

### **III. MATERIAL Y METODOS**

#### **1. Diseño del estudio**

Para alcanzar los objetivos marcados disponemos del material procedente de la Unidad de Melanomas del Servicio de Dermatología del Hospital Clínico Universitario San Cecilio de Granada (HCUGR) con el que realizamos un estudio retrospectivo que incluye distintas variables clínicas, anatomopatológicas y evolutivas.

#### **2. Selección de la muestra**

La muestra de nuestro estudio está formada por 70 pacientes con distintas formas anatomoclínicas de melanoma de extremidades superiores e inferiores, que consultaron en la Unidad de Melanomas del Servicio de Dermatología de nuestro Hospital en los años 1987 a 1996 ambos incluidos.

##### *Criterios de inclusión*

- Consulta entre enero de 1987 y diciembre 1996.
- Tiempo de observación no inferior a cinco años.
- Pieza operatoria. Todos los casos analizados se corresponden con MC primarios extirpados y analizados en nuestro Centro.

##### *Criterios de exclusión*

- Pérdida a lo largo del periodo de observación.
- Tiempo de observación inferior a cinco años.
- Ausencia de pieza histológica.

#### **3. Ámbito del estudio**

Temporal.- Desde enero de 1987 a diciembre de 1996 con el fin de disponer de un período de observación mínimo de 5 años ya que la recogida de datos clínicos

finalizó en Julio de 2001. El seguimiento se realizó desde la fecha de intervención hasta la fecha de cierre del estudio o hasta la aparición de metástasis.

Poblacional y geográfico.- Estos pacientes procedían de las provincias de Almería, Granada y Jaén. Todos ellos consultaron en la Unidad de Melanomas del Servicio de Dermatología del Hospital Universitario San Cecilio de Granada. A todos ellos le realizamos diagnóstico y extirpación quirúrgica del tumor primitivo y áreas ganglionares cuando fue preciso (disección ganglionar terapéutica) y seguimiento mínimo durante cinco años.

En ningún caso se realizó terapia adyuvante, que se reservó sólo para pacientes que presentaron metástasis ganglionares (Estadio III de la AJCC).

#### **4. Recogida de datos**

##### **4.1.- Clínico-epidemiológicos**

A todos los pacientes se les aplicó un protocolo de recogida de datos clínicos y epidemiológicos (**Tabla 8**) que incluye:

Datos de filiación: Apellidos, nombre, edad y sexo.

La edad la agrupamos en seis niveles:

- 1 : Menor de 40 años.
- 2 : Mayor de 40 y menor de 50 años.
- 3 : Mayor de 50 y menor de 60 años.
- 4 : Mayor de 60 y menor de 70 años.
- 5 : Mayor de 70 y menor de 80 años.
- 6 : Mayor de 80.

Fechas de interés en la evolución del paciente que incluye la fecha de la primera consulta, la de la intervención, la del último control (siempre superior a 5 años) y la de aparición de la primera metástasis en los casos que ocurrió. Cuando se resta la

fecha de aparición de la primera metástasis de la de intervención obtenemos el tiempo libre de enfermedad que en los casos en que no aparecieron metástasis es el tiempo transcurrido desde la intervención hasta la última revisión.

Características fenotípicas del paciente que incluye las variables:

1. Color de los ojos (claros vs. oscuros)
2. Color del pelo (negros, castaño o rubio)
3. Fototipo
4. Raza (blanca, negra y etnia gitana)

Características socioeconómicas: Profesión

Antecedentes de interés:

1. Antecedentes de tumor previo
2. Exposición solar profesional/exposición solar no profesional
3. Número de horas de exposición global.

Para calcular las horas de exposición solar acumulada seguimos una fórmula que multiplica el número de horas de exposición diaria por el número de días de la semana, por el número de semanas del mes, por el número de meses del año y por el número de años. Incluimos los antecedentes de quemaduras solares y si han sido frecuentes (más de cinco) y la posible exposición a fuentes artificiales de radiación ultravioleta. La exposición solar total acumulada la agrupamos en más o menos de diez mil horas.

Asociaciones a precáncer, número de nevus (menos de 20 ó más de 20) contados por un solo observador con el paciente desnudo y asociación con cáncer cutáneo no-melanoma (Carcinoma espinocelular, Carcinoma basocelular,...) o melanoma, linfomas y otras enfermedades cutáneas o sistémicas.

Características del tumor, con las variables forma anatomoclínica (SSM, MN, y MLA y en el análisis bivariante MP= Polipoide), Pigmentado (sí ó no), Diámetro mayor y menor en milímetros, la localización

en las distintas regiones. En cada caso se especifica si el tumor está una zona fotoexpuesta o no. También se incluye el tiempo de evolución que refiere el paciente.

#### **4.2.- Histológicos**

Obtenidos por el estudio anatomopatológico de las piezas quirúrgicas de los pacientes intervenidos de nuestro Servicio, donde se había realizado la biopsia excisional del tumor primitivo o la extirpación quirúrgica del primario, y que nos fue facilitada por el Servicios de Anatomía Patológica de nuestro hospital.

A todos ellos le aplicamos el protocolo de recogida de datos recomendado en Conferencia de Consenso (NIH, 1992) y realizado en la Unidad de Dermatopatología (Prof. J. Linares Solano) del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Cecilio de Granada (**Tabla 9**) que incluye:

- Espesor del tumor en milímetros medido según la técnica de Breslow (Breslow A, 1970).
- Espesor agrupado en cuatro categorías (Balch CM,2001):
  - 1.- < 1 mm.
  2. - De 1-2 mm.
  3. - De 2-4 mm
  4. - > de 4 mm.
- Nivel de invasión en profundidad medido según Clark (Clark WH, 1969).
- Márgenes libres vs. invadidos.
- Presencia o ausencia de ulceración.
- Presencia o ausencia de satelitosis.

- Número de mitosis por mm<sup>2</sup>. Se consideran tres grupos:
  1. - Menos de una mitosis por mm<sup>2</sup>.
  2. - Entre 2 y 5 mitosis por mm<sup>2</sup>.
  3. - Más de cinco. (Clark WH, 1989).
  
- Presencia e intensidad de infiltrado linfocitario:
  1. Ligero (<25%)
  2. Moderado (25-50%)
  3. Intenso (>50%)
  4. Ausente.
  
- Fase de crecimiento, radial, vertical o ambas.
- Citología: epitelioides, fusocelular, mixta, pleomórfica, balonizante ó linfocitoide.
- Invasión angiolinfática
- Invasión perineural
- Elastosis
- Satelitosis

#### **4.3. – Inmunohistoquímicos**

De los 70 pacientes incluidos en nuestro estudio seleccionamos **37** en los que el bloque de parafina incluye la pieza con suficiente tejido para realizar las técnicas de inmunohistoquímica y biología molecular (PCR). Estos pacientes se han dividido en dos grupos:

- El primero formado por 21 enfermos que a lo largo del periodo de observación desarrollaron metástasis.
- Un segundo grupo formado por 16 pacientes con un espesor superior a 1,5 mm pero en los que no aparecieron metástasis en el periodo de observación. En este grupo se perdieron 2 tumores por no disponer de la cantidad de material

suficiente en el bloque de parafina para realizar las técnicas inmunohistoquímicas, por lo que el grupo final estaba integrado por 14 pacientes.

A ambos grupos se les completó el protocolo de técnicas de inmunohistoquímica, que realizamos en el Servicio de Anatomía Patológica del HCUSC.

#### Técnicas Inmunohistoquímicas realizadas sobre cortes parafinados.

Empleamos el método de Estreptavidina-Biotina con fosfatasa alcalina y distintos monoclonales suministrados por la casa *Master-Diagnóstica España*.

#### Reactivos empleados.

- Solución Buffer. TBS (*Tris Buffer salino*) 0,05 M a un pH de 7.4.
- Tween 20 al 0,2% (Merk, Alemania).
- Antisuero primario. Inmunoglobulinas de ratón (Master Diagnóstica E.).
- Estreptavidina-Biotina-Fosfatasa.
- Sustrato cromogénico con Levamisol (fast red tr salt).
- Hematoxilina de Mayer
- Medio de montaje Acuatex 8562 (Merck, Alemania).

#### Descripción de la técnica

- Realizamos secciones del bloque de parafina de 4  $\mu$  de grosor que montamos sobre portaobjetos y dejamos secar en estufa a 37°C.
- Desparafinar en dos baños de xileno de 10 minutos de duración cada baño, seguido de un nuevo baño de xileno para limpiar y dos baños en alcohol absoluto con el fin de retirar el exceso de xileno.
- Hidratación progresiva con dos baños de alcohol absoluto, un baño con alcohol de 95%, uno de 70%, uno de 50% y dos baños con agua destilada.

- Desenmascaramiento antigénico en olla exprés durante dos minutos a la máxima potencia.
- Lavado con TBS. Tres lavados de tres minutos de duración cada uno. Secado de los portaobjetos.
- Incubar con suero normal de cabra en cámara de incubación con atmósfera húmeda durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Retirar el exceso de suero sin lavar y secar.
- Incubar con el antisuero primario durante 16 horas a 4°C en cámara húmeda.
- Lavar tres veces en TBS durante tres minutos cada vez.
- Incubar con el anticuerpo secundario biotinado antiratón y anticonejo durante treinta minutos a la temperatura ambiente en cámara húmeda y absorción con suero de rata.
- Lavar tres veces en TBS durante tres minutos cada vez y secar.
- Aplicar el conjugado de estreptavidina-fosfatasa alcalina (Master Diagnóstica España) durante treinta minutos en cámara húmeda y a temperatura ambiente.
- Lavar tres veces en TBS durante tres minutos cada vez y secar.
- Aplicar es sustrato cromogénico (FAST RED TR SALT. Biogenex, USA) hasta observar bajo control microscópico la tinción deseada.
- Lavar con agua durante 5 minutos.
- Contrastar con Hematoxilina de Mayer.
- Lavar con agua corriente y a continuación con agua destilada.
- Las preparaciones aún húmedas se montan con medio acuoso Auatex (Merck 8562).

Relación de anticuerpos monoclonales empleado. Todos suministrados por *Master Diagnóstica España*.

- p53.
- Ki 67.
- HMB45
- Proteína S-100

La lectura la realizamos con microscopio óptico y se interpreta por el mismo observador. Se considera positivo cuando hay expresión y negativo cuando está ausente. La intensidad de la expresión la consideramos ligera ó + cuando la expresión se produce en menos del 25% de las células; moderada ó ++ cuando es del cincuenta por ciento e intensa (+++) cuando ocurre en más del 50%. La localización de la expresión la consideramos uniforme cuando afecta a todo el tumor y focal cuando se distribuye formando focos de tinción bien separados y que puede ser superficial si se dispone en la parte superficial de tumor o profunda.

#### **4.4.- Determinación de la pérdida de heterocigosidad del gen p53**

En los 21 pacientes que desarrollaron metástasis y en los 14 de espesor superior a 1,5 mm que no metastatizaron, se procedió al estudio de la pérdida de heterocigosidad del locus p53 (LOH) mediante la amplificación del exón 4 del gen p53 a partir de ADN total del tejido tumoral y posterior análisis de polimorfismo de restricción (RFLP) para ambos alelos.

##### 1.- Componentes del Kit de determinación

a) Para la extracción del ADN:

- Aceite mineral estéril: 30 ml
- Solución de lisis: 2 ml
- Solución de proteasa: 3 viales x 20 µl

b) Para la reacción de amplificación:

- Tubos p53 mix: Cada vial/ 44,5 µl
- ADN polimerasa (2U/ml): 1 vial x 30 µl

c) Para la digestión con endonucleasas de restricción:

- Tubos con mezcla de digestión: 1 vial x 14,5 ml
- Endonucleasa de restricción: 30 ml

d) Para la electroforesis:

- Gel de agarosa
- Tampón de electroforesis TBE5x
- Tampón de carga 6x 600 µl
- Marcador de peso molecular (pUC19/Hpall)
- Bromuro de Etidio (10 mg/ml)

El Kit se transporta y almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Una vez descongelada la solución de lisis se puede guardar a  $-4^{\circ}\text{C}$  sin necesidad de volver a ser congelada.

## 2.- Procedimiento de extracción del ADN

1. Tomar 2-6 secciones de tejido de 10 µm de grosor (según la cantidad de material presente en cada sección) y colocar en tubo de microcentrífuga de 1,5 ml valiéndose de una aguja o unas pinzas finas.
2. Extraer la parafina con 1 ml de xileno y agitar en vortex durante 2-5 minutos hasta que la parafina quede completamente solubilizada.
3. Centrifugar 5 minutos a velocidad máxima en microcentrífuga. Retirar el sobrenadante cuidadosamente para no arrastrar tejido (se puede hacer con capilar obtenido a partir de una pipeta Pasteur).
4. Repetir los pasos 2-3.
5. Resuspender el pellet en 1 ml de etanol 100%, agitar y centrifugar 2 minutos a velocidad máxima. Retirar el sobrenadante y repetir el lavado con etanol 2 veces más.
6. Eliminar muy bien los restos de etanol y dejar secar al aire libre. El tejido se debe quedar completamente seco (para facilitar el secado se puede introducir en un horno o estufa y calentar a  $40-50^{\circ}$ ). Una vez seco el tejido se pueden guardar las muestras a temperatura ambiente durante varias horas o días).
7. Al botón de tejido resultante añadir 50 µl de solución de lisis y 1 µl de solución de proteasa (se descongela justo en el momento de usar y se

mantiene en hielo). Agitar varias veces con la micropipeta, centrifugar 5 segundos para eliminar las burbujas e incubar 3 horas a 55°C. El rendimiento del ADN se incrementa prolongando el tiempo de incubación hasta 24-48h y reponiendo 1µl de solución de proteasa cada 12 horas. Esta incubación prolongada es recomendable para obtener resultados óptimos sobre todo si el tejido no ha sido fijado en condiciones idóneas de tiempo y tamponamiento.

8. Calentar a 95°C durante 8-10 minutos para inactivar la proteasa.
9. Centrifugar 5 min a velocidad máxima y recoger el sobrenadante (contiene el ADN) evitando tomar restos de tejido del fondo del tubo. Usar 5 µl de esta solución de ADN para amplificar. La muestra se puede almacenar a -20°C hasta ser analizada, siendo estable al menos durante 1 semana.

### 3.- Reacción de amplificación

Descongelar 1 tubo p53 MIX por cada muestra y añadir 0,5 ml de ADN polimerasa y 5 ml de muestra de ADN.

Se mezclarán bien los 2 tubos y se añadirán 50 µl de aceite mineral (opcional según el tipo de termociclador) y se centrifugará 5 minutos en una centrífuga. Se colocarán todos los tubos en un termociclador y se programará en las siguientes condiciones:

94°C 5 minutos

40 ciclos:

94°C 45 sg

60°C 45 sg

72°C 45 sg

72°C 4 min

Mantener los tubos refrigerados a 4°C cuando finalice la reacción.

#### 4.- Electroforesis de los productos amplificados

Dada la elevada sensibilidad de la técnica de amplificación que genera cantidades elevadas de un fragmento específico de ADN, dicho producto amplificado representa una potente fuente de contaminación en el laboratorio. Es recomendable llevar a cabo la manipulación y electroforesis de los productos amplificados en una zona de trabajo alejada del lugar donde se realiza el procesamiento de las muestras para evitar la contaminación de éstas con el ADN amplificado que podría conducir a falsos diagnósticos positivos.

Tras finalizar la reacción de amplificación es necesario comprobar que el proceso ha transcurrido correctamente, por lo que se debe chequear una alícuota de los productos amplificados mediante electroforesis en geles de agarosa:

- a) Se retira la envoltura del gel de agarosa y se coloca en la cubeta de electroforesis
- b) Se prepara el tampón de electroforesis TBE 1x en cantidad suficiente para que el gel se quede completamente sumergido dentro de la cubeta. Se añaden 20 ml de solución de Bromuro de Etidio (cantidad para un volumen aproximado de 400 ml de tampón TBE 1x).
- c) Tomar 10 ml del producto amplificado, pasar a un tubo eppendorf y añadir 2 ml de tampón de carga. Cargar las muestras en pocillos y colocar en uno de los carriles 10 ml del marcador de peso molecular. Correr la electroforesis 1h a 100 V.

En todos los casos debe aparecer una banda de 192 pb correspondiente al exón 4 del gen p53, lo que indica que el proceso de manipulación de la muestra y extracción del ADN han sido correctos.

La ausencia de amplificación indicaría:

1. El tejido no ha sido fijado en condiciones adecuadas, con lo cual el rendimiento, así como la calidad del ADN serían muy bajas. Este

problema se puede solucionar prolongando el tiempo de incubación del tejido con la solución de lisis o purificando el ADN del sobrenadante.

2. El problema puede estar en la cantidad de material de partida: Si el tamaño de la muestra es muy pequeño, convendría repetir incrementando el número de secciones de parafina.

## 5.- Análisis del polimorfismo de restricción de los alelos del gen p53

### *A. Digestión con endonucleasas de restricción*

1. Descongelar un tubo con la mezcla para digestión con endonucleasa por cada muestra y añadir:
  - Endonucleasa de restricción (10 U/ $\mu$ l): 0,5  $\mu$ l
  - Producto de amplificación: 15  $\mu$ l
2. Centrifugar 5 seg para eliminar las burbujas
3. Incubar durante 2-4 horas en un baño termostatzado a 60°C (Se puede emplear el termociclador).

Tras finalizar la digestión se puede guardar la muestra a -20°C o bien proceder directamente a la electroforesis.

### *B. Electroforesis*

Se retira la envoltura del gel de agarosa y se coloca en la cubeta de electroforesis. Se prepara el tampón de electroforesis TBE 1x en cantidad suficiente para que el gel quede completamente sumergido dentro de la cubeta. Añadir 20 ml de la solución de Bromuro de Etidio (cantidad para un volumen aproximado de 400  $\mu$ l de tampón TBE 1x).

Tras finalizar la digestión enzimática, a cada tubo de la digestión con endonucleasa (30  $\mu$ l) del paso anterior se debe añadir 5  $\mu$ l de tampón de carga para electroforesis y cargar en los pocillos del gel de agarosa.

Cargar 10  $\mu$ l del marcador de peso molecular en uno de los pocillos del extremo del gel. Conectar a la fuente y dejar correr la electroforesis durante 1 h a 100 V. Visualizar los resultados mediante un transiluminador con luz ultravioleta y fotografiar.

#### 6.- Interpretación de los resultados

Alelo A1: Ausencia de corte con la endonucleasa de restricción (Banda de 192 pb)

Alelo A2: Corte con la endonucleasa de restricción (Bandas de 85-87 pb)

Si los 2 alelos del exón 4 son polimórficos para el sitio de restricción que reconoce la endonucleasa de restricción, en la electroforesis se apreciarían 3 bandas: una de 192 pb, correspondiente al alelo A1, que carece de sitio de restricción y 2 bandas de 85-87 pb ( se visualizan como una única porque en geles de agarosa se solapan) correspondientes al alelo A2 que posee el sitio de restricción. Este sería el caso de un individuo heterocigoto.

Los individuos que hayan perdido el alelo A1, sólo mantienen el alelo A2 y el resultado tras la amplificación y digestión enzimática sería de 2 bandas de 85-87 pb.

Los individuos que hayan perdido el alelo A2, conservan sólo el alelo A1 y el resultado sería una banda de 192 pb.

Sin embargo, es necesario asegurarse que el tumor ha perdido el alelo y que no se trata de un individuo con los 2 alelos homocigotos de partida. Para ello se deben comparar en paralelo los patrones que representan el ADN del tumor y el ADN de tejido normal en el mismo paciente. Si en los resultados se visualiza un patrón heterocigoto pero no todas las bandas son de intensidad similar habría que

sospechar que la muestra del tumor está contaminada con tejido normal que genera bandas de patrón heterocigoto.

Esquemáticamente los resultados que se pueden obtener son:

- a) Individuo heterocigoto (alelos A1 y A2)
- b) LOH del alelo A1 (queda el alelo A2)
- c) LOH del alelo A2 (queda el alelo A1)

## **5. Procesamiento de la información obtenida.**

Se diseñó una base de datos mediante el gestor Open Access en el que se realizó una plantilla de entrada de datos que incluía cada una de las variables estudiadas. Una vez introducida la información se procedió a la depuración, codificación y etiquetado de los datos.

## **6. Análisis estadístico de los datos.**

El análisis de los datos se ha realizado con el paquete estadístico SPSS versión 10.0. El nivel de significación establecido fue  $\alpha=0.05$  y la prueba de significación utilizada fue bilateral.

**Análisis descriptivo univariante.** El análisis descriptivo de las variables cuantitativas se presenta mediante tablas de frecuencias y porcentajes, mientras que para las variables cuantitativas se calcularon medidas de tendencia central (media, mediana), de dispersión (desviación típica, rango) y un intervalo de confianza para la media.

**Análisis bivalente:** Para la comparación entre variables dicotómicas y cuantitativas se utilizó como contraste el proporcionado por los estadísticos T de Student y U de Mann-Whitney como prueba no paramétrica.

Para la comparación de variables categóricas con cuantitativas se utilizó como contraste el proporcionado por los estadísticos F de Snedecor del Análisis de la Varianza y por Kruskal-Wallis como prueba no paramétrica. Para las comparaciones a posteriori se utilizaron la prueba de Bonferroni y la C de Dunnett.

Para la comparación de variables categóricas con ordinales se utilizó como contraste el proporcionado por Jonckheere-Terpstra como prueba no paramétrica.

Para contrastar la independencia entre variables categóricas se utilizó el estadístico  $\chi^2$  de Pearson y el test exacto de Fisher como prueba no paramétrica.

Como medidas de asociación se han utilizado el estadístico Phi y la razón de ventajas (Odds Ratios) con su intervalo de confianza.

El análisis de correlación entre variables cuantitativas y ordinales se llevó a cabo mediante el coeficiente de correlación de Pearson y el de Spearman.

En todo momento se realizaron contrastes previos a las pruebas estadísticas, con el objeto de aplicar siempre aquella prueba más adecuada. Se utilizó el método exacto y el de Monte Carlo, con el fin obtener resultados exactos cuando los datos no cumplían alguno de los supuestos subyacentes necesarios para obtener resultados fiables con el empleo del método asintótico típico.

**Análisis gráfico:** Para dar una mayor interpretación y visualización de los resultados estadísticos obtenidos, se realizaron gráficos de barras para el análisis descriptivo y de barras de error (media e intervalo de confianza al 95%) para el análisis bivariante y el multivariante.

**Análisis multivariante.** Se han ajustado modelos de regresión logística binaria multivariante para estudiar factores asociados a la aparición de metástasis.

Como variable dependiente se ha considerado **metástasis** medida de manera dicotómica, y como variables independientes se incluyeron: por una parte

todas las variables asociadas de manera significativa con la aparición de metástasis (extraídas del análisis bivalente) y por otra parte todas aquellas variables que, sin estar asociadas significativamente con la variable dependiente, sí que se consideró que tenían relevancia médica. Son las siguientes (en negrita se indican las categorías de referencia): Espesor de Breslow, medida de manera cuantitativa y cualitativa (se analizó un total de 7 categorizaciones distintas); N° mitosis, dicotómica (<1; >=1); Infiltrado linfocitario, dicotómica (**no o ligero**; moderado o intenso); Sexo, dicotómica (**varón**; mujer); Tumor previo, dicotómica (**no**; sí); Celularidad, categórica (**epitelioide**; fusocelular; mixta) con balonzante, linfocitoide y pleomórficas como perdidos por falta de muestra; Ulceración, dicotómica (**no**; sí); Diámetros menor y mayor, cuantitativas.

Se obtuvieron contrastes sobre los coeficientes del modelo para el modelo global ajustado, para cada paso de selección de variables y para cada bloque de variables (contrastos de razón de verosimilitud, estadísticos de lejanía y de bondad de ajuste de  $\chi^2$ ); el índice de bondad de ajuste de Hosmer-Lemeshow;  $R^2$  de Nagelkerke como coeficiente de determinación generalizado y el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson entre la respuesta y las probabilidades predichas; tablas de clasificación para evaluar el porcentaje correcto de casos pronosticados respecto a los observados; estimaciones de los coeficientes del modelo y finalmente Odds Ratios e intervalos de confianza al 90%. Se consideró como punto de corte para las tablas de clasificación observados/pronosticados de 0,5. La constante se incluyó en el modelo.

El procedimiento seguido en la construcción del modelo final de regresión logística binaria fue:

1. Primeramente se realizaron regresiones logísticas univariantes para obtener OR crudas de desarrollar metástasis para cada factor estudiado. Seguidamente se realizó el multivariante para estudiar los efectos conjuntos de los factores sobre la metástasis y así obtener OR ajustadas.
2. En una aproximación inicial, se utilizaron varios procedimientos de selección de variables por pasos, estableciendo como criterio de entrada y salida en

cada paso la probabilidad 0,1, y métodos de introducción de variables por bloques. Analizando los diagnósticos y resultados de cada modelo, se decidió escoger el método de selección por pasos hacia atrás con contraste para la eliminación basado en la probabilidad del estadístico de Wald.

3. Se realizaron los modelos con espesor de Breslow cuantitativo y cualitativo.

Se han realizado análisis de regresión logística con el objeto de identificar factores de riesgo asociados a la presencia de metástasis.

**Tabla 8.** Recogida de datos clínicos en pacientes con Melanoma Maligno

APELLIDOS.....NOMBRE.....  
 EDAD.....SEXO..... (V:VARON – M:MUJER).....  
 RESIDENCIA.....  
 FECHA 1ª CONSULTA.....  
 FECHA 1ª INTERVENCION QUIRURGICA Y/O GANGLIO.....  
 FECHA DE DISECCION GANGLIONAR.....  
 FECHA ULTIMA REVISION.....

COLOR DE OJOS (NEGRO: <b>N</b> ; CASTAÑO: <b>C</b> ;VERDE: <b>V</b> ; AZUL: <b>A</b> )..... COLOR DE PELO (NEGRO: <b>N</b> ; CASTAÑO: <b>C</b> ; RUBIO: <b>R</b> ; PELIRROJO: <b>P</b> )... FOTOTIPO..... PROFESION..... RAZA.....	
<b>ANTECEDENTES FAMILIARES S: Si N: No</b>	
NEVUS DISPLASICO.....	MELANOMA.....Nº.....
NEOPLASIA CUTANEA NO MELANOMA.....	Nº.....
CARCINOMA VISCERAL.....	Nº.....
OTRAS ENFERMEDADES	
<b>ANTECEDENTES PERSONALES S: Si N: No</b>	
TUMOR PREVIO.....(C:CONGENITO, P:PUBERTAD, E:EMBARAZO)	
EXPOSICION SOLAR 1.- PROFESIONAL 2.- RECREACIONAL HORAS/DIA.....DIAS/SEMAN.....SEMAN/MES.....MESES/AÑO.....AÑO..	
Nº NEVUS (1: < 20; 2:20-50; 3: >50)	
NEVUS DISPLASICO .....	
NEOPLASIA CUTANEA NO MELANOMA.....	
CARCINOMA VISCERAL.....	
QUEMADURAS SOLARES EN LA INFANCIA (SI: <b>S</b> – NO: <b>N</b> ).....	
EXPOSICION A FUENTES UV CON OTROS FINES (SI: <b>S</b> – NO: <b>N</b> ).....	
<b>CARACTERISTICAS CLINICAS DEL TUMOR</b>	
FORMA CLINICA (1: SSM; 2: MN; 3:MLA).....	
PIGMENTADO ( <b>S</b> : SI; <b>N</b> :NO).....	
ULCERADO ( <b>S</b> : SI; <b>N</b> :NO).....	
DIAMETRO MAYOR.....DIAMETRO MENOR.....	
LOCALIZACION ( <b>H</b> :HOMBRO; <b>A</b> :ANTEBRAZO; <b>B</b> :BRAZO; <b>M</b> :MANO) ( MUSLO: <b>M</b> ; PIERNA: <b>Pi</b> ; PIE: <b>Pe</b> ).....	
(1.- DERECHO; 2.- IZQUIERDO).....	
ZONA FOTOEXPUESTA ( <b>S</b> : SI; <b>N</b> : NO).....	
TIEMPO DE EVOLUCION (EN MESES).....	

**CARACTERISTICAS EPILUMINISCENCIA DEL TUMOR (S: SI; N:NO)**

ARGENZZIANO

PATRON RETICULADO ATIPICO.....VIDRIO ESMERILADO.....  
PATRON VASCULAR ATIPICO.....PROYECCION RADIAL.....  
PUNTOS Y GLOBOS IRREGULARES.....PATRON DE REGRESION.....  
PIGMENTACION DIFUSA IRREGULAR.....

PUNTUACION.....

**TRATAMIENTO**

CIRUGIA: ANESTESIA ( **L**:LOCAL; **G**:GENERAL).....

RECONSTRUCCION (**C**:COLGAJO; **P**:PLASTIA; **I**:INJERTO; CIERRE DIRECTO:  
**CD**).....

SI DISECCION, Nº DE GANGLIOS INVADIDOS.....

QUIMIOTERAPIA (**S**: SI; **N**:NO).....

OTROS TRATAMIENTOS (INMUNOTERAPIA).....

**EVOLUCION**

Tiempo en meses (desde la intervención del 1º) hasta la aparición de

- 1.- RECIDIVA LOCAL
- 2.- GANGLIOS LINFATICOS
- 3.- RECIDIVA GANGLIONAR
- 4.- METASTASIS VISCERALES

**Tabla 9.** Recogida de datos histológicos en pacientes con Melanoma Maligno

**Hematosilina-Eosina**

<b>BIOPSIA Nº</b> .....	<b>ESPESOR EN MM</b> .....
FORMA ANATOMOCLINICA.....	1.- SSM; 2.- MN; 3.- MLA; 4.- Nevus Malignizados; 5.- POLIPOIDE
NIVEL DE CLARK.....	1.-I; 2.- II; 3.- III; 4.- IV; 5.- V
PRESENCIA DE ULCERACION .....	1.-SI; 2.- NO
INVASION ANGIOLINFATICA.....	1.- SI; 2.- NO
INVASION PERINEURAL .....	1.- SI; 2.- NO
ACTIVIDAD MITOTICA (nº x mm <sup>3</sup> ): .....	
INFILTR. LINFOC.....	1.-LIGERO; 2.- MODERADO; 3.- INTENSO; 4.- NO
CELULARIDAD.....	1.- EPITELIOIDE; 2.- FUSOCELULAR; 3.- MIXTA 4.- BALONIZANTE; 5.- LINFOCITOIDE
ELASTOSIS.....	1.- SI; 2.- NO
SATELITOSIS.....	1.- SI; 2.- NO
PRESENCIA DE SATELITOSIS.....	1.- SI; 2.- NO

**Inmunohistoquimia**

	INTENSIDAD	LOCALIZACIÓN
P53		
KI67		
HMB 45		
S-100		

**Biología molecular**

Pérdida de heterocigosidad p53.....
-------------------------------------

## **RELACIÓN DE VARIABLES SEGÚN CATEGORÍAS.**

Las variables se codificaron de la siguiente manera para la realización del estudio estadístico.

**Edad.**- Nivel de medida: Escala

**Edad agrupada. (G\_EDAD)** .- Nivel de medida: Ordinal

- 0 Menor de 40 años
- 1 Entre 40 y 50 años
- 2 Entre 50 y 60 años
- 3 Entre 60 y 70 años
- 4 Entre 70 y 80 años
- 5 Mayor de 80 años

**Sexo.**- Nivel de medida: Dicotómica

- 0 Varón
- 1 Mujer

**Aparición de metástasis (METASTAS).** Nivel de medida: Dicotómica

- 0 No
- 1 Sí

**Tiempo libre de enfermedad (NED)** Nivel de medida: Escala (meses)

**Color de ojos agrupado (OJOS\_G).** Nivel de medida: Dicotómica

- 0 Oscuros
- 1 Claros

**Color de pelo agrupado (PELO).**- Nivel de medida: Dicotómica

- 0 Oscuro
- 1 Claro

**Fototipo.**- Nivel de medida: Escala

**Tumor previo (PREVIO)** Nivel de medida: Dicotómica

- 0 No
- 1 Sí

**Exposición solar profesional (SOLPROF)** Nivel de medida: Dicotómica

- 0 No
- 1 Si
- 2 SL

**Horas exp. solar total agrupada (SOL\_TOTG)** . Nivel de medida: Categórica

- 0 Sin exposición solar
- 1 Menos de 10000 h.
- 2 Más de 10000 h.

**Historia de quemaduras frecuentes en la infancia (QUEMADUR)**. Nivel de medida: Dicotómica

- 0 No
- 1 Sí

**Número de nevus agrupado (NEVUS\_G)** . Nivel de medida: Dicotómica

- 0 Menos de 20 nevus
- 1 Más de 20

**Cancer cutáneo asociado (ASOCIADO)** . Nivel de medida: Categórica

- 0 No asociado
- 1 Carcinoma espinocelular
- 2 Basalioma
- 3 Otro

**Cancer visceral asociado**. Nivel de medida: Dicotómica

- 0 No
- 1 Si

**Forma anatoimoclínica (FORMACLIC)**. Nivel de medida: Categórica

- 0 MP
- 1 MN
- 2 SSM
- 3 MLA
- 4 Nevus malignizado

**Diámetro mayor (MAYOR)** . Nivel de medida: Escala

**Diámetro menor (MENOR)** . Nivel de medida: Escala

**ESPESOR** . Nivel de medida: Escala

**Espesor agrupado (ESPESO\_G ).** Nivel de medida: Ordinal

- 0 < 1 mm
- 1 1-2 mm
- 2 2-4 mm
- 3 >4 mm.

**Localización.(LOCALIZA).** Nivel de medida: Categórica

**Tiempo de evolución en meses (EVOLUCIO ).** Nivel de medida: Escala

**Nivel de Clark (CLARK ).** Nivel de medida: Escala

**Presencia de ulceración (ULCERACI) .**Nivel de medida: Dicotómica

- 0 No
- 1 Sí

**Nº de mitosis por cm2 agrupado. (MITOSI\_G ).** Nivel de medida: Categórica

- 0 <1
- 1 De 1 a 5
- 2 Mayor de 5

**Infiltrado linfocitario (INFILTRA ).** Nivel de medida: Categórica

- 0 No
- 1 Ligero
- 2 Moderado
- 3 Intenso

**Celularidad. (CELULARI).** Nivel de medida: Categórica

- 0 Epiteliode
- 1 Fusocelular
- 2 Mixta
- 3 Balonizante
- 4 Linfocitoide
- 5 Pleomórfica

**Elastosis (ELASTO).** Nivel de medida: Dicotómica

- 0 No
- 1 Sí

**Satelitosis (SATEL).** Nivel de medida: Dicotómica

- 0 No
- 1 Sí

**Invasión angiolinfática (ANGIO).** Nivel de medida: Dicotómica

- 0 No
- 1 Sí

**Invasión perineural (PERINEU).** Nivel de medida: Dicotómica

- 0 No
- 1 Sí

**Positividad p53 (NP53).** Nivel de medida: Categórica

- 0 -
- 1 +
- 2 ++
- 3 +++

**Localización p53 (LP53).** Nivel de medida: Categórica

- 0 Focal
- 1 Difuso

**Antígeno Ki 67 (KI67).** Nivel de medida: Categórica

- 0 -
- 1 +
- 2 ++
- 3 +++

**Localización Ki 67 (LKI67).** Nivel de medida: Dicotómica

- 0 Focal
- 1 Difuso

**Localización HMB45.(LHMB45).** Nivel de medida: Dicotómica

- 0 Focal
- 1 Difuso

**Localización S-100.(LS100).** Nivel de medida: Dicotómica

- 0 Focal
- 1 Difuso

**Pérdida de heterocigosidad p53 (LOH).** Nivel de medida: Dicotómica

- 0 No
- 1 Sí

## **7.- Características de la Serie de Melanomas Metastásicos de Cabeza y cuello**

En primavera de 2001 nuestro grupo, presentó un estudio de Melanomas de Cabeza y cuello formada por 104 pacientes (Serrano Falcón, MM 2001). Los criterios de inclusión, exclusión, ámbito temporal, poblacional y geográfico de esta muestra son análogos a los de la serie de Melanomas de extremidades que presentamos. Uno de los objetivos del presente estudio es comparar las características clínicas y anatomopatológicas de los melanomas metastásicos de ambas muestras. Para ello vamos a enumerar a continuación los datos y resultados obtenidos por Serrano Falcón en el año 2001, que facilitarán la comparación posterior y la discusión de los resultados obtenidos en nuestro estudio.

### **7.1. Características clínico-epidemiológicas**

#### **Características demográficas**

- **Edad:** El 28,6% de los pacientes presentaban una edad comprendida entre los 70 y 80 años, seguido del 21,4% de los pacientes cuya edad estaba comprendida entre los 60 y 70 años. La media de edad fue de 64, 14 años. En términos generales la edad se asoció con el sexo, el tamaño del tumor y el espesor de Breslow, de manera que las personas de mayor edad eran mujeres con tumores de mayor tamaño y mayor espesor.
- **Sexo:** El 28,6% de los pacientes eran mujeres. El 71,4% de los pacientes eran hombres. En las mujeres existía un predominio de la forma anatomoclínica LMM, mientras que en los hombres predominaba la forma SSM. En varones, los melanomas diagnosticados eran más gruesos y de peor pronóstico, lo que se traducía en una mayor frecuencia en la aparición de metástasis. El estudio multivariante indicó que el sexo mujer es un factor de buen pronóstico, que podría deberse a que las mujeres consultan antes y le prestan mayor atención a su propio cuerpo. (Serrano Falcón MM, 2001)

### Características fenotípicas

- **Color de los ojos:** El 85,7% de los pacientes tenían ojos de color claro y el 14,3% de los mismos tenían los ojos oscuros.
- **Color de pelo:** El 21,4% tenían el pelo de color claro (rubio-pelirrojo) y el 78,6% tenían pelo de color oscuro.
- **Fototipo:** El fototipo III era el fototipo mayoritario ya que el 57,1% de los pacientes lo presentaban.
- **Raza:** Todos los pacientes incluidos en el estudio eran de raza blanca.
- **Número de nevus:** El 71,4% de los pacientes presentaban menos de 20 nevus y el 28,6% más de 20.

### Características socioeconómicas

- **Profesión:** El 42,9% de los pacientes referían desarrollar su actividad profesional en condiciones de fotoexposición permanente. El 28,6% de las pacientes eran amas de casa.

### Antecedentes personales

- **Tumor previo:** El 71,4% de los pacientes no referían la existencia de una tumoración previa.
- **Horas de fotoexposición total:** El 57,1% de los pacientes con melanoma metastásico de cabeza y cuello presentaban más de 10.000 horas de fotoexposición.

- **Quemaduras frecuentes en la infancia:** Tan sólo el 21,4% de los pacientes considerados referían haber experimentado quemaduras frecuentes durante su infancia.
- **Pigmentación:** El 85,7% de los tumores eran pigmentados y el 14,3% restante eran amelanóticos.

## 7.2. Características anatomopatológicas

- **Espesor de Breslow:** Los tumores con más de 4 mm de Breslow representaban el 71,4% de los melanomas metastásicos de cabeza y cuello. El espesor medio de la serie de melanomas de cabeza y cuello fue de 3,15 mm. Existía una asociación significativa con la edad y el sexo varón (posiblemente debida a la hipotética influencia de los factores hormonales y a que las mujeres y las personas más jóvenes consultan antes como previamente hemos referido). Asimismo no podemos olvidar la asociación con la aparición de metástasis, el nivel de Clark, el número de mitosis, la ulceración y celularidad siendo el factor de riesgo dominante en todos los análisis multivariantes realizados.
- **Nivel de Clark:** El 35,7% de los tumores presentaban un nivel de Clark III, el 28,6% un nivel IV y el 35,7% restante un nivel V.
- **Ulceración:** El 53,8% de los tumores no estaban ulcerados, mientras que el 42,6% de los mismos si presentaban ulceración. La ulceración de los melanomas de cabeza y cuello se asocia de forma significativa con el espesor del tumor, el nivel de Clark, la actividad mitótica y el tamaño tumoral. Si bien en algunos estudios publicados la ulceración se asociaba con mal pronóstico (Urist MM, 1984), en la serie referida perdía su valor pronóstico al realizar el análisis multivariante.

- **Infiltrado linfocitario:** El 57,1% presentaban un infiltrado linfocitario ligero, el 35,7% un infiltrado moderado mientras que en el 7,1% restante la expresión del infiltrado era intensa.
- **Celularidad:** El tipo de celularidad predominante era la epitelioides (57,1%) seguido de la mixta (28,6%) y la fusocelular (7,1%).
- **Elastosis:** El 57,1% de los pacientes presentaban elastosis, mientras que ésta no era manifiesta en el 42,9% restante.

### 7.3. Características inmunohistoquímicas

- **p53:** El antioncogen p53 se expresó en la mitad de los tumores que habían metastatizado, siendo negativa en la otra mitad de los casos estudiados. En el estudio de melanomas de cabeza y cuello la expresión de p53 se asocia con tumores de mayor espesor, presencia de ulceración y mayor actividad mitótica, así como con el crecimiento polipoide y la forma MN.
- **Ki-67:** En el 50% de los tumores estudiados la positividad era intensa, mientras que en el 14,3% fue discreta. El antígeno Ki-67 es un marcador de proliferación que tiene significado diagnóstico y pronóstico. En el estudio bivalente, la expresión ligera de ki-67 se asociaba con variables que indican buena evolución (no aparición de metástasis, menor espesor, menor volumen, menor nivel de Clark, menor número de mitosis y ausencia de ulceración). Por otro lado, la expresión intensa de Ki-67 se asocia con mal pronóstico, aparición de metástasis, forma nodular, presencia de ulceración y mayor actividad mitótica.
- **HMB45:** La expresión difusa del marcador HMB 45 se observó en el 92,9% de los casos, siendo focal en el 7,1% restante.
- **S-100:** El 92,9% de los tumores presentaban una expresión focal, mientras que en el 7,1% de los tumores fue difusa.

En el estudio de melanomas de cabeza y cuello realizado en nuestro medio, el 24% de los pacientes incluidos desarrollaron metástasis. El sexo varón y el espesor tumoral son los principales factores de pronóstico cuando se realizó el análisis multivariante. No obstante, en el análisis bivariante también quedan reflejadas otras variables de sumo interés de cara al pronóstico: Crecimiento polipoide, localización en cuero cabelludo, ulceración, actividad mitótica e infiltrado linfocitario, presentando la forma LMM un menor riesgo significativo de aparición de metástasis.