAscòpia del fenomen d'autoinvolució en pacients amb síndrome del nevus amb atípia clínica que es troben sota seguiment digital en aquest sistema

Els nevus melanocítics són entitats dinàmiques que canvien al llarg de la vida d'una persona. Aquests canvis són evidents clínica, dermatoscòpica i histològicament (97,139-142). La majoria s'adquireixen durant la infància i l'edat adulta primerenca i posteriorment la seva prevalença decreix (143,144). Es postula que aquest fet podria ser degut a la involució espontània ("*fading*" o esvaïment).

Des del primer cas publicat l'any 1960, els articles sobre la involució espontània dels nevus melanocítics segueixen essent molt escassos (97, 98, 145-148). Clàssicament, la pèrdua de pigmentació de les lesions melanocítiques s'ha associat a la presència d'un halo blanquinós perilesional, conegut com fenomen "d'halo nevus" o "nevus en halo", però la introducció de la dermatoscòpia digitalitzada ha permès un seguiment dinàmic d'aquestes lesions que han portat a poder identificar mecanismes de despigmentació diferents (95).

En el nostre estudi hem pogut observar com un 81% del total de pacients en seguiment digital presentava algun nevus amb criteris d'autoinvolució i com un de cada quatre nevus (25%) enregistrats presentava aquest fenomen. Aquest treball contrasta amb un publicat per un grup australià (97) en el que descriuen un fenomen de "*fading*" en tan sols 45 nevus melanocítics de 21 pacients durant un període de 2 a 11 anys, d'un total de 1.000 individus controlats digitalment mitjançant el sistema Molemap. Aquestes dades indicarien que el fenomen estava present tan sols en un 2,1% del pacients, molt per sota de l'observat en la nostra sèrie i, de fet, els autors assenyalen que és una troballa poc comuna. Donat que la mitjana d'edat dels pacients (51 anys) no difereix gaire de la nostra (47,7 anys) i tampoc la relació home/dona (66,6% i 33,3% en el seu estudi en front a 63% i 37% en el nostre), no sabem on pot radicar la diferència. La definició que ells utilitzen per autoinvolució es

simplement "pèrdua significativa de color i/o estructures tant en les imatges macroscòpiques com dermatoscòpiques en comparació a imatges prèvies" pel que podria ser superposable a la nostra, encara que nosaltres tan sols comparem imatges siascòpiques. Nosaltres hem comptabilitzat també els nevus en halo, però com tan sols hem trobat 3 casos, això no justifica aquesta diferència tant important en el percentatge de pacients amb nevus amb involució; ni tan sols si restem els 5 nevus del nostre estudi que varen presentar un temps mig de regressió molt més curt. Ni a material i mètodes, ni a la resta del text de l'article, ni a les imatges que mostren indiquen que utilitzessin un criteri d'inclusió tan restrictiu com que el fenomen d'autoinvolució fos total o quasi total o de determinat percentatge al final de l'estudi. Dubtem molt que la diferència en fototipus entre la població australiana i la nostra pugui explicar aquesta discordança, més tenint en compte que en la nostra sèrie el 11,7% dels pacients tenia un fototipus 1 i el 65% un fototipus 2. El que realment no queda clar a material i mètodes de l'estudi australià és el temps de seguiment ni la pèrdua de seguiment del global de pacients, que podria explicar que no donés temps a observar aquest fenomen a molts d'ells. Realment, la finalitat del treball de Vyas *et al.* és més la descripció morfològica del fenomen que calcular la seva incidència. En canvi, Scope *et al.* (149) varen descriure en població infantil seguida clínica i dermatoscòpicament durant 3 anys que fins a un 28% de nens presentava la desaparició d'almenys un nevus melanocític.

Únicament en un 20% dels pacients que presentaven nevus en autoinvolució només hi havia una única lesió en regressió. Això indica que, en general, no es tracta d'un fenomen aïllat, sinó que és freqüent trobar diversos nevus en un mateix pacient i en un mateix moment del seguiment que presenten aquestes característiques.

La mitjana d'edat dels pacients que presentaven nevus en regressió (47,7 anys) i la proporció d'homes-dones (63% i 37%) era molt semblant a la publicada en altres estudis del fenomen de "*fading*" dels nevus, així com la seva distribució (97), amb un clar predomini de l'àrea del tronc.

Curiosament, no es va observar cap nevus en autoinvolució de localització palmo-plantar. Potser, així com els melanomes que sorgeixen a les mans i peus comparteixen característiques epidemiològiques i clíniques comuns i no estan relacionats amb l'exposició

solar (116), també el comportament biològic dels nevus de localització acral podria ser diferent i el fenomen d'autoinvolució menys freqüent, però es necessitarien més estudis per afirmar-ho.

El temps mig d'involució va ser 46,7 mesos. En un 95,9% dels nevus encara s'observaven signes d'involució en l'últim control i en el 74,2% ja s'observaven en la primera imatge del seguiment, el que indica que probablement el temps d'involució espontània d'aquests nevus encara seria molt més llarg. De fet, en una altra sèrie (97) van veure com el període més llarg era d'11 anys i tot i així, una certa activitat residual melanocítica en el nevus encara era evident.

El patró estructural predominant observat en dermatoscòpia va ser el patró reticular, seguit pel retículo-globular i globular/en empedrat posteriorment. Aquesta dada és coincident amb altres estudis (97) i és consistent amb la hipòtesi dual de la nevogènesi. Recordem que aquesta hipòtesi defensa la idea que els nevus amb patró globular, que serien nevus que apareixerien durant la infància, serien nevus que, després de créixer i establir-se, persistirien i adoptarien l'aparença típica d'un nevus intradèrmic. Mentre que els nevus amb patró reticular serien els que tindrien un cicle vital dinàmic, amb capacitat de proliferar i després de dècades, podrien involucionar presentant una desaparició gradual del pigment (93). Aquesta característica, sembla ser que també seria un tret diferencial de l'halo nevus on el patró predominant estructural seria el globular (150).

En el nostre estudi, el tipus de despigmentació parcial es va repartir de manera pràcticament equitativa entre la despigmentació de tipus homogènia i heterogènia. Alguns autors intenten explicar la presència d'aquests dos tipus de despigmentació amb la idea que en el cas de la despigmentació heterogènia existirien una sèrie de modificacions antigèniques que només afectarien una clona o clones determinades de melanòcits, que serien els destruïts pel sistema immune, però no a totes les cèl·lules integrants de la lesió (82, 151). En els casos en què es produeix una despigmentació parcial homogènia, probablement el procés s'iniciaria a expenses de les cèl·lules situades a la perifèria. Potser els melanòcits localitzats en la porció central serien capaços de desenvolupar mecanismes d'escapatòria davant el sistema immune o simplement el procés de regressió seria molt més lent que en els altres casos.

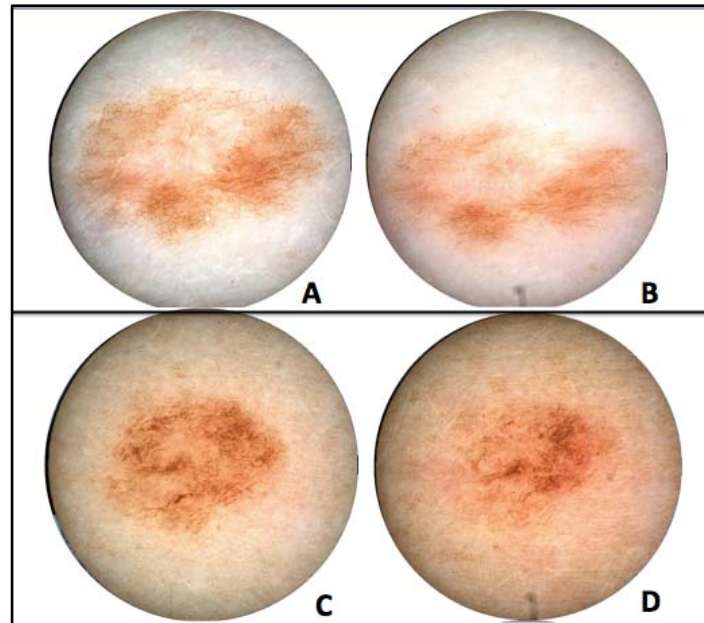
De fet, i de manera concordant, en el nostre estudi, els nevus que van presentar una despigmentació homogènia van presentar un temps mig discretament superior (50,2 mesos) respecte als nevus que van presentar despigmentació heterogènia (4,9 mesos).

En relació al percentatge de despigmentació, en quasi la meitat dels nevus es va observar una despigmentació inferior al 10% i en més d'un 80% dels casos inferior al 50%. Si comparem amb els halo nevus, la despigmentació s'esdevé majoritàriament en els 6 primers mesos arribant a reduir la seva àrea fins a un 5% cada mes durant el primer mig any (150). És a dir, que la despigmentació en el fenomen d'autoinvolució és molt més gradual que en el fenomen dels nevus en halo.

Pel que fa a les estructures de regressió, les més freqüents van ser en aquest ordre: presència d'estructures vasculares (33,8%), punts blaus-grisos (12,1%), fibrosi (81%) i fenomen de l'halo (1,5%). Curiosament, en els nevus que van presentar regressió completa i que van presentar un temps mig de regressió molt més curt (16 mesos), sí es van observar de manera més freqüent estructures de regressió (dels 5 nevus: 1 estructures vasculares, 2 punts blau-grisos, 3 fibrosi i 1 fenomen de l'halo).

La pèrdua de la melanina ha estat la característica més significativa d'aquests nevus. Es va observar una disminució progressiva de la melanina total en el 78,8%. En aquells nevus en què hi havia melanina dèrmica, en la majoria de casos aquesta va desaparèixer. En aquells nevus on aquesta no desapareixia, el fenomen més freqüent era dipositar-se en capes més profundes, el que podria correspondre a la melanofàgia a nivell histològic .

De manera observacional, una de les característiques de la imatge de SIAscòpia que es va anar repetint en aquests nevus (però que no es va quantificar) va ser l'aparició al llarg del seguiment d'una desestructuració del patró reticular adoptant una morfologia de feixos paral·lels (**figura 42**). Això, conjuntament amb la despigmentació, conformarien les dos característiques principals dels nevus en involució espontània o amb fenomen de "fading" o esvaïment observats en la nostra sèrie.



**Figura 42. Nevus en autoevolució. A i B) nevus 681 (2009 i 2014 respectivament). C i D) nevus 114 (2007 i 2014 respectivament).** Dos nevis en evolució espontània amb patró reticular, amb despigmentació heterogènia i homogènia respectivament i la presència d'una desestructuració del reticle amb l'aparició de feixos paral·lels.

### 3.2. Estudi descriptiu de les característiques dermatoscòpiques, estudi histopatològic i immunohistoquímic dels nevus en autoinvolució

Si la caracterització clínica i dermatoscòpica dels nevus que presenten signes d'autoinvolució o "*fading*" ja està poc descrita, a nivell histopatològic encara són més escassos els estudis.

Sabem que les característiques essencials d'una lesió melanocítica que ha sofert un procés de regressió espontània són la substitució de la població cel·lular tumoral per un estroma fibrós amb quantitats variables de melanòfags, inflamació i neovascularització.

En els nostres nevus, la presència d'infiltrat inflamatori va ser superior en el grup control que en els casos de manera estadísticament significativa. Això es podria explicar per dos motius. En primer lloc, perquè realment aquest mecanisme de "*fading*", que es descriu com "sense inflamació macroscòpica aparent", correspongui també a una absència d'inflamació a nivell histològic. En segon lloc, en el grup control, pràcticament la meitat dels casos eren nevus displàsics, i això explicaria la presència en aquest grup de molta inflamació, troballa comuna en aquest tipus de nevus (26,152). De fet, la mitjana de quantitat d'infiltrat inflamatori en els nevus displàsics del grup control era superior a la dels nevus comuns del mateix grup ( 1,5 i 2,4 respectivament).

A més a més, la distribució d'aquest infiltrat va ser molt més homogènia en els casos mentre que en els controls l'infiltrat era més intens i focal.

Així sembla que ni la presència d'un intens infiltrat inflamatori ni la seva localització al voltant del nevus que està desapareixent serien característiques específiques del fenomen d'autoinvolució o "*fading*".

Respecte al tipus de fibrosi, la que vam observar amb més freqüència és la delicada. En l'únic estudi histològic que hem trobat a la bibliografia que s'ha fet en nevus en autoinvolució, els autors també van observar amb major freqüència una fibrosi delicada de localització

subepidèrmica, que va ser present en un 61,5% dels casos. En segon lloc de freqüència també als dos estudis es va observar fibrosi laminar (85,7% i 38,4% respectivament). Malgrat això, en el nostre treball, va ser significativament més freqüent la presència d'una fibrosi de tipus compacta o laminar en els casos que en els controls. No trobem una explicació raonada d'aquest darrer fet, ja que la fibrosi laminar i compacta està descrita com característica dels nevus displàsics i el melanoma.

En relació a les cèl·lules nèviques apoptòtiques, no es van detectar a cap dels dos grups. La presència d'una intensa apoptosi és una característica molt definitòria dels halo nevus, juntament amb l'absència de fibrosi i la presència d'un infiltrat inflamatori intens. Aquests fets assenyalen que els mecanismes subjacents al fenomen de l'halo nevus són molt diferents als observats en el fenomen d'autoinvolució estudiat per nosaltres.

També vam veure que l'augment de vasos va ser més freqüent en els casos que en els controls de manera estadísticament significativa. Aquest resultat estaria en concordança amb les dades obtingudes a l'estudi de SIAscòpia on vam observar per dermatoscòpia que la presència d'estructures vasculares era la característica de regressió més freqüent en els nevus amb fenomen d'autoinvolució.

Quan es va comparar l'expressió dels diferents marcadors immunohistoquímics, només es van observar diferències estadísticament significatives entre els casos i controls respecte a la caspasa 3 activada amb una major immunoexpressió en els controls. Les caspases comprenen una família de 14 enzims. Es sintetitzen com enzims pro-inactius i s'activen després de la seva escissió en un residu d'aspartat (153). L'activació de caspases és un esdeveniment clau durant l'apoptosi (153, 154). La caspasa 3 es pot activar tant per la via extrínseca com per la via intrínseca de l'apoptosi i es considera una caspasa efectora. Com la caspasa 3 s'activa al citoplasma i posteriorment es translocalitza al nucli per exercir la seva funció, la detecció immunohistoquímica de la caspasa 3 activada permet distingir entre dos etapes de l'apoptosi, inicial o avançada, depenent de que la caspasa 3 activada es detecti al citoplasma o al nucli cel·lular, respectivament (155, 156).



Hi ha també evidència de que les caspases poden tenir altres funcions a més de la inducció de l'apoptosi, com ara la promoció de la proliferació cel·lular, i l'escissió de certes quinases i factors de transcripció (157-159). Per tant, les caspases semblen estar implicades en un delicat equilibri que connecta la mort cel·lular programada amb el procés oposat; la supervivència i la proliferació cel·lular. De fet, hi han estudis que han observat una major expressió de la caspasa 3 activada en metàstasi de melanoma i en el melanoma avançat de manera estadísticament significativa respecte a un grup de nevus comuns (160,161). Aquests resultats estan en la línia amb altres investigacions recents que han mostrat una connexió entre l'expressió de la caspasa 3 i l'augment del comportament maligne en alguns tumors, com ara limfomes, carcinomes colorectals i els càncers de mama (162-164). Els mecanismes exactes pels quals aquests tumors escapen de l'apoptosi fins i tot en presència de les caspases activades estan per esclarir i requereixen noves investigacions.

Segons aquests estudis i tenint en compte els nostres resultats, podríem argumentar que el fet d'existir una major immunoexpressió de caspasa 3 activada citoplasmàtica en el grup control (on la presència de nevus displàsics era important) es deuria precisament a l'atípia histològica dels nevus displàsics i al seu paper controvertit com a marcadors de risc i eventuais precursors de melanoma.

Per altra part, al correlacionar la mitjana de l'*histoscore* de caspasa 3 activada amb la intensitat de l'infiltrat inflamatori, es va observar una correlació positiva només en el cas que l'infiltrat fos molt intens (1 vs 3 a l'escala gradual). Aquest fet es podria explicar de nou simplement perquè, com hem comentat abans, dins del grup control els nevus displàsics (amb atípia histològica) eren majoria. Però també perquè aquest major infiltrat inflamatori fos el responsable de provocar l'inici de l'apoptosi a les cèl·lules nèviques. També aniria en aquesta línia la correlació estadísticament significativa entre l'expressió de caspasa 3 activada i el percentatge de cèl·lules citotòxiques CD8+ en el grup control (que de nou és major als nevus displàsics que als nevus comuns del grup control: mitjanes de 33% vs 25% respectivament). El fet de trobar menys caspasa 3 activada, menys infiltrat inflamatori i menys limfòcits CD8+ (encara que aquests darrers de forma no significativa) en els casos que en els controls podria reflectir, com ja hem comentat, que els mecanismes subjacents a l'autoinvolució/*fading* dels nevus melanocítics fossin diferents a la regressió acompanyada

de fenòmens inflamatoris importants que sovint es veuen tant clínica com histològicament als nevus displàsics. De tota manera, en cap del dos grups es varen identificar histològicament cèl·lules nèviques apoptòtiques ni es va observar caspasa 3 activada de localització nuclear, característica de l'apoptosi avançada. No sabem com acabar d'explicar aquestes troballes. Segurament farien falta series més amples de cadascú dels subtipus de nevus i altres estudis addicionals per esbrinar-les.

També vam estudiar la relació entre els marcadors immunohistoquímics CD123/TIA-1 per tal de determinar si en l'esvaïment d'aquests nevus hi havia un predomini de l'activitat citotòxica (TIA1) o bé si aquest fenomen tenia lloc mitjançant un mecanisme tolerogènic (CD123), però no vam trobar diferències significatives entre casos i controls. Probablement, cap dels dos mecanismes explica aquest fenomen que sí s'ha descrit en els halo nevus i en el melanoma respectivament (99).

# Conclusions



1. El nombre de nevus adquirits a la infància s'associa de forma positiva amb l'edat, el sexe masculí, els fototipus baixos (I i II) i la història prèvia d'exposició al sol.
2. En conjunt, els nevus són més nombrosos al tronc i les extremitats. Els nens tenen més nevus al tronc i les nenes més nevus a les cames.
3. En els nens adolescents (14 anys d'edat), l'ús de protector solar modifica l'efecte de l'exposició solar total sobre el nombre de nevus, amb un major nombre de nevus en els nens que han fet un ús no adequat de la protecció solar durant la vida.
4. L'anticòs VE1 permet identificar la mutació BRAF/V600E amb una sensibilitat del 80% i una especificitat del 83%.
5. S'observa immunopositivitat per BRAF/V600E en el 60% dels nevus melanocítics comuns i el 35% dels displàsics. Dintre del nevus comuns, el percentatge de positivitat als nevus intradèrmics és del 100% i als nevus junturals del 25%.
6. Els patrons dermatoscòpics que mostren menor expressió de BRAF/V600E són el multicomponent i el reticular.
7. Els nevus displàsics mostren nivells significativament més alts de hTERT i més baixos de pRB que els nevus melanocítics comuns adquirits.
8. La immunoexpressió de Cav3.1 és significativament més alta als nevus displàsics que a tots els altres grups histològics de nevus comuns adquirits per separat (junturals, compostos i intradèrmics) i als patrons dermatoscòpics multicomponent i amb glòbuls perifèrics.

9. La dermatoscòpia proporciona informació addicional sobre alguns aspectes de la biologia dels nevus melanocítics adquirits a l'obtinguda segons la classificació histopatològica convencional:
  - a. Els nevus amb patró dermatoscòpic multicomponent presenten significativament menor expressió de p16 i PTEN.
  - b. El patró dermatoscòpic de glòbuls perifèrics mostra el major nivell de Ki67, hTERT i BRAF/V600E.
  
10. L'autoinvolució dels nevus melanocítics és un fenomen comú en els pacients amb síndrome dels nevus displàsic en seguiment mitjançant SIAscòpia.
  - a. Sol ser un procés lent, més freqüent en nevus de patró reticular i localitzats al tronc.
  - b. Histològicament, es caracteritza per escàs infiltrat inflamatori i melanofàgia, fibrosi delicada i augment de vasos.
  - c. A nivell immunohistoquímic, sembla que ni la presència de marcadors clàssics (CD4 i CD8) o resposta citotòxica (granzima B i TIA-1), d'inhibidors de l'activitat de cèl·lules T (FoxP3 i PD1) o de cèl·lules dendrítiques plasmacitoides (CD123) serien definitoris d'aquest fenomen.

# **Bibliografia**





1. Cancer Facts and Figures 2016. American Cancer Society.  
<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-047079.pdf>.
2. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*. 2007;445(7130):851-7.
3. Pollack LA, Li J, Berkowitz Z, Weir HK, Wu XC, Ajani UA, et al. Melanoma survival in the United States, 1992 to 2005. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(5 Suppl 1):S78-86.
4. Lee JS, DuBois SG, Coccia PF, Bleyer A, Olin RL, Goldsby RE. Increased risk of second malignant neoplasms in adolescents and young adults with cancer. *Cancer*. 2016;122(1):116-23.
5. Ríos L NE, López JL, Redondo P, Martí RM, Fernández-de-Misa R, et al. Registro nacional de melanoma cutáneo. Características del tumor en el momento del diagnóstico: 15 años de experiencia. *Actas Dermosifiliogr*. 2013;104(9):789-99.
6. Ekwueme DU, Guy GP, Jr., Li C, Rim SH, Parelkar P, Chen SC. The health burden and economic costs of cutaneous melanoma mortality by race/ethnicity-United States, 2000 to 2006. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(5 Suppl 1):S133-43.
7. Hao M, Song F, Du X, Wang G, Yang Y, Chen K, et al. Advances in targeted therapy for unresectable melanoma: new drugs and combinations. *Cancer Lett*. 2015;359(1):1-8.
8. Shitara D, Tell-Marti G, Badenas C, Enokihara MM, Alos L, Larque AB, et al. Mutational status of naevus-associated melanomas. *Br J Dermatol*. 2015;173(3):671-80.
9. Aguilera P, Puig S, Guilabert A, Julia M, Romero D, Vicente A, et al. Prevalence study of nevi in children from Barcelona. Dermoscopy, constitutional and environmental factors. *Dermatology*. 2009;218(3):203-14.
10. Green A, Siskind V, Hansen ME, Hanson L, Leech P. Melanocytic nevi in schoolchildren in Queensland. *J Am Acad Dermatol*. 1989;20(6):1054-60.
11. Pope DJ, Sorahan T, Marsden JR, Ball PM, Grimley RP, Peck IM. Benign pigmented nevi in children. Prevalence and associated factors: the West Midlands, United Kingdom Mole Study. *Arch Dermatol*. 1992;128(9):1201-6.
12. Whiteman DC, Brown RM, Purdie DM, Hughes MC. Prevalence and anatomical distribution of naevi in young Queensland children. *Int J Cancer*. 2003;106(6):930-3.
13. Harrison SL, Buettner PG, MacLennan R. Body-site distribution of melanocytic nevi in young Australian children. *Arch Dermatol*. 1999;135(1):47-52.
14. Synnerstad I, Nilsson L, Fredrikson M, Rosdahl I. Frequency and distribution pattern of melanocytic naevi in Swedish 8-9-year-old children. *Acta Derm Venereol*. 2004;84(4):271-6.
15. Stierner U, Augustsson A, Rosdahl I, Suurkula M. Regional distribution of common and dysplastic naevi in relation to melanoma site and sun exposure. A case-control study. *Melanoma Res*. 1992;1(5-6):367-75.
16. Bishop JA, Bradburn M, Bergman W, Osterlind A, Pinney E, Rosdahl I, et al. Teaching non-specialist health care professionals how to identify the atypical mole syndrome phenotype: a multinational study. *Br J Dermatol*. 2000;142(2):331-7.
17. Augustsson A, Stierner U, Suurkula M, Rosdahl I. Prevalence of common and dysplastic naevi in a Swedish population. *Br J Dermatol*. 1991;124(2):152-6.
18. Duffy DL, Iles MM, Glass D, Zhu G, Barrett JH, Hoiom V, et al. IRF4 variants have age-specific effects on nevus count and predispose to melanoma. *Am J Hum Genet*. 2010;87(1):6-16.
19. Granovetter M. IRF4 SNP is predictive of melanoma subtypes. *Lancet Oncol*. 2016;17(3):e96.
20. Kvaskoff M, Whiteman DC, Zhao ZZ, Montgomery GW, Martin NG, Hayward NK, et al. Polymorphisms in nevus-associated genes MTAP, PLA2G6, and IRF4 and the risk of invasive cutaneous melanoma. *Twin Res Hum Genet*. 2011;14(5):422-32.
21. Ogbah Z, Badenas C, Harland M, Puig-Butille JA, Elliot F, Bonifaci N, et al. Evaluation of PAX3 genetic variants and nevus number. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013;26(5):666-76.
22. Orlow I, Satagopan JM, Berwick M, Enriquez HL, White KA, Cheung K, et al. Genetic factors associated with nevus count and dermoscopic patterns: preliminary results from the Study of Nevi in Children (SONIC). *Br J Dermatol*. 2015;172(4):1081-9.
23. Fitzpatrick TB JR, Polano MK, Suurmond D, Wolff K. Atlas de Dermatología Clínica. 3a edició ed: Interamericana; 1998.
24. Herrera Ceballos E MC, Requena Caballero L, Rodríguez Peralto JL. Dermatopatología: correlación clínico-patológica. Barcelona: Signament Edicions; 2007.
25. Kincannon J, Boutzale C. The physiology of pigmented nevi. *Pediatrics*. 1999;104(4 Pt 2):1042-5.
26. Duffy K, Grossman D. The dysplastic nevus: from historical perspective to management in the modern era: part I. Historical, histologic, and clinical aspects. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(1):1 e-16; quiz 7-8.

27. Argenziano G, Soyer HP, Chimenti S, Talamini R, Corona R, Sera F, et al. Dermoscopy of pigmented skin lesions: results of a consensus meeting via the Internet. *J Am Acad Dermatol.* 2003;48(5):679-93.
28. Malvehy J, Puig S, Argenziano G, Bauer R, Blum S, Botella R, et al. *Principles of Dermoscopy.* Barcelona: Cege Editors, 2002.
29. Marghoob AA, Kopf AW. *Atlas of Dermoscopy.* London: Taylor & Francis Group; 2005.
30. Stolz W, B-F, Bilek P, Landthaler M, Burgdorf WHC, Cagnetta AB. *Color atlas of Dermatoscopy.* Oxford: Blackwell Publishing Company; 2002.
31. Gilje O. Capillary microscopy in the differential diagnosis of skin diseases. *Acta Derm Venereol.* 1953;33(4):303-17.
32. Unna P. Die Diaskopie der Hautkrankheiten. *Berl Klin Wschr* 1893(42):1016-21.
33. J. S. Die Dermatoskopie, I. Mitteilung. *Arch Dermatol Syphiol.* 1920(128):1-19.
34. Saphier J. Die Dermatoskopie, II. Mitteilung. *Arch Dermatol Syphiol.* 1921(132):69-86.
35. Saphier J. Die Dermatoskopie, III. Mitteilung. *Arch Dermatol Syphiol* 1921(314):314-22.
36. Saphier J. Die Dermatoskopie, IV. *Arch Dermatol Syphiol.* 1921(136):149-58.
37. MacKie RM. An aid to the preoperative assessment of pigmented lesions of the skin. *Br J Dermatol.* 1971;85(3):232-8.
38. Pehamberger H, Steiner A, Wolff K. In vivo epiluminescence microscopy of pigmented skin lesions. I. Pattern analysis of pigmented skin lesions. *J Am Acad Dermatol.* 1987;17(4):571-83.
39. Braun-Falco O, Bilek P, Merkle T, Landthaler M. Das Dermatoskop. Eine Vereinfachung der Auflichtmikroskopie von pigmentierten Hautveränderungen. *Hautarzt.* 1990(41):131-6.
40. Nachbar F, Stolz W, Merkle T, Cagnetta AB, Vogt T, Landthaler M, et al. The ABCD rule of dermatoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. *J Am Acad Dermatol.* 1994;30(4):551-9.
41. Menzies SW, Ingvar C, McCarthy WH. A sensitivity and specificity analysis of the surface microscopy features of invasive melanoma. *Melanoma Res.* 1996;6(1):55-62.
42. Argenziano G, Fabbrocini G, Carli P, De Giorgi V, Sammarco E, Delfino M. Epiluminescence microscopy for the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions. Comparison of the ABCD rule of dermatoscopy and a new 7-point checklist based on pattern analysis. *Arch Dermatol.* 1998;134(12):1563-70.
43. Malvehy J, Puig S, Argenziano G, Marghoob AA, Soyer HP, International Dermoscopy Society Board m. Dermoscopy report: proposal for standardization. Results of a consensus meeting of the International Dermoscopy Society. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(1):84-95.
44. Henning JS, Dusza SW, Wang SQ, Marghoob AA, Rabinovitz HS, Polsky D, et al. The CASH (color, architecture, symmetry, and homogeneity) algorithm for dermoscopy. *J Am Acad Dermatol.* 2007;56(1):45-52.
45. Niederkorn A, Ahlgrim-Siess V, Fink-Puches R, Wolf IH, Richtig E, Lackner HK, et al. Frequency, clinical and dermoscopic features of benign papillomatous melanocytic naevi (Unna type). *Br J Dermatol.* 2009;161(3):510-4.
46. Suwattee P, Schram SE, Warshaw EM. Digital polarized light dermoscopy of clinically nonpigmented dermal nevi. *Dermatol Surg.* 2007;33(9):1120-5.
47. Wazaefi Y, Gaudy-Marqueste C, Avril MF, Malvehy J, Pellacani G, Thomas L, et al. Evidence of a limited intra-individual diversity of nevi: intuitive perception of dominant clusters is a crucial step in the analysis of nevi by dermatologists. *J Invest Dermatol.* 2013;133(10):2355-61.
48. Veà A, Velasco A, Casanova JM, Matias-Guiu X, Martí RM. Utilidad de la siascopia en el diagnóstico de lesiones melanocíticas. *Piel (Barcelona).* 2014;29(10):654-59.
49. Moncrieff M, Cotton S, Claridge E, Hall P. Spectrophotometric intracutaneous analysis: a new technique for imaging pigmented skin lesions. *Br J Dermatol.* 2002;146(3):448-57.
50. Haniffa MA, Lloyd JJ, Lawrence CM. The use of a spectrophotometric intracutaneous analysis device in the real-time diagnosis of melanoma in the setting of a melanoma screening clinic. *Br J Dermatol.* 2007;156(6):1350-2.
51. Novakovic L, Cotton S, Hawk JL. Spectrophotometric intracutaneous analysis as an early non-invasive predictor of efficacy in the phototherapy of psoriasis. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2009;25(2):81-5.
52. Shih B, Sultan MJ, Chaudhry IH, Tan KT, Johal KS, Marstan A, et al. Identification of biomarkers in sequential biopsies of patients with chronic wounds receiving simultaneous acute wounds: a genetic, histological, and noninvasive imaging study. *Wound Repair Regen.* 2012;20(5):757-69.
53. Macia A, Herreros J, Martí RM, Canti C. Calcium channel expression and applicability as targeted therapies in melanoma. *Biomed Res Int.* 2015;2015:587135.

54. Das A, Pushparaj C, Bahi N, Sorolla A, Herreros J, Pamplona R, et al. Functional expression of voltage-gated calcium channels in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25(2):200-12.
55. Das A, Pushparaj C, Herreros J, Nager M, Vilella R, Portero M, et al. T-type calcium channel blockers inhibit autophagy and promote apoptosis of malignant melanoma cells. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26(6):874-85.
56. Maiques O, Macia A, Moreno S, Barcelo C, Santacana M, Veà A, et al. Immunohistochemical analysis of T-type calcium channels in acquired melanocytic naevi and melanoma. *Br J Dermatol.* 2016 [Epub ahead of print]
57. Darlington S, Siskind V, Green L, Green A. Longitudinal study of melanocytic nevi in adolescents. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46(5):715-22.
58. Florell SR, Meyer LJ, Boucher KM, Grossman D, Cannon-Albright LA, Harris RM, et al. Increased melanocytic nevi and nevus density in a G-34T CDKN2A/p16 melanoma-prone pedigree. *J Invest Dermatol.* 2008;128(8):2122-5.
59. Yang XR, Liang X, Pfeiffer RM, Wheeler W, Maeder D, Burdette L, et al. Associations of 9p21 variants with cutaneous malignant melanoma, nevi, and pigmentation phenotypes in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations. *Fam Cancer.* 2010;9(4):625-33.
60. Nan H, Xu M, Zhang J, Zhang M, Kraft P, Qureshi AA, et al. Genome-wide association study identifies nidogen 1 (NID1) as a susceptibility locus to cutaneous nevi and melanoma risk. *Hum Mol Genet.* 2011;20(13):2673-9.
61. Liang X, Pfeiffer RM, Li WQ, Brossard M, Burke LS, Wheeler W, et al. Association of genetic variants in CDK6 and XRCC1 with the risk of dysplastic nevi in melanoma-prone families. *J Invest Dermatol.* 2014;134(2):481-7.
62. Longo C, Pellacani G. Association between genetic factors, naevus count and dermoscopic pattern. *Br J Dermatol.* 2015;172(4):857.
63. Halpern AC, Guerry Dt, Elder DE, Trock B, Synnestvedt M, Humphreys T. Natural history of dysplastic nevi. *J Am Acad Dermatol.* 1993;29(1):51-7.
64. Tucker MA, Fraser MC, Goldstein AM, Struewing JP, King MA, Crawford JT, et al. A natural history of melanomas and dysplastic nevi: an atlas of lesions in melanoma-prone families. *Cancer.* 2002;94(12):3192-209.
65. Dodd AT, Morelli J, Mokrohisky ST, Asdigian N, Byers TE, Crane LA. Melanocytic nevi and sun exposure in a cohort of colorado children: anatomic distribution and site-specific sunburn. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007;16(10):2136-43.
66. English DR, Milne E, Simpson JA. Sun protection and the development of melanocytic nevi in children. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(12):2873-6.
67. Harrison SL, MacKie RM, MacLennan R. Development of melanocytic nevi in the first three years of life. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(17):1436-8.
68. Oliveria SA, Satagopan JM, Geller AC, Dusza SW, Weinstock MA, Berwick M, et al. Study of Nevi in Children (SONIC): baseline findings and predictors of nevus count. *Am J Epidemiol.* 2009;169(1):41-53.
69. Valiukeviciene S, Gollnick H, Stang A. Body-site distribution of common acquired melanocytic nevi associated with severe sunburns among children in Lithuania. *Int J Dermatol.* 2007;46(12):1242-9.
70. Ross AL, Sanchez MI, Grichnik JM. Molecular neovogenesis. *Dermatol Res Pract.* 2011;2011:463184.
71. Luther H, Altmeyer P, Garbe C, Ellwanger U, Jahn S, Hoffmann K, et al. Increase of melanocytic nevus counts in children during 5 years of follow-up and analysis of associated factors. *Arch Dermatol.* 1996;132(12):1473-8.
72. Bennett DC, Medrano EE. Molecular regulation of melanocyte senescence. *Pigment Cell Res.* 2002;15(4):242-50.
73. Tran SL, Haferkamp S, Scurr LL, Gowrishankar K, Becker TM, Desilva C, et al. Absence of distinguishing senescence traits in human melanocytic nevi. *J Invest Dermatol.* 2012;132(9):2226-34.
74. Takata M, Murata H, Saida T. Molecular pathogenesis of malignant melanoma: a different perspective from the studies of melanocytic nevus and acral melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23(1):64-71.
75. Weatherhead SC, Haniffa M, Lawrence CM. Melanomas arising from naevi and de novo melanomas--does origin matter? *Br J Dermatol.* 2007;156(1):72-6.
76. Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry Dt, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum Pathol.* 1984;15(12):1147-65.
77. Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *N Engl J Med.* 2006;355(1):51-65.
78. Scatolini M, Grand MM, Grosso E, Venesio T, Pisacane A, Balsamo A, et al. Altered molecular pathways in melanocytic lesions. *Int J Cancer.* 2010;126(8):1869-81.
79. Duffy K, Grossman D. The dysplastic nevus: from historical perspective to management in the modern era: part II. Molecular aspects and clinical management. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67(1):19 e1-2; quiz 31-2.
80. Ceballos PI, Barnhill RL. Spontaneous regression of cutaneous tumors. *Adv Dermatol.* 1993;8:229-61.
81. Papac RJ. Spontaneous regression of cancer. *Cancer Treat Rev.* 1996;22(6):395-423.

82. Elston DM. Mechanisms of regression. *Clin Med Res.* 2004;2(2):85-8.
83. Papac RJ. Spontaneous regression of cancer: possible mechanisms. *In Vivo.* 1998;12(6):571-8.
84. Emanuel PO, Mannion M, Phelps RG. Complete regression of primary malignant melanoma. *Am J Dermatopathol.* 2008;30(2):178-81.
85. King M, Spooner D, Rowlands DC. Spontaneous regression of metastatic malignant melanoma of the parotid gland and neck lymph nodes: a case report and a review of the literature. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2001;13(6):466-9.
86. High WA, Stewart D, Wilbers CR, Cockerell CJ, Hoang MP, Fitzpatrick JE. Completely regressed primary cutaneous malignant melanoma with nodal and/or visceral metastases: a report of 5 cases and assessment of the literature and diagnostic criteria. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(1):89-100.
87. Kalialis LV, Drzewiecki KT, Klyver H. Spontaneous regression of metastases from melanoma: review of the literature. *Melanoma Res.* 2009;19(5):275-82.
88. Muniesa C, Ferreres JR, Moreno A, Marcoval J. Completely regressed primary cutaneous malignant melanoma with metastases. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2009;23(3):327-8.
89. Moretti S, Spallanzani A, Pinzi C, Prignano F, Fabbri P. Fibrosis in regressing melanoma versus nonfibrosis in halo nevus upon melanocyte disappearance: could it be related to a different cytokine microenvironment? *J Cutan Pathol.* 2007;34(4):301-8.
90. Kittler H, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Follow-up of melanocytic skin lesions with digital epiluminescence microscopy: patterns of modifications observed in early melanoma, atypical nevi, and common nevi. *J Am Acad Dermatol.* 2000;43(3):467-76.
91. Lozzi GP, Piccolo D, Micantonio T, Altamura D, Peris K. Early melanomas dermoscopically characterized by reticular depigmentation. *Arch Dermatol.* 2007;143(6):808-9.
92. Zalaudek I, Catricala C, Moscarella E, Argenziano G. What dermoscopy tells us about nevo genesis. *J Dermatol.* 2011;38(1):16-24.
93. Zalaudek I, Hofmann-Wellenhof R, Kittler H, Argenziano G, Ferrara G, Petrillo L, et al. A dual concept of nevo genesis: theoretical considerations based on dermoscopic features of melanocytic nevi. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2007;5(11):985-92.
94. Kittler H, Selteneheim M, Dawid M, Pehamberger H, Wolff K, Binder M. Frequency and characteristics of enlarging common melanocytic nevi. *Arch Dermatol.* 2000;136(3):316-20.
95. Martin JM, Nunez J, Lopez V, Rubio M, Monteagudo C, Jorda E. Descriptive dermoscopic study of depigmentation in melanocytic nevi without a visible halo. *Actas Dermosifiliogr.* 2011;102(5):344-53.
96. Martin JM, Rubio M, Bella R, Jorda E, Monteagudo C. Complete regression of melanocytic nevi: correlation between clinical, dermoscopic, and histopathologic findings in 13 patients. *Actas Dermosifiliogr.* 2012;103(5):401-10.
97. Vyas R, Rademaker M, Oakley A. An observational case series on dermoscopic patterns of fading melanocytic naevi. *Australas J Dermatol.* 2016 [Epub ahead of print]
98. Terushkin V, Scope A, Halpern AC, Marghoob AA. Pathways to involution of nevi: insights from dermoscopic follow-up. *Arch Dermatol.* 2010;146(4):459-60.
99. Botella-Estrada R, Kutzner H. Study of the immunophenotype of the inflammatory cells in melanomas with regression and halo nevi. *Am J Dermatopathol.* 2015;37(5):376-80.
100. Capper D, Preusser M, Habel A, Sahm F, Ackermann U, Schindler G, et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol.* 2011;122(1):11-9.
101. Busam KJ, Sung J, Wiesner T, von Deimling A, Jungbluth A. Combined BRAF(V600E)-positive melanocytic lesions with large epithelioid cells lacking BAP1 expression and conventional nevocytic melanocytes. *Am J Surg Pathol.* 2013;37(2):193-9.
102. Tschandl P, Berghoff AS, Preusser M, Burgstaller-Muehlbacher S, Pehamberger H, Okamoto I, et al. NRAS and BRAF mutations in melanoma-associated nevi and uninvolved nevi. *PLoS One.* 2013;8(7):e69639.
103. Yeh I, von Deimling A, Bastian BC. Clonal BRAF mutations in melanocytic nevi and initiating role of BRAF in melanocytic neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(12):917-9.
104. Marchetti MA, Kiuru MH, Busam KJ, Marghoob AA, Scope A, Dusza SW, et al. Melanocytic naevi with globular and reticular dermoscopic patterns display distinct BRAF V600E expression profiles and histopathological patterns. *Br J Dermatol.* 2014;171(5):1060-5.
105. Echeverria B, Bulliard JL, Guillen C, Nagore E. Indicators for the total number of melanocytic naevi: an adjunct for screening campaigns. Observational study on 292 patients. *Br J Dermatol.* 2014;170(1):144-9.

106. John T, Liu G, Tsao MS. Overview of molecular testing in non-small-cell lung cancer: mutational analysis, gene copy number, protein expression and other biomarkers of EGFR for the prediction of response to tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*. 2009;28 Suppl 1:S14-23.
107. Puig S, Marcoval J, Paradelo C, Azon A, Bartralot R, Bel S, et al. Melanoma incidence increases in the elderly of Catalonia but not in the younger population: effect of prevention or consequence of immigration? *Acta Derm Venereol*. 2015;95(4):422-6.
108. Milne E, Johnston R, Cross D, Giles-Corti B, English DR. Effect of a school-based sun-protection intervention on the development of melanocytic nevi in children. *Am J Epidemiol*. 2002;155(8):739-45.
109. Carli P, Biggeri A, Nardini P, Salani B, Giannotti B. Epidemiology of atypical melanocytic naevi: an analytical study in a Mediterranean population. *Eur J Cancer Prev*. 1997;6(6):506-11.
110. Oztas P, Ilhan MN, Polat M, Alli N. Clinical and dermoscopic characteristics of melanocytic nevi in Turkish children and their relationship with environmental and constitutional factors. *Dermatol Surg*. 2007;33(5):607-13.
111. Buendia-Eisman A, Palau-Lazaro MC, Arias-Santiago S, Cabrera-Leon A, Serrano-Ortega S. Prevalence of melanocytic nevi in 8- to 10-year-old children in Southern Spain and analysis of associated factors. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(12):1558-64.
112. Gallagher RP, Rivers JK, Lee TK, Bajdik CD, McLean DI, Coldman AJ. Broad-spectrum sunscreen use and the development of new nevi in white children: A randomized controlled trial. *JAMA*. 2000;283(22):2955-60.
113. Ginarte M, Garcia-Caballero T, Fernandez-Redondo V, Beiras A, Toribio J. Expression of growth hormone receptor in benign and malignant cutaneous proliferative entities. *J Cutan Pathol*. 2000;27(6):276-82.
114. Piliouras P, Gilmore S, Wurm EM, Soyer HP, Zalaudek I. New insights in naevogenesis: number, distribution and dermoscopic patterns of naevi in the elderly. *Australas J Dermatol*. 2011;52(4):254-8.
115. Schafer T, Merkl J, Klemm E, Wichmann HE, Ring J, Group KS. The epidemiology of nevi and signs of skin aging in the adult general population: Results of the KORA-survey 2000. *J Invest Dermatol*. 2006;126(7):1490-6.
116. Katalinic A, Kunze U, Schafer T. Epidemiology of cutaneous melanoma and non-melanoma skin cancer in Schleswig-Holstein, Germany: incidence, clinical subtypes, tumour stages and localization (epidemiology of skin cancer). *Br J Dermatol*. 2003;149(6):1200-6.
117. Puig S, Ruiz A, Castel T, Volpini V, Malveyh J, Cardellach F, et al. Inherited susceptibility to several cancers but absence of linkage between dysplastic nevus syndrome and CDKN2A in a melanoma family with a mutation in the CDKN2A (P16INK4A) gene. *Hum Genet*. 1997;101(3):359-64.
118. Weinstock MA, Stryker WS, Stampfer MJ, Lew RA, Willett WC, Sober AJ. Sunlight and dysplastic nevus risk. Results of a clinic-based case-control study. *Cancer*. 1991;67(6):1701-6.
119. Rodenas JM, Delgado-Rodriguez M, Farinas-Alvarez C, Herranz MT, Serrano S. Melanocytic nevi and risk of cutaneous malignant melanoma in southern Spain. *Am J Epidemiol*. 1997;145(11):1020-9.
120. Whiteman DC, Brown RM, Purdie DM, Hughes MC. Melanocytic nevi in very young children: the role of phenotype, sun exposure, and sun protection. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52(1):40-7.
121. Autier P, Boniol M, Severi G, Giles G, Cattaruzza MS, Luther H, et al. The body site distribution of melanocytic naevi in 6-7 year old European children. *Melanoma Res*. 2001;11(2):123-31.
122. Arance Fernández AM AHL, Cerezuela Fuentes P, Ortiz Reina S, Ortega Izquierdo E, Martí Laborda RM, et al. Epidemiological study to evaluate the prevalence of BRAF V600 mutation in patients (pts) diagnosed with advanced melanoma (AM) in routine clinical practice in Spain. *J Clin Oncol* 2015;33:suppl; abstr e20115.
123. Kim SY, Kim SN, Hahn HJ, Lee YW, Choe YB, Ahn KJ. Metaanalysis of BRAF mutations and clinicopathologic characteristics in primary melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2015;72(6):1036-46 e2.
124. Long GV, Wilmott JS, Capper D, Preusser M, Zhang YE, Thompson JF, et al. Immunohistochemistry is highly sensitive and specific for the detection of V600E BRAF mutation in melanoma. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(1):61-5.
125. Fonseca M, Marchetti MA, Chung E, Dusza SW, Burnett ME, Marghoob AA, et al. Cross-sectional analysis of the dermoscopic patterns and structures of melanocytic naevi on the back and legs of adolescents. *Br J Dermatol*. 2015;173(6):1486-93.
126. Zalaudek I, Schmid K, Marghoob AA, Scope A, Manzo M, Moscarella E, et al. Frequency of dermoscopic nevus subtypes by age and body site: a cross-sectional study. *Arch Dermatol*. 2011;147(6):663-70.
127. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med*. 2015;373(20):1926-36.
128. Saroufim M, Habib R, Karram S, Youssef Massad C, Taraif S, Loya A, et al. BRAF analysis on a spectrum of melanocytic neoplasms: an epidemiological study across differing UV regions. *Am J Dermatopathol*. 2014;36(1):68-73.

129. Saroufim M, Novy M, Taraif S, Habib RH, Loya A, Rauscher B, et al. BRAF mutational epidemiology in dysplastic nevi: does different solar UV radiation exposure matter? *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2014;28(5):615-25.
130. Zalaudek I, Guelly C, Pellacani G, Hofmann-Wellenhof R, Trajanoski S, Kittler H, et al. The dermoscopic and histopathological patterns of nevi correlate with the frequency of BRAF mutations. *J Invest Dermatol*. 2011;131(2):542-5.
131. Roh MR, Eliades P, Gupta S, Tsao H. Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015;28(6):661-72.
132. Hafner C, Stoehr R, van Oers JM, Zwarthoff EC, Hofstaedter F, Klein C, et al. The absence of BRAF, FGFR3, and PIK3CA mutations differentiates lentigo simplex from melanocytic nevus and solar lentigo. *J Invest Dermatol*. 2009;129(11):2730-5.
133. Karram S, Novy M, Saroufim M, Loya A, Taraif S, Hureih MA, et al. Predictors of BRAF mutation in melanocytic nevi: analysis across regions with different UV radiation exposure. *Am J Dermatopathol*. 2013;35(4):412-8.
134. Fullen DR, Zhu W, Thomas D, Su LD. hTERT expression in melanocytic lesions: an immunohistochemical study on paraffin-embedded tissue. *J Cutan Pathol*. 2005;32(10):680-4.
135. Lyu SM, Wu JY, Byun JY, Choi HY, Park SH, Choi YW. Expression of Phosphatase and Tensin Homologue, phospho-Akt, and p53 in Acral Benign and Malignant Melanocytic Neoplasms (Benign Nevi, Dysplastic Nevi, and Acral Melanomas). *Ann Dermatol*. 2016;28(5):548-54.
136. Singh RS, Diwan AH, Zhang PS, Prieto VG. Phosphoinositide 3-kinase is not overexpressed in melanocytic lesions. *J Cutan Pathol*. 2007;34(3):220-5.
137. Tsao H, Mihm MC, Jr., Sheehan C. PTEN expression in normal skin, acquired melanocytic nevi, and cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 2003;49(5):865-72.
138. Masaki T, Wang Y, DiGiovanna JJ, Khan SG, Raffeld M, Beltaifa S, et al. High frequency of PTEN mutations in nevi and melanomas from xeroderma pigmentosum patients. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2014;27(3):454-64.
139. Changchien L, Dusza SW, Agero AL, Korzenko AJ, Braun RP, Sachs D, et al. Age- and site-specific variation in the dermoscopic patterns of congenital melanocytic nevi: an aid to accurate classification and assessment of melanocytic nevi. *Arch Dermatol*. 2007;143(8):1007-14.
140. Gupta M, Berk DR, Gray C, Cornelius LA, Bayliss SJ. Morphologic features and natural history of scalp nevi in children. *Arch Dermatol*. 2010;146(5):506-11.
141. Martinka M, Bruecks AK, Trotter MJ. Histologic spectrum of melanocytic nevi removed from patients > 60 years of age. *J Cutan Med Surg*. 2007;11(5):168-73.
142. Pizzichetta MA, Massone C, Grandi G, Pelizzo G, Soyer HP. Morphologic changes of acquired melanocytic nevi with eccentric foci of hyperpigmentation ("Bologna sign") assessed by dermoscopy. *Arch Dermatol*. 2006;142(4):479-83.
143. Gallus S, Naldi L. Longitudinal studies of melanocytic nevi in children: a clue to improve understanding of melanoma in adults. *Arch Dermatol*. 2009;145(2):191-3.
144. Zalaudek I, Grinschgl S, Argenziano G, Marghoob AA, Blum A, Richtig E, et al. Age-related prevalence of dermoscopy patterns in acquired melanocytic naevi. *Br J Dermatol*. 2006;154(2):299-304.
145. Kageshita T, Inoue Y, Ono T. Spontaneous regression of congenital melanocytic nevi without evidence of the halo phenomenon. *Dermatology*. 2003;207(2):193-5.
146. Lee HJ, Ha SJ, Lee SJ, Kim JW. Melanocytic nevus with pregnancy-related changes in size accompanied by apoptosis of nevus cells: a case report. *J Am Acad Dermatol*. 2000;42(5 Pt 2):936-8.
147. Shelley WB. Photographic evidence of the spontaneous involution and disappearance of pigmented nevi; case report. *Arch Dermatol*. 1960;81:208-9.
148. Siskind V, Darlington S, Green L, Green A. Evolution of melanocytic nevi on the faces and necks of adolescents: a 4 y longitudinal study. *J Invest Dermatol*. 2002;118(3):500-4.
149. Scope A, Dusza SW, Marghoob AA, Satagopan JM, Braga Casagrande Tavoloni J, Psaty EL, et al. Clinical and dermoscopic stability and volatility of melanocytic nevi in a population-based cohort of children in Framingham school system. *J Invest Dermatol*. 2011;131(8):1615-21.
150. Kolm I, Di Stefani A, Hofmann-Wellenhof R, Fink-Puches R, Wolf IH, Richtig E, et al. Dermoscopy patterns of halo nevi. *Arch Dermatol*. 2006;142(12):1627-32.
151. Houghton AN, Gold JS, Blachere NE. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(2):134-40.

- 
152. Clemente C, Cochran AJ, Elder DE, Levene A, MacKie RM, Mihm MC, et al. Histopathologic diagnosis of dysplastic nevi: concordance among pathologists convened by the World Health Organization Melanoma Programme. *Hum Pathol.* 1991;22(4):313-9.
153. Wolf BB, Green DR. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem.* 1999;274(29):20049-52.
154. Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.* 2000;10(6):649-55.
155. Bressenot A, Marchal S, Bezdetnaya L, Garrier J, Guillemin F, Plenat F. Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7, or cleaved PARP in monolayer cells and spheroid and subcutaneous xenografts of human carcinoma. *J Histochem Cytochem.* 2009;57(4):289-300.
156. Ramuz O, Isnardon D, Devilard E, Charafe-Jauffret E, Hassoun J, Birg F, et al. Constitutive nuclear localization and initial cytoplasmic apoptotic activation of endogenous caspase-3 evidenced by confocal microscopy. *Int J Exp Pathol.* 2003;84(2):75-81.
157. Los M, Stroh C, Janicke RU, Engels IH, Schulze-Osthoff K. Caspases: more than just killers? *Trends Immunol.* 2001;22(1):31-4.
158. Nyormoi O, Wang Z, Doan D, Ruiz M, McConkey D, Bar-Eli M. Transcription factor AP-2alpha is preferentially cleaved by caspase 6 and degraded by proteasome during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2001;21(15):4856-67.
159. Stegh AH, Peter ME. Apoptosis and caspases. *Cardiol Clin.* 2001;19(1):13-29.
160. Chen N, Gong J, Chen X, Meng W, Huang Y, Zhao F, et al. Caspases and inhibitor of apoptosis proteins in cutaneous and mucosal melanoma: expression profile and clinicopathologic significance. *Hum Pathol.* 2009;40(7):950-6.
161. Woenckhaus C, Giebel J, Failing K, Fenic I, Dittberner T, Poetsch M. Expression of AP-2alpha, c-kit, and cleaved caspase-6 and -3 in naevi and malignant melanomas of the skin. A possible role for caspases in melanoma progression? *J Pathol.* 2003;201(2):278-87.
162. Donoghue S, Baden HS, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma. *Cancer Res.* 1999;59(20):5386-91.
163. Jonges LE, Nagelkerke JF, Ensink NG, van der Velde EA, Tollenaar RA, Fleuren GJ, et al. Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma. *Lab Invest.* 2001;81(5):681-8.
164. Vakkala M, Paakko P, Soini Y. Expression of caspases 3, 6 and 8 is increased in parallel with apoptosis and histological aggressiveness of the breast lesion. *Br J Cancer.* 1999;81(4):592-9.





# **Annex**



## ANNEX 1. Formulari per la recollida de dades de l'estudi de l'epidemiologia dels nevus infantils

**Estudio:**  
**"Epidemiología de los nevus infantiles"**  
 (niños de 14 años)

**Médico que realiza el estudio**  
 Identificación (num HC: \_\_\_\_\_); raza: \_\_\_\_\_ (a rellenar por el médico)

**Sexo**

- (1) varón  
 (2) hembra

Altura \_\_\_\_\_ cm; peso \_\_\_\_\_ kg

**Lugar de nacimiento**

Ciudad \_\_\_\_\_ País \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Modo de realización de la entrevista: postal (1); cara a cara (2); por el propio paciente (3); por teléfono (4); Otros (5) (anotar)

Indique a continuación donde vivió el niño en los siguientes años

Lugar de residencia del niño			
Edad (años)	Año	Ciudad (país)	
		Meses menos soleados (abril-junio)	meses soleados (julio-octubre)
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			

## Protocolo de recogida de datos

Para calcular el número de horas de exposición solar sumaremos las que pasa al aire libre con ropa de verano o deportiva (camiseta y pantalón corto o falda) paseando (primer y segundo año) o en la escuela (patio y clases de educación física, tercer y cuarto año), de lunes a viernes, y en actividades extraescolares durante toda la semana a lo largo de los meses menos soleados de abril a junio. Luego contaremos el número de horas que pasa al aire libre con ropa de verano en la escuela o con ropa deportiva en actividades extraescolares y las que pasa con bañador en la piscina y en la playa, por separado, durante los meses más soleados de julio a septiembre. Para cada situación marque la casilla correspondiente si su hijo estuvo en la situación descrita y en ese caso calcule de forma aproximada el número de horas al día, el número de días a la semana, el número de semanas al mes y el número de meses. En cuanto a los meses hemos de tener en cuenta que en el período de 2 a 4 años los hemos de contar respecto a un total de 9 meses, entre los 5 y los 8 años respecto a 12 meses y entre los 9 y los 14 respecto a 18 meses en cada una de las dos tablas.

### 1. Número de horas de sol

abril-junio					
Edad (años)	Situación	horas al día	días a la semana	semanas al mes	meses
1	? Al aire libre con ropa de verano o deportiva de 9 a 17h				
2-4	? Al aire libre con ropa de verano o deportiva de 9 a 17h				
5-8	? Al aire libre con ropa de verano o deportiva de 9 a 17h				
9-14	? Al aire libre con ropa de verano o deportiva de 9 a 17h				

julio-septiembre					
Edad (años)	Situación	horas al día	días a la semana	semanas al mes	meses
1	? Al aire libre con ropa deportiva o de verano de 9 a 17h				
	? En la piscina descubierta con bañador de 9 a 17h				
	? En la playa con traje de baño de 9 a 17h				
2-4	? Al aire libre con ropa deportiva o de verano de 9 a 17h				
	? En la piscina descubierta con bañador de 9 a 17h				
	? En la playa con bañador de 9 a 17h				
5-8	? Al aire libre con ropa deportiva o de verano de 9 a 17h				
	? En la piscina descubierta con bañador de 9 a 17h				
	? En la playa con bañador de 9 a 17h				
9-14	? Al aire libre con ropa deportiva o de verano de 9 a 17h				
	? En la piscina descubierta con bañador de 9 a 17h				
	? En la playa con bañador de 9 a 17h				

## 2. Tipo de piel

### 1. ¿Qué color de pelo tiene su hijo?

1. pelirrojo
2. claro (castaño claro o rubio)
3. oscuro (castaño oscuro o negro)

### 2. ¿De que color tiene su hijo los ojos?

1. oscuro (marrón o negro)
2. claro (azul, gris o verde)

### 3. ¿Qué color tiene la piel de su hijo en las zonas donde no le toca el sol (cara interna de los brazos)?

1. completamente blanco
2. bastante claro
3. marrón claro
4. marrón medio
5. amarillento (pacientes de ascendencia asiática)
6. marrón oscuro
7. casi negro
8. otro (especificar)

### 4. ¿Qué sucede cuando su hijo juega en la playa sin fotoprotector?

1. se pone muy moreno
2. se pone moreno
3. suele ponerse rojo, sólo alguna vez se ha puesto un poco moreno
4. no se pone moreno, siempre se pone rojo
5. no se
6. siempre le pongo fotoprotector

### 5. En general, ¿como reacciona la piel de su hijo respecto al sol?

1. siempre se quema, nunca se pone moreno
2. casi siempre se quema, pero consigue ponerse un poco moreno
3. casi nunca se quema, casi siempre se pone moreno
4. nunca se quema, siempre se pone moreno
5. no se

### 3. Uso del fotoprotector

Uso del fotoprotector					
Edad (años)	Situación	Siempre o casi siempre	La mitad de las veces	Pocas veces	Nunca o casi nunca
1	? Durante el primer año de vida, ¿le puso crema o loción fotoprotectora cuando estaba de paseo al aire libre con camiseta de manga corta y/o pantalones cortos?				
	? ¿le puso crema o loción fotoprotectora a su hijo cuando llevaba bañador en la piscina?				
	? ¿le puso crema o loción fotoprotectora a su hijo cuando jugaba en la playa con bañador?				
2-4	?? Cuándo su hijo tenía entre 2 y 4 años, ¿le ponía crema o loción fotoprotectora cuando estaba de paseo al aire libre con camiseta de manga corta y/o pantalones cortos?				
	? ¿le ponía crema o loción fotoprotectora cuando iban a la piscina?				
	? ¿le ponía crema o loción fotoprotectora cuando estaba en la playa con traje de baño?				
5-8	? ¿Cuándo su hijo tenía entre 5 y 8 años, ¿le ponía crema o loción fotoprotectora cuando estaba de paseo al aire libre con camiseta de manga corta y/o pantalones cortos?				
	? ¿le ponía crema o loción fotoprotectora cuando iban a la piscina?				
	? ¿le ponía crema o loción fotoprotectora cuando estaba en la playa con traje de baño?				
9-14	?? Entre los 9 y 14 años, ¿se pone su hijo crema o loción fotoprotectora cuando está paseando o realizando actividades extraescolares al aire libre con camiseta de manga corta y/o pantalones cortos?				
	? ¿se pone crema o loción fotoprotectora cuando va a la piscina?				
	? ¿se pone crema o loción fotoprotectora cuando está en la playa con traje de baño?				

#### 1. Por lo general, cuando su hijo está expuesto al sol en la piscina o la playa durante varias horas, ¿le vuelve a aplicar la crema fotoprotectora?

1. Si, a las 2 horas
2. Si, por la tarde
3. muy pocas veces
4. nunca o casi nunca

#### 2. ¿Qué factor de protección solar llevan las cremas que le pone a su hijo?

1. 0-8
2. 9-15
3. 15-30
4. > 30
5. No sabe
6. No usa

## 4. Quemaduras

### 1. ¿Qué sucedería si su hijo se expusiera al sol por primera vez en verano durante media hora al mediodía sin fotoprotector?

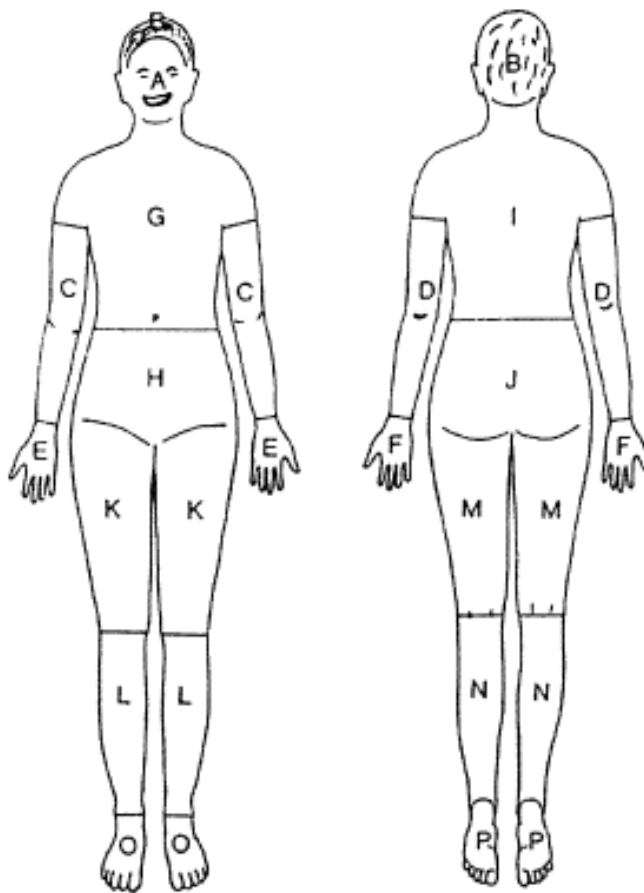
1. le aparecería una quemadura importante con ampollas
2. le aparecería una quemadura dolorosa durante unos días y luego la piel le descama
3. tendría una pequeña quemadura (se pondría rojo) y luego se pondría un poco moreno
4. se pondría moreno sin quemarse
5. no se
6. a mi hijo le ponemos siempre el fotoprotector

### 2. ¿Cuántas quemaduras fuertes, dolorosas pero sin ampollas, ha tenido su hijo hasta ahora?

1. Ninguna
2. 1-2
3. 3-5
4. 6-10
5. > 10

### 3. ¿Cuántas quemaduras importantes, con ampollas, ha tenido su hijo hasta ahora?

1. Ninguna
2. 1-2
3. 3-5
4. >5

**ANNEX 2. Figura esquemàtica pel registre dels nevus infantils**



**ANNEX 3. Procediments i variables analítiques optimitzades per cada un dels anticossos emprats en l'estudi de senescència i autoinvolució**

Antigen	Patró tintorial	Clona	Pretractament	Dilució	Casa comercial
<b>Ki67</b>	Nuclear	MIB-1	Baix	RTU	Dako (Glostrup, Denmark)
<b>Cyclin D1</b>	Nuclear i citoplasmàtic	EP12	Alt	RTU	Dako (Glostrup, Denmark)
<b>p16</b>	Nuclear i citoplasmàtic	E6H4	Baix	RTU	Ventana (Tucson, USA)
<b>p53</b>	Nuclear	DO-7	Alt	RTU	Dako (Glostrup, Denmark)
<b>pRB</b>	Nuclear	1F8	Alt	1/100	Abcam (Cambridge, United Kingdom)
<b>hTERT</b>	Nuclear i citoplasmàtic	2C4	Baix	1/200	Abcam (Cambridge, United Kingdom)
<b>PTEN</b>	Nuclear i citoplasmàtic	6H2.1	Alt, 95°C 20 min	1/100	Dako (Glostrup, Denmark)
<b>BRAF/V600E</b>	Citoplasmàtic	VE1	*	RTU	Ventana (Tucson, USA)
<b>Cav 3.1</b>	Membrana i citoplasmàtic	Policlonal	Baix	1/150	Antibody BCN (Barcelona, Spain)
<b>Cav 3.2</b>	Membrana, citoplasmàtic i nuclear ocasionalment	Policlonal	Alt	1/200	Antibody BCN (Barcelona, Spain)
<b>Casp3A</b>	Nuclear (limfòcits) i citoplasmàtic (en cèl·lules de nevus)	C92-605	Baix	1/100	BD Biosciences (California, USA)
<b>TIA-1</b>	Citoplasmàtic	TIA-1	Alt	1/100	Abcam (Cambridge, United Kingdom)
<b>Granzima B</b>	Citoplasmàtic	11F1	Alt	1/100	Leica Biosystems (Newcastle, United Kingdom)
<b>CD123</b>	Membrana	BR4MS	Alt	1/100	Leica Biosystems (Newcastle, United Kingdom)
<b>FoxP3</b>	Citoplasmàtic	D2W8E	Baix	1/200	Cell Signaling ( Massachusetts, USA)
<b>PD1</b>	Citoplasmàtic	NAT105	Baix	1/100	Abcam (Cambridge, United Kingdom)
<b>CD3</b>	Nuclear	Policlonal	Alt	RTU	Dako (Glostrup, Denmark)
<b>CD4</b>	Nuclear	4B12	Alt	RTU	Dako (Glostrup, Denmark)
<b>CD8</b>	Nuclear	CB8/144B	Alt	RTU	Dako (Glostrup, Denmark)

