

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**



**Casa abierta al tiempo**

**INMUNOEXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN  
ASOCIADO A MICROFTALMIA (MITF) EN MELANOMAS DE  
MUCOSAS NASOSINUSAL Y BUCAL**

**IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN PATOLOGÍA Y MEDICINA BUCAL**

**P R E S E N T A**

**C.D. Bryan Manolo Orellana Higueros**

**COMITÉ TUTORIAL**

**Co-Directora:** Dra. Velia Aydée Ramírez Amador

**Co-Directora:** Dra. Irma Gabriela Anaya Saavedra

**Asesora:** Dra. Jessica Lissete Maldonado Mendoza

**Asesor:** Dr. Héctor Aquiles Maldonado Martínez

Ciudad de México, septiembre 2019

La Maestría en Patología y Medicina Bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón Nacional de Posgrados de Calidad de CONACYT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el registro 5020

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
De la Unidad Xochimilco aprobó la ICR que presentó

**BRYAN MANOLO ORELLANA HIGUEROS**

**COMITÉ TUTORIAL:**

---

Co-Directora: Dra. Velia Aydée Ramírez Amador

---

Co-Directora: Dra. Irma Gabriela Anaya Saavedra

---

Asesora: Dra. Jessica Lissete Maldonado Mendoza

---

Asesor externo: Dr. Héctor Aquiles Maldonado Martínez

**Jurado:**

---

Presidente: Dr. Adalberto Abel Mosqueda Taylor

---

Secretaria: Dra. Itzel Castillejos García

---

Vocal: Dr. Marcos Agustín Muñiz Lino

---

Vocal: Dra. Ana María Cano Valdés

<b>ÍNDICE</b>	<b>Pág.</b>
Abreviaturas.....	I
Índice de cuadros.....	II
Índice de figuras.....	III
1. Marco teórico.....	2
1.1 Melanoma de la mucosa nasosinusal y bucal.....	2
1.1.1 Epidemiología.....	3
1.1.2 Etiología y factores predisponentes.....	4
1.1.3 Patogénesis.....	4
1.1.4 Características clínicas.....	6
1.1.5 Etapificación clínica del MMNSB.....	8
1.1.6 Características histológicas.....	8
1.1.7 Etapificación histológica del MMNSB.....	9
1.1.8 Características inmunohistoquímicas.....	10
1.1.9 Pronóstico y sobrevida.....	12
1.2 Descripción del inmunomarcador.....	13
1.2.1 MITF.....	13
1.2.2 Vías de señalización y factores que regulan la expresión de MITF.....	14
1.2.3 Inmunoexpresión de MITF en melanomas.....	14
2. Planteamiento del problema y justificación.....	21
3. Objetivos.....	22
4. Material y método.....	22
4.1 Diseño del estudio.....	22
4.2 Criterios de inclusión.....	23
4.3 Criterios de exclusión.....	23
4.4 Criterios de eliminación.....	23
4.5 Población de estudio.....	23
4.6 Evaluación de los casos.....	24
4.7 Procedimiento de laboratorio.....	25
4.7.1 Evaluación histopatológico.....	25

4.8	Inmunohistoquímica de MITF.....	25
4.8.1	Preparación de la muestra.....	25
4.8.2	Reacción inmunohistoquímica.....	26
4.8.3	Cuantificación de la inmunoexpresión.....	27
4.9	Variables.....	28
4.10	Análisis estadístico.....	28
4.11	Consideraciones bioéticas.....	28
5.	Resultados.....	30
6.	Discusión.....	44
7.	Referencias bibliográficas.....	51
8.	Anexos.....	58

## Abreviaturas

AJCC	American Joint Committee on Cancer
BCL-2	Proto-oncogén que participa en el control de la proliferación celular
C-KIT	Proteína transcrita por el gen <i>KIT</i>
CDK4	Cinasa dependiente de ciclina 4
CDK6	Cinasa dependiente de ciclina 6
CDKN2A	Cinasa inhibidora dependiente de ciclina 2A
H	Hombres
H&E	Hematoxilina y eosina
HMB-45	Human melanoma black 45/ monoclonal antibody
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
KIT	Sarcoma viral oncogene homolog/ Tyrosine protein kinase Kit
M	Mujeres
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MAPK	Mitogen activated protein kinases
MART-1	Melanoma antigen recognized by T cells 1
MC	Melanoma cutáneo
MITF	Factor de transcripción asociado con microftalmia
MM	Melanoma mucoso
MMB	Melanoma de mucosa bucal
MMNS	Melanoma de mucosa nasosinusal
MMNSB	Melanoma de mucosa nasosinusal y bucal
NFk $\beta$	Factor nuclear kappa de cadenas ligeras de células B activadas
NRAS	Oncogén homólogo viral RAS (v-ras) neuroblastoma
P21	Gen inhibidor de la ciclina dependiente de cinasa 1
P53	Gen supresor tumoral conocido como “guardián del genoma”
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina
Rb	Retinoblastoma
TERT	Telomerasa transcriptasa inversa
UAM-X	Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco
WESTOP	Wertern Society of Teachers of Oral Pathology

## Índice de Cuadros

Cuadro 1.	Características demográficas y clínicas en 42 individuos con MMNSB.....	34
Cuadro 2a.	Características histopatológicas de 42 individuos con MMNSB .....	35
Cuadro 2b.	Continuación de las características histopatológicas de 42 individuos con MMNSB .....	36
Cuadro 3.	Características clínicas e histopatológicas en 42 MMNSB de acuerdo con la proporción de inmunexpresión de MITF.....	37
Cuadro 4.	Clasificación WESTOP, patrón de distribución y población celular de acuerdo con la proporción de inmunexpresión de MITF.....	38
Cuadro 5.	Características histopatológicas en 42 MMNSB de acuerdo con la proporción de intensidad de inmunexpresión de MITF.....	39

## Índice de Figuras

Figura 1.	Principales vías de señalización implicadas en la actividad de MITF melanoma.....	17
Figura 2	Factores que regulan la expresión de MITF.....	18
Figura 3.	Población de estudio.....	24
Figura 4	Diseminación vertical (invasor), diseminación horizontal ( <i>in situ</i> ) y diversos patrones de distribución tumoral.....	40
Figura 5.	Mitosis aberrantes en MMNSB	40
Figura 6.	Invasión vascular, neural y pleomorfismo celular.....	41
Figura 7.	Inmunexpresión de MITF.....	42
Figura 8.	Intensidad de expresión de MITF.....	43

## RESUMEN

**Introducción:** El factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) regula la melanogénesis, proliferación, supervivencia y diferenciación de los melanocitos, se considera marcador de linaje melanocítico y participa en el desarrollo del melanoma. Se carece de información sobre la inmunoexpresión de MITF en melanomas de mucosa nasosinusal y bucal (MMNSB).

**Objetivo:** Identificar la inmunoexpresión de MITF y su posible asociación con las características clínico-patológicas de MMNSB del INCan de México, de enero de 2000 a septiembre de 2017.

**Método:** Estudio retrospectivo, transversal, observacional y descriptivo en el que se incluyeron 42 muestras de MMNSB de un centro oncológico de referencia en la Ciudad de México (17 años). Se recolectaron datos demográficos y clínicos y se realizó análisis histopatológico e inmunohistoquímico de las muestras (anti-MITF, Dako, clona D5, ratón). Se efectuaron las pruebas de Chi-cuadrada, exacta de Fisher y U-Mann-Whitney con un nivel de alfa <0.05, en el paquete estadístico SPSS v21.0.

**Resultados:** Se incluyeron 42 casos (57.1% mujeres); 21 (50%) correspondieron a melanomas nasosinuales (MMNS) y 21 (50%) a melanomas bucales (MMB), con una mediana de edad de 56.5 (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>=48.7-69) años. Los MMNS mostraron más síntomas (95.2%) en comparación con los MMB (47.6%), (p=0.001). Los MMB mostraron mayor afección (66.7%) en ganglios linfáticos regionales en contraste con el 33.3% de MMNS (p=0.031). Al examen histopatológico, 39 (92.8%) presentaron comportamiento invasor y crecimiento vertical. En los MMNS se observó una mayor proporción de mitosis atípicas por mm<sup>2</sup> a 40x (mediana: 9 mitosis, Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>=5.5-16.5) (p=0.033). En todos los casos se identificó una alta inmunoexpresión de MITF (mediana: 80%, Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>=70-85%). En todos los melanomas *in situ* se observó intensidad fuerte, a diferencia del 89.7% de los tumores invasores que presentaron intensidad de débil/moderada (p=0.003). Los tumores con población polimórfica mostraron intensidad débil/moderada (91.7%) a diferencia de las neoplasias monomórficas cuya intensidad se presentó fuerte (66.7%) (p=0.004). Asimismo, los casos que presentaron invasión vascular y mayor número de mitosis atípicas mostraron intensidad débil a moderada de la proteína (89.5% y 95.2%; p=0.011 y p=0.559, respectivamente).

**Conclusiones:** El alto porcentaje de inmunoexpresión e intensidad fuerte de MITF en MMNSB, confirma su uso como marcador adecuado para identificar el linaje melanocítico. Además, la presencia de características histopatológicas como la heterogeneidad celular e invasión tumoral son factores que disminuyen su inmunoexpresión.



## **1. Marco teórico**

Los melanocitos son células derivadas de la cresta neural productoras de melanina que se localizan en piel, mucosas, leptomeninges, corazón y oído interno (Shain y cols., 2016). Su función en piel consiste en transferir melanosomas (paquetes de melanina) a los queratinocitos adyacentes para brindar color y protección contra la radiación ultravioleta, neutralizando así, los radicales libres generados que pueden dañar el ADN (propiedad antioxidativa) (Schadendorf y cols., 2015); en contraste, su función en cavidad bucal no está totalmente clara, se sugiere que participan en la inmunidad mediante acciones antibacteriales tales como la presentación de antígenos y la producción de citocinas (Feller y cols., 2014), brindan color (pigmentación fisiológica) y participan como células neuroendocrinas mediante la secreción de melanocortina, opioides, catecolaminas y acetilcolina (Feller y cols., 2017).

El microambiente que los rodea difiere dependiendo del lugar en donde se localicen en el organismo, es decir, que los melanocitos en piel y los presentes en mucosas interactúan con diferentes células; lo cual, está relacionado con las distintas moléculas de adhesión y vías de señalización que participan en el desarrollo del melanoma cutáneo y del melanoma mucoso (López y cols., 2016; Schadendorf y cols., 2015; Bellester y cols., 2015; Mihajlovic y cols., 2012).

### **1.1 Melanoma de la mucosa nasosinusal y bucal**

Los melanomas de la mucosa primarios (MMP) fueron descritos por primera vez por Weber en 1859 (Weber, 1859) y desde entonces se sabe que es una condición infrecuente. La región de la cabeza y el cuello es el sitio en donde comúnmente se desarrollan los MMP, siendo los senos nasales, paranasales y la cavidad bucal los sitios más afectados (Lourenço y cols., 2014).

### **1.1.1 Epidemiología**

Los melanomas de la mucosa nasosinusal y bucal (MMNSB) comprenden el 4% de todos los cánceres de cabeza y cuello, y representan el 1% de todos los melanomas, los pacientes diagnosticados con esta neoplasia presentan una sobrevida a 5 años del 15 al 30% (Ascierto y cols., 2017; Hsieh y cols., 2016).

El melanoma de mucosa nasosinusal comprende el 3.5% de todas las neoplasias malignas nasosinusales, el 6.7% de los melanomas en la región de cabeza y cuello y el 1 a 2% de todos los melanomas, con una incidencia de 0.5 por millón al año (Ascierto y cols., 2017; Dréno y cols., 2016). Por otro lado, el MMB representa el 0.5% de todas las neoplasias malignas bucales y solo el 0.2 al 8% de todos los melanomas diagnosticados, con una incidencia mundial del 0.2 por millón al año (Hsieh y cols., 2016; de Souza y cols., 2014). En cuanto a grupos étnicos, se ha reportado una mayor frecuencia de MMNSB entre individuos asiáticos (8%) en comparación con población caucásica, hispana y africana (1%) (Shain y Bastian, 2016; Schadendorf y cols., 2015).

Si bien, en México no existe información epidemiológica oficial respecto a la incidencia o mortalidad de los MMNSB, se han realizado reportes de casos y estudios retrospectivos en centros de referencia oncológicos del país (Maldonado-Mendoza y cols., 2015; Reséndiz-Colosia y cols., 2007; López-Graniel y cols., 1999; Ruíz-Godoy y cols., 1992) que reportan características clínico-patológicas; de ellos, solo uno ha caracterizado la expresión de C-KIT y el perfil molecular de genes asociados a la vía MAPK en esta enfermedad (Maldonado-Mendoza y cols., 2019).

### **1.1.2 Etiología y factores predisponentes**

A diferencia del melanoma cutáneo, cuyo origen en la mayoría de los casos se relaciona con la luz ultravioleta, la etiología de los melanomas mucosos no se encuentra bien definida. Se ha propuesto que los MMNSB se originan de *novo* en el 30% de los casos (Warszawik-Hendzel y cols., 2014; Lourenço y cols., 2013). Recientemente, Mellouli y cols. (2019), reportan que un tercio de los melanomas mucosos han tenido antecedentes de lesiones pigmentadas benignas durante meses e incluso años antes de la transformación maligna, sin embargo, se desconoce el mecanismo exacto de dicha transformación. Se sospecha que la exposición a sustancias tóxicas (formaldehído) podría ser un factor de riesgo para su desarrollo en MMNS (Moctezuma y cols., 2016; Bellester y cols., 2015; Mihajlovic y cols., 2012). En el caso del MMB se sugiere que la presencia previa de un área pigmentada, de traumas locales (prótesis mal ajustadas) y tabaquismo, podrían considerarse factores de riesgo; sin embargo, dichas hipótesis no han sido confirmadas por evidencia científica (Feller y cols., 2017; Tacastacas y cols., 2014; Mohan y cols., 2013).

### **1.1.3 Patogénesis**

La patogénesis de los MMNSB es el resultado de la acumulación de alteraciones genéticas y moleculares en diferentes vías de señalización, entre ellas se menciona la vía de las proteínas cinasas activadoras de mitosis (MAPK), la cual regula el crecimiento, supervivencia e invasión celular (Davis y cols., 2018; Mikkelsen y cols., 2016). Adicionalmente, se inactiva la vía de PI3K-AKT y fosfatasa y tensina homóloga (*PTEN*) que regula la división, migración, diseminación y apoptosis celular (Shain y cols., 2016; Lourenço y cols., 2014). Finalmente, la ruta de señalización C-KIT, que regula la actividad del factor de transcripción de microftalmia

(MITF), desempeña un papel importante en la proliferación, diferenciación y supervivencia de los melanocitos, lo cual contribuye a un aumento en la actividad de BCL-2 (López y cols., 2016; Naffouje y cols., 2015). De esta manera, la presencia de mutaciones en *BRAF*, *NRAS*, *KIT*; y la amplificación de *CDKN2A* y *CDK4*, inducen cambios que silencian la expresión de E-cadherina, y de genes supresores tumorales como p27, p16-Rb y NFκB, lo cual favorece la inactivación de p53, importante regulador del ciclo celular (Davis y cols., 2018; Ascierto y cols., 2017).

El incremento en la proliferación (ciclina D1) y diferenciación melanocítica (MITF) más la inactivación de p53, son los eventos encargados de promover la metástasis por la expresión de proteínas migratorias como las metaloproteinasas (MMP-2, 7, 9, 14) y la integrina B3, así como la presencia de angiogénesis por la expresión de VEGF (Davis y cols., 2018; Ascierto y cols., 2017; Shain y cols., 2016; Shtivelman y cols., 2014; Bandarchi y cols., 2013).

Se ha informado que la expresión de proteínas: MITF, C-KIT y PTEN están relacionadas con las etapas iniciales de la progresión tumoral (Kawakami y Fisher, 2017), mientras que la presencia de mutaciones en los diferentes genes se relaciona con neoplasias metastásicas (Koludrovic y Davidson, 2013; Aguisa-Touré y Li, 2012). Recientemente, un estudio realizado en estos tumores en la población mexicana, señalan que a pesar de la alta inmunoexpresión de C-KIT (CD117) en MMNSB primarios no existe una asociación con la presencia de mutaciones en *KIT*, *NRAS*, *BRAF*, *MITF* y *PTEN*; por lo tanto, las bajas tasas de mutaciones enfatizan la naturaleza distinta de estas neoplasias en comparación con otros subtipos de melanomas (Maldonado-Mendoza y cols., 2019).

#### **1.1.4 Características clínicas**

Los MMNSB son considerados lesiones propias de la edad adulta, que se presentan después de la 5ª década de vida (Feller y cols., 2017; López y cols., 2016; Lourenço y cols., 2014), sin predilección de género (Warszawik-Hendzel y cols., 2014), aunque algunos autores refieren un ligero predominio en el sexo masculino (2:1) en melanomas bucales (Feller y cols., 2017; Hsieh y cols., 2016; Warszawik-Hendzel y cols., 2014), y una tendencia al sexo femenino (2:1) en MMNS (Dréno y cols., 2017; López y cols., 2016; de Souza y cols., 2014).

#### **Melanoma de la mucosa nasosinusal**

Clínicamente se presenta como un crecimiento expansivo, polipoide, ulcerado y con abundante necrosis. Puede invadir a los senos paranasales, la órbita y/o la fosa craneal (Dréno y cols., 2017; Moctezuma y cols., 2016; Sarra y cols., 2013; Narasimham y cols., 2009). La mucosa que recubre cornetes (medio e inferior) y el septum son las más frecuentemente afectadas (43.1% y 24.2%, respectivamente) (Dréno y cols., 2017; Bhartiya y Prasad, 2015).

Los signos y síntomas más comunes son obstrucción nasal, epistaxis, rinorrea y dolor facial. En estadios avanzados pueden incluir proptosis, diplopía, visión borrosa y/o pérdida de la visión (Dréno y cols., 2017; Moctezuma y cols., 2016; Michel y cols., 2014; Sarra y cols., 2013).

#### **Melanoma de la mucosa bucal**

Los melanomas de boca pueden presentarse como máculas, placas o tumores asimétricos con límites irregulares y superficie intacta o ulcerada (Feller y cols., 2017; Tlholoe y cols., 2015; Wu y cols., 2014). Tanaka y cols. (1994), clasifican a los MMB según su patrón de

crecimiento y presencia de pigmento en nodular pigmentado, nodular no pigmentado, macular pigmentado, mixto pigmentado y mixto no pigmentado. Se ha mencionado también que los MMB, pueden presentar múltiples lesiones satélite (López y cols., 2016).

Comúnmente afecta la mucosa de la cresta alveolar maxilar y el paladar duro, dichas ubicaciones favorecen la invasión temprana del hueso subyacente, lo que explica su mal pronóstico (López y cols., 2016; Wu y cols., 2014; Warszawik-Hendzel y cols., 2014). La mucosa bucal, los labios, la lengua, el piso de la boca y la úvula también pueden verse afectados (Feller y cols., 2017; Pingarrón y cols., 2014).

La pigmentación puede ser homogénea (negro a marrón), heterogénea (negro, marrón, gris o púrpura), estar ausente o tener un color similar a la mucosa adyacente (melanoma amelanótico) (Ascierto y cols., 2017; López y cols., 2016; Penel y cols., 2006). Este último se asocia con un peor pronóstico debido a la mayor dificultad de diagnóstico y al retraso del inicio del tratamiento (Feller y cols., 2017; Adisa et al., 2012).

Los MMNSB son asintomáticos en las primeras etapas y los pacientes refieren la presencia de un área pigmentada que paulatinamente aumenta de volumen. Las lesiones avanzadas pueden ser dolorosas, provocar parestesia, sangrado, movilidad dental y pérdida ósea (Hsieh y cols., 2016; Tlholoe y cols., 2015; de Souza y cols., 2014; Lourenço y cols., 2014; Mihajlovic y cols., 2012).

### **1.1.5 Etapificación clínica del MMNSB**

En 1970 Ballantyne, describió un sistema de estadificación simplificado para MM de cabeza y cuello, el cual menciona 3 etapas o estadios: el primero I para lesiones localizadas, el estadio II para aquellas con diseminación regional, es decir, metástasis a nódulo linfático cervical, y el estadio III para aquellos con metástasis a distancia (Ballantyne, 1970). La ventaja de este sistema es su simplicidad, sin embargo, no tomaba en cuenta ni la profundidad de la invasión ni la extensión local del tumor (López y cols., 2016).

El sistema TNM publicado por la American Joint Committee on Cancer (AJCC), considera directamente el estadio III para la enfermedad localizada y el estadio IV con subtipos (A, B y C) para la enfermedad avanzada, según el grado de afectación (American Joint Committee on Cancer, 2010) (Anexo II). Recientemente, han informado que este sistema de estadificación proporciona información pronóstica más confiable y útil en el uso clínico de rutina (Luna-Ortiz y cols., 2016; Koivunen y cols., 2012).

### **1.1.6 Características histológicas**

Los MMNSB pueden presentar al igual que su homólogo cutáneo, un patrón de crecimiento bifásico, que muestra una fase radial con diseminación horizontal y superficial, y otra fase vertical con crecimiento infiltrativo al tejido conectivo subyacente (Dréno y cols., 2017; Paulo y cols., 2015; Mohan y cols., 2013). Los melanocitos se encuentran dispuestos en diferentes patrones: sólido, organoide, alveolar, sarcomatoide, y periteliomatoso en el caso del MMNS (Laurenço y cols., 2014; Prasad y cols., 2004; Prasad y cols., 2003). Adicionalmente, de acuerdo a su morfología celular pueden clasificarse en polimórficos si presentan células

heterogéneas con características epitelioides, plasmocitoides, fusiformes o células claras con tamaños variables, así como células gigantes multinucleadas neoplásicas y células pequeñas redondas y basófilas, en los MMNS; (Prasad y cols., 2004) o monomórficos, que suelen estar formado por poblaciones celulares más regulares en tamaño y forma (Prasad y cols., 2004; Prasad y cols., 2003). Dichas células, presentan pérdida de contacto, abundante citoplasma, núcleos grandes e hipercromáticos, nucléolo eosinófilo prominente; así como actividad mitótica considerable y necrosis tumoral variable (López y cols., 2016; Prasad y cols., 2004; Prasad y cols., 2003).

Los tumores con fenotipos de células mixtas (polimórficos) son más agresivos y se asocian con una mayor invasión vascular y metástasis (Ascierto y cols., 2017; Lourenço y cols., 2014). En la mayoría de los casos, las células contienen gránulos de melanina, sin embargo, en el 10-30% de los casos pueden carecer de este (tumores amelanóticos) (Feller y cols., 2017; López y cols. 2016; Tlholoe y cols., 2015).

### **1.1.7 Etapificación histológica del MMNSB**

Dado que la lámina propia de la mucosa bucal y nasal carecen de los límites histológicos de la dermis papilar y reticular utilizados por los sistemas de clasificación de Breslow y de Clark (Breslow y cols., 1975; Clark y cols., 1969) para definir la invasión en profundidad, ulceración y el número de mitosis del melanoma cutáneo, Prasad y cols. (2004), propusieron un sistema basado en las estructuras afectadas por las células neoplásicas, que lo clasifica en: no invasor (*in situ*), nivel 1 (microinvasión) con <10 grupos de melanocitos atípicos cerca de la unión epitelio-lámina propia, nivel 2 (superficialmente invasor: presencia de células neoplásicas en



la lámina propia) y nivel 3 (profundamente invasivo: células neoplásicas en estructuras submucosas como músculo, fibras nerviosas, hueso o cartílago).

En 1995, la reunión anual de la *Western Society of Teachers of Oral Pathology (WESTOP)* propuso que los melanomas en cavidad bucal y nasal debían ser clasificados por separado a su contraparte cutánea, por lo que se catalogaron en:

- **Melanoma *in situ*:** Lesión limitada en epitelio e interfaz de epitelio-tejido conectivo.
- **Melanoma invasor:** Tumor con patrón de crecimiento vertical, en el que la neoplasia se ubica en tejido conectivo profundo.
- **Melanoma combinado (*in situ* e invasor):** Este presenta un patrón combinado de melanoma invasor y del componente *in situ*.
- **Hiperplasia melanocítica atípica:** También conocida como proliferación melanocítica atípica, es un término aceptado para designar lesiones con características histopatológicas que no son propias de una lesión benigna, como puede ser la presencia de melanocitos con núcleos angulados e hipercromáticos, escasas mitosis o pleomorfismo. Ésta es considerada una lesión melanocítica premaligna (Barker y cols., 1997).

### 1.1.8 Características inmunohistoquímicas

El melanoma tiene un amplio espectro de características histológicas que semejan neoplasias epiteliales, hematológicas, mesenquimatosas y neurales. Además, la ausencia de melanina en algunos casos, hace necesaria su caracterización inmunohistoquímica.

La inmunoreactividad de las células de melanoma ante anticuerpos como S-100 y vimentina, facilita su diagnóstico (Feller y cols., 2017; de Souza y cols., 2014; Hsieh y cols., 2013). Adicionalmente, la reacción positiva a marcadores como Melan-A (MART-1), HMB-45 (GP-100), tirosinasa y MITF determinan la diferenciación melanocítica (López y cols., 2016; Mochel y cols., 2015; de Souza y cols., 2014; Guo y cols., 2013; Ohsie y cols., 2008). Por otro lado, el antígeno epitelial de membrana, las citoqueratinas, los marcadores neuroendócrinos y musculares no son expresados, diferenciándolos de neoplasias epiteliales, mesenquimatosas y neuroendocrinas (Lourenço y cols., 2014; Ohsie y cols., 2008).

Los inmunomarcadores más útiles en el panel de diagnóstico del melanoma, son S-100 y HMB-45, ya que han mostrado 88% de sensibilidad y 95% de especificidad, respectivamente (De Andrade y cols., 2012; Yu y cols., 2005). Adicionalmente, otros marcadores indican su comportamiento biológico, tales como Ki-67, p53, p75, p16, MCM-2 y geminina (Hsieh y cols., 2016; de Andrade y cols., 2013; de Andrade y cols., 2012). Se han reportado alteraciones en moléculas de adhesión, como integrina  $\beta$ -3 y CD166, las cuales se encuentran asociadas a la invasión vascular (integrina  $\beta$ -3) y la necrosis (CD116) (Bologna y cols., 2013), así como la expresión de BCL-2 con una correlación significativa de sobrevida más larga (Prasad y cols., 2012). Además de estos marcadores, se ha evaluado el potencial diagnóstico de otras moléculas en los MMNSB como FASN (sintetasa de ácidos grasos), p21, p27, Rb y ciclina D1 (de Andrade y cols., 2012; de Andrade y cols., 2011).

### **1.1.9 Pronóstico y sobrevida**

El pronóstico de los pacientes con MMNSB es pobre, ya que este tumor tiene una alta tasa de recurrencia, independientemente de la radicalidad de la resección, radioterapia y modalidades sistémicas, así como los avances en la aplicación de agentes biológicos (Tyrrell y Payne, 2018). La metástasis locoregional y a distancia se observa en hasta el 81% de los pacientes (López y cols., 2016; Michel y cols., 2014; Gavriel y cols., 2011). Los tumores que muestran histopatológicamente grosor mayor de 5mm, márgenes positivos, invasión vascular y alta expresión de Ki-67, se han asociado con un peor pronóstico (Ascierto y cols., 2017).

En 2017, el proyecto *Surveillance of Rare Cancers in Europe* (RARECARE) calculó la supervivencia de 2277 pacientes caucásicos diagnosticados con MM de cabeza y cuello diagnosticados entre 2000 y 2007, reportando tasas de supervivencia a 1, 3 y 5 años, de 63%, 30% y 20% respectivamente (RARECAREnet, 2017). Recientemente, se han aplicado estrategias inmunológicas como la molécula de muerte programada 1 (PD-1), nivolumab/pembrolizumab, y el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4), ipilimumab, en el tratamiento de MMNSB; obteniendo resultados variables (respuesta completa, parcial o estable) y siendo bien tolerada durante un promedio de 9.5 meses por el individuo (Tyrrell y Payne, 2018; Deinlein y cols., 2017). Estos resultados sugieren que la sinergia de combinación entre agentes inmunológicos y radioterapia podrían ser una alternativa viable, con respuesta más favorable en el tratamiento de melanomas de mucosa de cabeza y cuello.

## 1.2 Descripción del inmunomarcador

### 1.2.1 MITF

El gen que sintetiza al factor de transcripción asociado a microftalmia (*MITF*) se ubica en el cromosoma 3 en la posición p14-12. MITF es una proteína de unión a ADN, tiene una estructura hélice-bucle-hélice básica y cremallera de leucina (bHLH-Zip), pertenece a la superfamilia de MYC y puede producir diversas isoformas (A, B, C, D, E, H, J, Mc y M), las cuales difieren en su N-terminal. La isoforma M es la más expresada en los melanocitos derivados de la cresta neural y en melanomas (Hartman y Czyz, 2015).

Es considerado el factor nuclear maestro para los melanocitos ya que juega un papel fundamental en su desarrollo, crecimiento y supervivencia. También se expresa en las células epiteliales pigmentadas de la retina, los osteoclastos, los linfocitos T-NK, los macrófagos, los mastocitos, las células B y los miocardiocitos (Hsiao y Fisher, 2014; Shtivelman y cols., 2014; Haq y cols., 2011). *MITF* actúa como regulador molecular ya que, los niveles de expresión presentes en la célula están relacionados con la función que realiza, esto es, que a bajos niveles promueve la senescencia y/o muerte eventual, a niveles intermedios, el crecimiento y la proliferación, mientras que su sobreexpresión lleva a la diferenciación y al arresto del ciclo celular (Hoek y Goding, 2010). Igualmente, se ha implicado su función en la biogénesis lisosomal, a través de la transcripción de marcadores que aumentan el número de organelos intracelulares (Ploper y De Robertis, 2015). Aunque *MITF* controla múltiples aspectos de la biología de los melanocitos y del melanoma, la tasa de mutaciones en *MITF* es relativamente baja, ocurre en menos del 10% de melanoma y generalmente involucra la amplificación del gen *MITF* (López y cols., 2016).

### 1.2.2 Vías de señalización y factores que regulan la expresión de *MITF*

Se han definido diferentes vías de señalización y factores de transcripción que regulan la expresión de *MITF* (Figura 1). La desregulación de la vía de señalización MAPK por mutaciones en *BRAF* y *NRAS*, y la activación de PI3K y AKT, son los eventos más comunes en el melanoma, lo cual, se sugiere puede influir en la transcripción de *MITF* y estimular su modificación mediante mecanismos postranscripcionales como la fosforilación (Koludrovic y Davidson, 2013).

La activación canónica de la vía molecular Wnt- $\beta$ -catenina es un hallazgo frecuente en el melanoma. Tras su activación, se impide la degradación de la proteína  $\beta$ -catenina por acción de un complejo proteínico conocido como complejo de destrucción, conformado por cinasas (GSK-3), la proteína adenomatosis poliposis Coli (*APC*) y la proteína axina. Posteriormente,  $\beta$ -catenina se acumula y se transloca en el núcleo donde actúa como coactivador para la familia de factores de transcripción de unión 1 al potenciador linfoide (TCF/LEF1), lo cual regula genes que codifican proteínas involucradas en la proliferación celular, la diferenciación y el mantenimiento de células troncales, como c-Myc, ciclina D1 y TCF-1 (Hocker y cols., 2008).

Delmas y cols. (2007), reportan que  $\beta$ -catenina actúa de manera pleiotrópica regulando las proteínas *MITF* y *BRN2*, así como reprimiendo *CDKN2A*, lo que resulta una proliferación mejorada pero una reducción de la migración. En el melanoma, el aumento de la expresión de  $\beta$ -catenina suprime la invasión de células tumorales, un proceso que puede explicarse por la

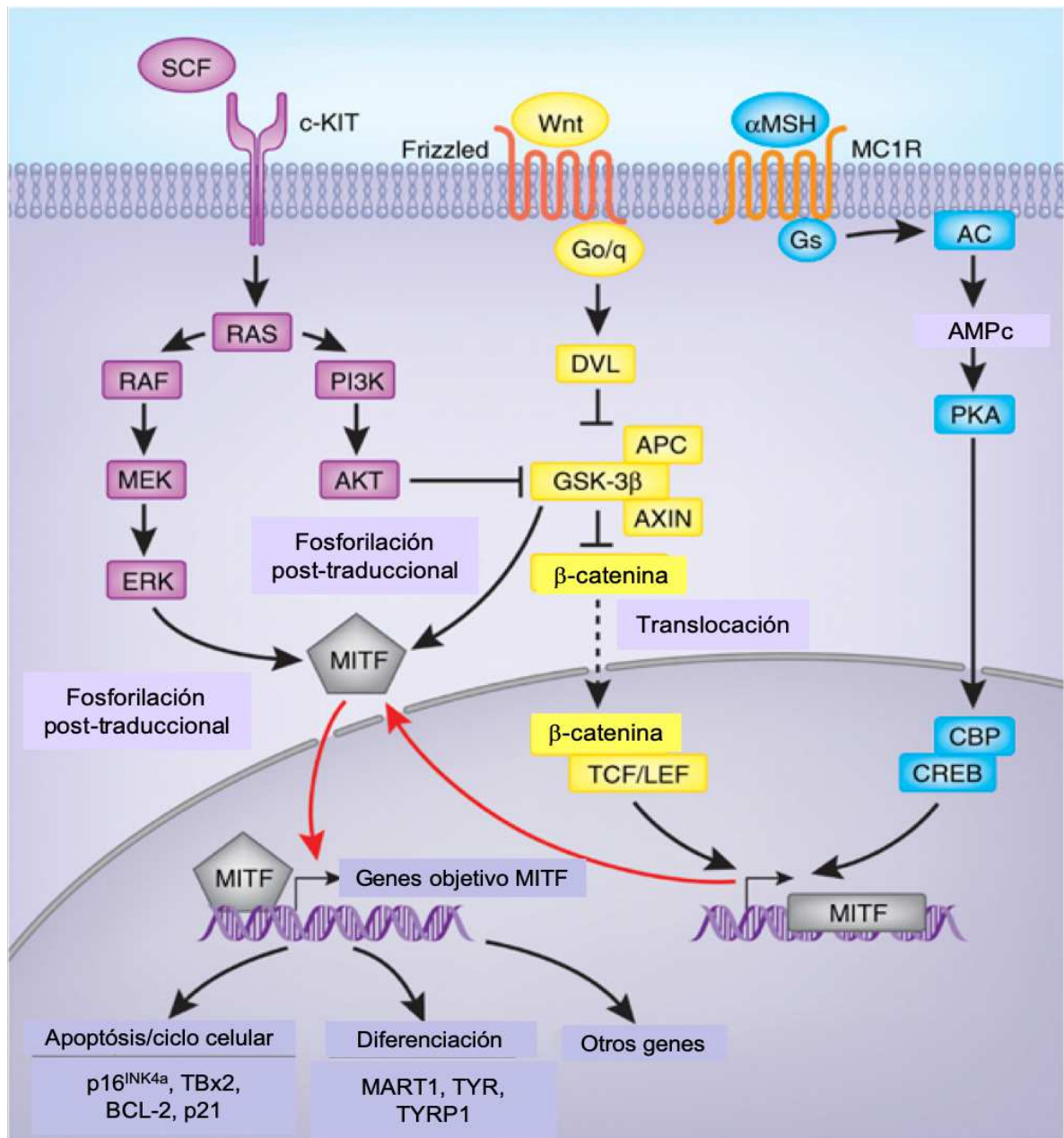
regulación al alza de *MITF*, favoreciendo un fenotipo proliferativo y reprimiendo la invasión (Koludrovic y Davidson, 2013; Arozarena y cols., 2011).

La vía de la hormona alfa estimulante de los melanocitos ( $\alpha$ -MSH) está mediada por el receptor de melanocortina 1 (MC1R), la cual activa la proteína G produciéndose un aumento en los niveles del segundo mensajero AMPc por acción del adenilato ciclasa (AC). El AMPc activa a la proteína cinasa A (PKA). Una vez activa la PKA, es capaz de fosforilar, entre otros, a proteínas que actúan como factores de transcripción como la proteína CREB (factor de unión a elementos de respuesta de AMPc), la cual participa en la modulación de síntesis proteica. (Koludrovic y Davidson, 2013; Hocker y cols., 2008).

Por otro lado, SOX10 y PAX3 juegan papeles importantes en la expresión de *MITF* y en el desarrollo de melanocitos. SOX10 se expresa en las células troncales de la cresta neural y se requiere para el desarrollo y la supervivencia de varios linajes derivados de la cresta neural, incluidos los melanocitos (Koludrovic y Davidson, 2013). El papel de PAX3 en el control de la expresión de *MITF* es menos conocido, se han informado la capacidad de PAX3 para cooperar con SOX10 en la activación del promotor *MITF-M* (Hou y Pavan, 2008).

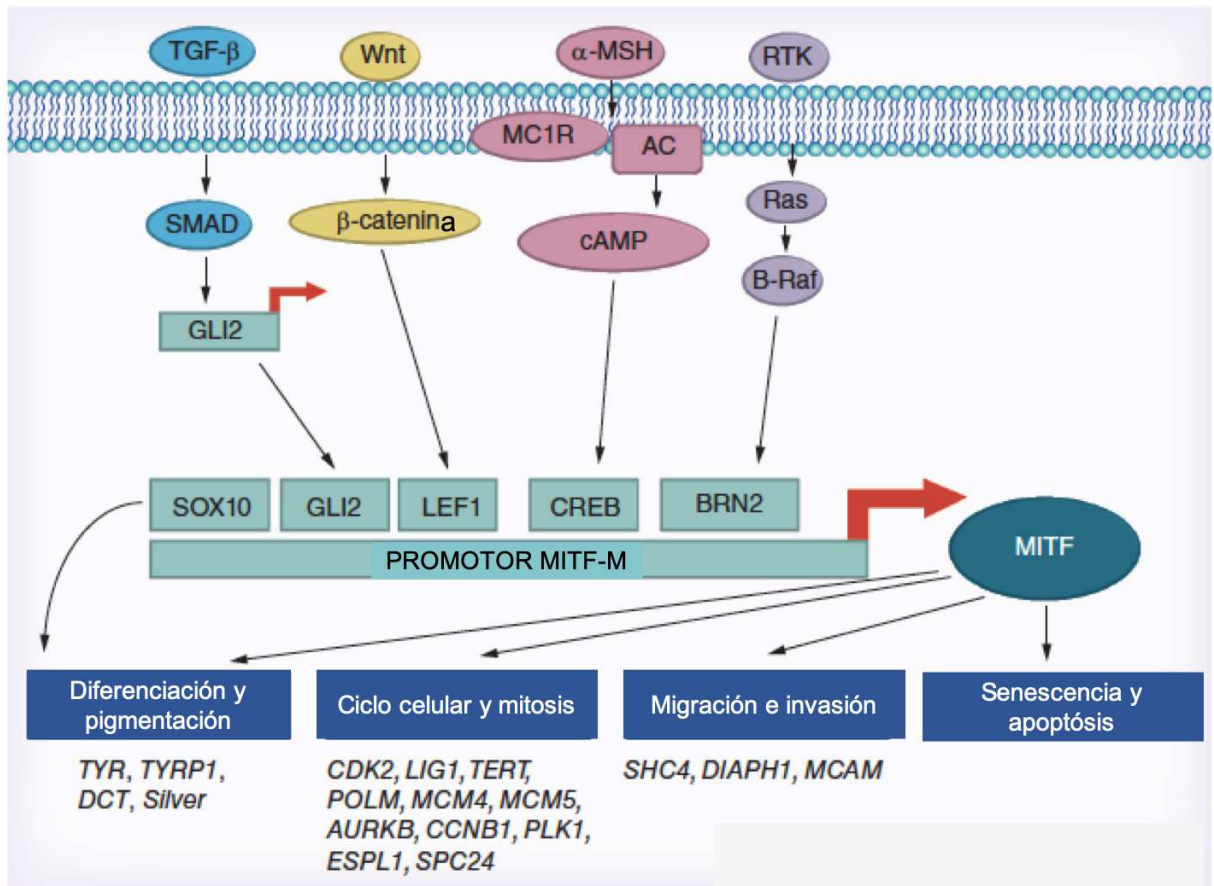
En la figura 2 se esquematizan algunos genes dianas de *MITF* involucrados en los diferentes procesos. Inicialmente, se identifican las enzimas involucradas en la síntesis y pigmentación de melanina (TYR, TYRP-1 y dopacromo tautomerasa) (Wels y cols., 2011). Además, *MITF* regula los genes del ciclo celular, como CDKN1A/B, CDKN2A y CDK2, y promueve la supervivencia celular mediante la regulación de proteínas asociadas a la apoptosis como BCL-

2 y HIF-1A (Hartman y Czyz, 2015; Somasundaram y cols., 2012). La activación de los genes de diferenciación, proliferación y supervivencia explica el papel esencial de *MITF* en el establecimiento y mantenimiento de la población normal de melanocitos (Vachtenheim y cols., 2017). De igual manera, *TBX-2* se identifica como un objetivo directo de *MITF*, el cual es considerado un marcador de diferenciación temprano de los melanocitos (Wellbrock y Arozarena, 2015) y, además, suprime las funciones de *CDKN1A* y *CDKN2A*, por lo que tiene un papel en la senescencia y proliferación del melanoma (Hartman y Czyz, 2015). Asimismo, *DIAPH1* puede contribuir al cambio de fenotipo en las células neoplásicas, ya que coordina la red de actina y actúa sobre los microtúbulos en la periferia celular (Somasundaram y cols., 2012), así como en la regulación positiva de las metaloproteasas de la matriz (Vachtenheim y cols., 2017). *MITF* también regula la transcriptasa inversa de la telomerasa (*TERT*), el cual se requiere para la replicación adecuada de los telómeros y se expresa con frecuencia en tumores humanos, pero no en células somáticas normales (Koludrovic y Davidson, 2013). También se ha observado que *MITF* está en el centro de las redes reguladoras de genes asociadas con los estados proliferativos e invasivos, y el nivel de proteína funcional de *MITF* determina, en gran medida, las propiedades biológicas de las células del melanoma (Koludrovic y Davidson, 2013).



**Figura 1. Principales vías de señalización implicadas en la actividad de MITF.** La transcripción del gen *MITF* y las modificaciones postraduccionales están fuertemente influenciadas por múltiples vías de señalización, que incluyen c-Kit (púrpura), Wnt/β-Catenina (amarillo) y α-MSH (azul). **C-KIT (púrpura):** Es activada por el factor de células troncales (SCF) desencadenando la activación de las vías MAPK y PI3K y la modulación posterior de la señalización de *MITF*. **Wnt/β-catenina (amarillo):** Su activación da como resultado la estabilización y la translocación nuclear de β-catenina. La estimulación de Wnt activa la proteína Dishevelled (DVL), que inhibe el complejo -adenomatous polyposis coli- (APC) y -glucogeno sintasa cinasa 3- (GSK-3), por lo tanto, actúa sobre β-catenina para su degradación proteosómica y en el factor de unión 1 al Potenciador Linfoides (LEF, también conocido como TCF), las cuales cooperan para inducir la expresión de *MITF*. **α-MSH (azul):** α-MSH se une al receptor de melanocortina 1 (MC1R), lo que resulta en la activación de adenilil ciclasa (AC), la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMPc) y la activación de la proteína cinasa A (PKA). Esto da como resultado la fosforilación de CREB (cAMP response element-binding, en inglés), que promueve el reclutamiento de la proteína de unión a CREB (CBP) y la posterior activación del promotor *MITF* (Adaptado de Hocker y cols., 2008).





**Figura 2. Esquema de algunas vías de señalización y factores que regulan la expresión de MITF.** El promotor MITF-M se representa esquemáticamente con los sitios de unión para varios de los principales factores de transcripción. Se enumeran algunos de los genes diana clave de MITF involucrados en los procesos indicados (Adaptado de Koludrovic y Davidson, 2013).

### 1.2.3 Inmunoexpresión de MITF en melanomas

MITF es considerado un anticuerpo específico de identificación del linaje melanocítico, es un marcador diagnóstico sensible y del desarrollo de melanoma (Mochel y cols., 2015). Estudios previos (Hartman y Czyz, 2015; Hsieh y cols., 2013; Palmieri y cols., 2009) han reportado la inmunoexpresión de la proteína MITF en melanomas cutáneos y sugieren que su alta inmunoexpresión en tumores primarios está asociada a fenotipos menos agresivos con decremento de la proliferación de células neoplásicas malignas. Lo anterior conduce a una

menor incidencia de metástasis ganglionar y por lo tanto a una mejor sobrevida (Naffouje y cols., 2015; Hartman y Czyz, 2015; Shtivelman y cols., 2014).

Naffouje y cols. (2015), consideran a MITF como un marcador pronóstico en el melanoma cutáneo, debido a que se ha encontrado que a mayor porcentaje de células positivas a MITF se presenta menor metástasis ganglionar, en contraste a lo encontrado entre los casos con <50% de expresión de la proteína ( $p=0.04$ ). Adicionalmente, Agnarsdóttir y cols. (2012), reportaron la expresión de MITF en el 84% (223/264) de las muestras de MC primarios, identificando que en neoplasias con inmunomarcaje nuclear fuerte existe mejor pronóstico en comparación con aquellas que presentaron inmunoreactividad débil. Estos hallazgos sugieren que la disminución de la inmunoexpresión de MITF puede ayudar a identificar pacientes con potencial riesgo de recurrencias y metástasis ganglionar en melanoma cutáneo. Sin embargo, señalan el uso simultáneo de biomarcadores de proliferación celular como Ki-67 y MCM-2 para considerarlo como marcador pronóstico.

Actualmente no existen estudios que investiguen exclusivamente la inmunoexpresión de MITF en melanomas de mucosas nasosinusal y bucal; sin embargo, Alaeddini y Etemad-Moghadam (2015), compararon la expresión de MITF entre tumores bucales y cutáneos de cabeza y cuello, mostrando que la inmunoexpresión de esta proteína en los MMB fue significativamente menor que en los MC; empero, no fue evaluada la supervivencia de los pacientes, limitando la posible relación entre la expresión de MITF como marcador pronóstico entre los MMB.

En conclusión, los autores coinciden en el papel relevante de la inmunoeexpresión de MITF en melanomas cutáneos primarios junto con criterios clínicos establecidos, tales como el índice de Breslow, ulceración, y el desarrollo de metástasis para considerarlo un marcador pronóstico (Hartman y Czyz, 2015; Hsieh y cols., 2013; Palmieri y cols., 2009; Salti y cols., 2000), lo cual no ha sido analizado en melanomas de mucosas nasosinusal y bucal.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN**

El MMNSB es una entidad de baja incidencia, con un comportamiento clínico agresivo y con tasas de supervivencia a 5 años que van del 15 al 30%. Si bien, existe poca información sobre su etiopatogenia, se ha identificado la amplificación de proteínas de la vía MAPK tales como C-KIT y MITF sugiriendo su participación en el desarrollo de estos tumores, siendo MITF indispensable para la supervivencia y diferenciación de los melanoblastos y los melanocitos.

En años recientes, distintos autores también han identificado que una alta expresión de MITF está relacionada con la progresión tumoral. Asimismo, MITF, al ser un regulador dependiente del linaje melanocítico, se considera un predictor confiable de supervivencia para estas neoplasias.

Se han realizado estudios en México que brindan información de las características clínico-patológicas de los MMNSB, pero son inexistentes las series que describan el inmunomarcaje de esta proteína en la población mexicana. En consecuencia, el presente estudio busca caracterizar la expresión de MITF en un grupo de MMNSB primarios embebidos en formol y preservados en parafina mediante su tinción inmunohistoquímica, así como determinar su posible asociación con las características clínico-patológicas de dichos casos.

Los hallazgos del presente estudio aportarán información sobre estas neoplasias, enriqueciendo los conocimientos acerca de su patogénesis y comportamiento. Además, será un antecedente de utilidad para investigaciones dirigidas a buscar una relación entre la inmunoexpresión de esta proteína y la presencia de alteraciones en las diferentes vías de señalización implicadas en la actividad de MITF

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Identificar la proporción de expresión inmunohistoquímica de la proteína MITF en muestras de MMNSB de pacientes diagnosticados en el Instituto Nacional de Cancerología de la Ciudad de México en el período comprendido de enero de 2000 a septiembre de 2017.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Describir las características demográficas y clínicas de los individuos con MMNSB.
- Describir las características histopatológicas de los casos de MMNSB de acuerdo a una adaptación a la clasificación WESTOP.
- Establecer la proporción e intensidad de inmunoexpresión de la proteína MITF en MMNSB
- Analizar la posible asociación entre las características clínico-patológicas y la expresión de la proteína MITF en MMNSB.

### **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **4.1 Diseño del estudio**

Estudio transversal, retrospectivo, retrolectivo y descriptivo que se desarrolló en muestras de MMNSB diagnosticadas en el Instituto Nacional de Cancerología de México en el período de enero 2000 a septiembre de 2017.

#### **4.2 Criterios de inclusión**

- Casos diagnosticados como MMNSB en el Laboratorio de Patología del INCan de México en el período del 2000 al 2017, con laminilla y bloque de parafina que tuviera muestra tisular suficiente para su análisis inmunohistoquímico.

#### **4.3 Criterios de exclusión**

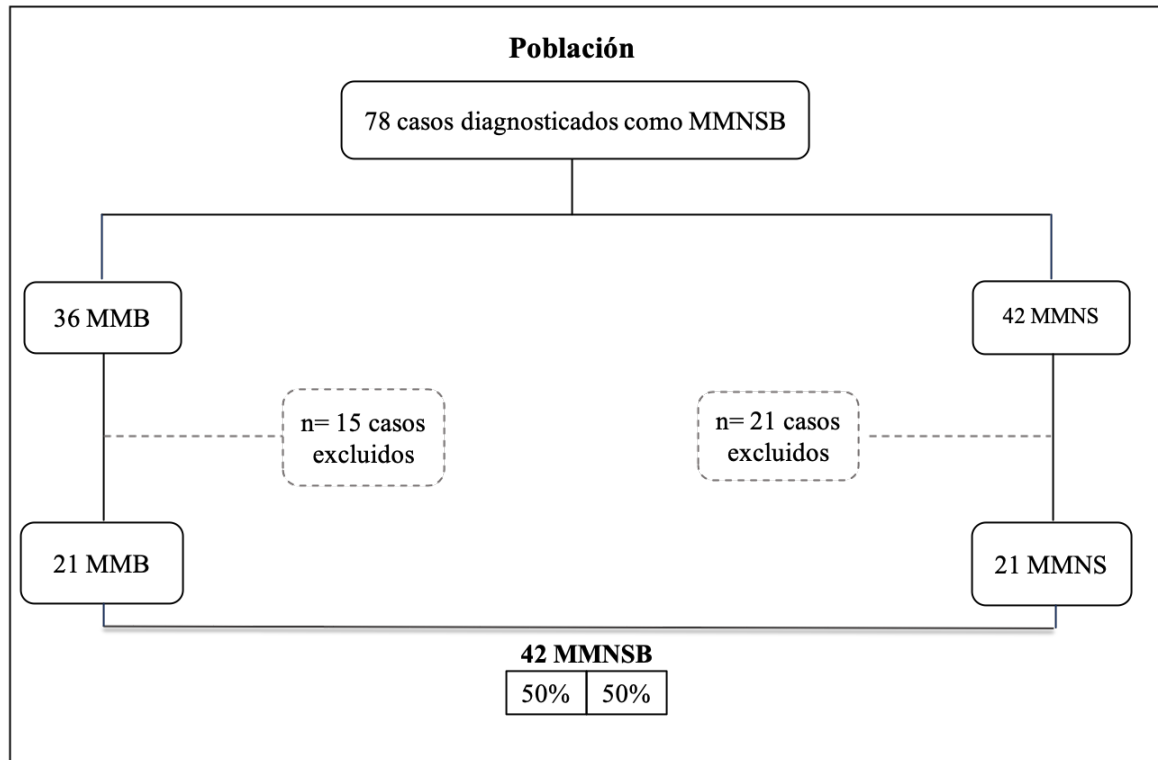
- Individuos con diagnóstico de melanoma cutáneo con extensión a mucosa nasosinusal o bucal.
- Individuos con tratamiento oncológico previo a ser ingresados al INCan.

#### **4.4 Criterios de eliminación**

- Muestras que después de realizar la técnica de inmunohistoquímica sufrieron algún daño que no permitió su correcta evaluación.

#### **4.5. Población de estudio**

En el presente estudio se consideraron 78 casos de MMNSB primarios, de ellos: 15 MMB y 21 MMNS fueron eliminados por no contar con suficiente tejido representativo de la lesión para poder realizar las pruebas de inmunohistoquímica. Finalmente se incluyeron 42 casos de MMNSB primarios: 21 MMB y 21 MMNS. La figura 3 resume lo anteriormente mencionado



**Figura 3. Población de estudio.** MMNSB: melanoma de mucosa nasosinusal y bucal; MMB: melanoma de mucosa bucal; MMNS: melanoma de mucosa nasosinusal. Puede observarse la población circunscrita para el estudio y el análisis de variables.

#### 4.6 Evaluación de los casos

Se elaboró una ficha de recolección de datos *ex profeso* para este estudio (Anexo I), en la que se registraron datos demográficos (nombre del paciente, edad, sexo, lugar de procedencia, ocupación), y clínicos [consumo de tabaco, ingesta de alcohol, tiempo de evolución (definido como el tiempo desde el cual el paciente refirió la aparición de la lesión hasta que se realizó el diagnóstico en el INCan), tamaño, localización, color, estadio, presencia de ganglios afectados, sintomatología, tratamiento realizado]. Se determinó el estadio clínico de acuerdo con el sistema del American Joint Committee on Cancer (AJCC) (Anexo II). De igual manera, se consideró el registro de las características histopatológicas (adaptación a la clasificación WESTOP, patrón de crecimiento, patrón de distribución, tipo celular predominante, presencia

de melanina, necrosis, infiltrado inflamatorio, número de mitosis por mm<sup>2</sup> a 40x, invasión neural y vascular (Anexo III) (Williams y cols., 2019; Maldonado-Mendoza y cols., 2015) e inmunohistoquímicas. Cabe mencionar que no se realizó el conteo de mitosis por mm<sup>2</sup> (40x) en tres casos por tratarse de biopsias incisionales y no contar con material neoplásico suficiente.

#### **4.7 Procedimiento de laboratorio**

##### **4.7.1 Evaluación histopatológico**

Los bloques de parafina seleccionados se procesaron en el Laboratorio de Patología Bucal de la UAM-X, cada lesión se analizó histopatológicamente con tinción de rutina (H&E) y se evaluó bajo el microscopio óptico de dos cabezas (*Olympus CH30*) por una especialista en Patología y Medicina Bucal [JLMM] y el alumno de maestría [BMOH]. El valor de la prueba estadística de kappa ( $\kappa$ ) obtenido para medir la concordancia interexaminadores fue de 0.80.

#### **4.8 Inmunohistoquímica de MITF**

##### **4.8.1 Preparación de la muestra**

Se realizaron cortes de 3  $\mu\text{m}$  de espesor y se montaron en laminillas electrocargadas (*Kling-On Slides, Biocare-medical®*, USA). Estos cortes fueron desparafinados en una estufa a 60 °C durante 30 minutos, y posteriormente se les colocó en xileno durante 5 minutos. Posteriormente los cortes fueron hidratados en alcoholes a concentraciones descendentes y enjuagues con agua bidestilada.



#### **4.8.2 Reacción inmunohistoquímica**

La inmunohistoquímica se realizó en el Laboratorio de Patología Molecular e Inmunohistoquímica del INCan en la ciudad de México, utilizando el sistema de detección MACH 4™ Universal AP Polymer Kit (*Biocare*). Se utilizó el anticuerpo primario monoclonal previamente estandarizado (anti-MITF, *Dako*, clona D5, ratón), en una dilución de 1:50. A los casos que presentaron hemorragia y/o componente inflamatorio, se les realizó un enriquecimiento tisular, que consistió en elegir un área representativa con >50% de celularidad tumoral, con ayuda de la laminilla H&E y un punch de 5 mm; una vez obtenida la sección elegida, se obtuvo en parafina para la construcción de un bloque único. Posteriormente, se realizó la recuperación antigénica (*BioSB*) mediante un medio ácido (ácido cítrico pH 6.0), 10 minutos dentro de una olla de presión, luego se enjuagaron las laminillas con PBS (buffer de fosfatos pH 7.5) por 5 minutos. Las laminillas se montaron en placas de cubiertas y colocadas en bastidores (Cover Plate) para la realización de inmunohistoquímica por capilaridad. Las peroxidasas endógenas fueron bloqueadas con peróxido de hidrógeno al 0.9% seguido de lavados con PBS por 5 minutos. Después, se incubaron las laminillas en el anticuerpo MITF durante 60 minutos. A lo que siguió un enjuague con PBS por 5 minutos. Luego, los cortes fueron incubados en el anticuerpo secundario y el complejo de polímero-AP (polímero acoplado a fosfatasa alcalina) por 30 minutos. El revelado de las reacciones fue mediado por el cromógeno PermaRed/AP (*Diagnostic BioSystems*), las secciones se contratiñeron con hematoxilina acuosa. Para garantizar la especificidad del anticuerpo, se realizaron ensayos omitiendo el anticuerpo primario como control negativo y, por cada laminilla evaluada, se utilizó un nevo intradérmico como control positivo.

### **4.8.3 Cuantificación de la inmunoexpresión**

La expresión de MITF se consideró positiva cuando se observó una tinción nuclear en color rojo similar a la presente en el tejido control positivo (nevo intradérmico). Para el registro de la expresión inmunohistoquímica de las células neoplásicas se utilizaron dos métodos el cualitativo y el semi-cuantitativo. Ambos realizados por un patólogo [HAMM] y el alumno de maestría [BMOH], bajo un microscopio óptico de tres cabezas (*Zeiss, Axio Lab. A.1*), tomando en cuenta el porcentaje de células positivas, intensidad de tinción, y el patrón de tinción (nuclear).

El análisis semi-cuantitativo, en el cual se contabilizaron sólo las células positivas, fue estimado visualmente agrupándolas en hasta 5 nidos tumorales como máximo. Después, se calculó una media aritmética ponderada de dichos porcentajes teniendo en cuenta la proporción total del tumor de cada área. Finalmente, de acuerdo a la distribución de la muestra, los resultados se dividieron en categorías por el porcentaje de expresión en <70%, 70-85% y >85%.

La intensidad de la inmunorreactividad se asignó de acuerdo con el aspecto global de la tinción en el tumor como leve/moderada (++) y fuerte (+++), cuando la expresión de MITF fue heterogénea, el porcentaje de células tumorales positivas fue calculado como la media aritmética ponderada de todas las diferentes áreas tumorales en la laminilla.

## **4.9 Variables**

**Dependientes:** Inmunoexpresión de MITF

**Independientes:** Melanoma nasosinusal y bucal, características clínicas e histopatológicas. En el Anexo IV se presenta la operacionalización de las variables dependientes e independientes respectivamente.

## **4.10 Análisis estadístico**

Los datos de la ficha de recolección se codificaron y capturaron utilizando el software SPSS Statistics versión 21.0 (IBM®). Se obtuvieron proporciones de las variables nominales y ordinales, y se calcularon medidas de tendencia central (medias y medianas) y de dispersión (desviación estándar e intervalos intercuartilares) para las variables continuas. Las posibles asociaciones entre variables categóricas y nominales se estudiaron a través de la prueba de Chi cuadrada o exacta de Fisher, según fue necesario. La distribución de variables cuantitativas se analizó con la prueba de U-Mann-Whitney. Para comparar los promedios del porcentaje de la expresión de los marcadores en el conteo celular de los grupos se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Las pruebas de hipótesis se realizaron para un nivel de confianza de alfa  $\leq 0.05$ . Cabe mencionar, que para el análisis del porcentaje inmunoexpresión como variable continua, se eliminó un valor por considerarse fuera de rango.

## **4.11 Consideraciones bioéticas**

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Investigación del INCan de México con el número de referencia INCan (Rev/10/16). Asimismo, el Comité Científico y de Ética de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-X mediante la actualización del

acuerdo 7/18, llevada a cabo el 28 de mayo del 2018, aprobó este protocolo como parte del proyecto “Biomarcadores específicos para el desarrollo del cáncer bucal”.

De acuerdo con el artículo 3° del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud y al título segundo de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, el presente estudio fue una investigación sin riesgo porque aplicó métodos documentales retroactivos sin realizar modificaciones intencionadas en las variables.

Al tratarse de un estudio en el que se utilizó un archivo de muestras de tejido humano, se garantizó el derecho a la intimidad, respeto y confidencialidad de los datos clínicos colectados; asimismo, las muestras e información obtenidas no fueron tratadas ni cedidas con fines distintos a los previstos para el mismo, ni tampoco con fines de lucro.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Características demográficas**

En el presente estudio se incluyeron 42 casos; 21 (50%) correspondieron a MMNS y 21 (50%) a MMB. La mediana de edad de los casos fue de 56.5 ( $Q_1$ - $Q_3$ =48.7-69) años, encontrándose una mayor proporción de mujeres en el grupo de MMNS en contraste con el MMB (16/21, 76.2% vs. 8/21, 38.1%,  $p=0.028$ ) (Cuadro 1).

### **5.2 Características clínicas**

La encía y la fosa nasal fueron las localizaciones más frecuentes en los pacientes con MMB (13/21, 61.9%) y MMNS (15/21, 71.4%), respectivamente. Los MMNS fueron lesiones únicas con extensión a senos como el maxilar, etmoidal, esfenoidal y frontal. En contraste, los MMB presentaron lesiones satélites y/o extensión a mucosa labial, yugal y paladar. Cabe mencionar que 33 de las 42 lesiones analizadas (78.6%) presentaron como signo clínico la hiperpigmentación ( $p=0.020$ ).

Como se muestra en el Cuadro 1, todos los pacientes con MMNS presentaron signos y síntomas al momento del diagnóstico (obstrucción nasal, epistaxis, rinorrea y aumento de volumen progresivo en la zona afectada), en contraste, solo la mitad de los pacientes con MMB (10/47.6%) refirieron aumento de volumen y pérdida de peso ( $p=0.001$ ). La mayoría de los pacientes incluidos fueron sometidos a cirugía con márgenes amplios y recibieron agentes quimioterapéuticos como la dacarbazina y radioterapia (16-45 Gy) fraccionada en cinco sesiones (33/78.6%,  $p=1.000$ ).

Todos los MMNSB fueron diagnosticados en etapa clínica IVA (78.6%). Un hallazgo interesante fue la alta proporción de MMB que presentaron linfadenopatía al momento del diagnóstico en comparación con los MMNS (66.7% vs. 33.3%,  $p=0.031$ , respectivamente). El 81% de los casos de MMB desarrollaron metástasis, en comparación con el 47.6% de MMNS ( $p=0.052$ ), siendo el sitio más frecuente para MMB la glándula parótida, y cerebro y pulmón para los MMNS. Con respecto al estado de los pacientes, al momento de revisar los expedientes clínicos, 8 (19%) se encontraban vivos y en control; uno de ellos con actividad tumoral, 12 (28.6%) fallecieron y 22 (52.4%) se perdieron durante el seguimiento.

### 5.3 Características histopatológicas

Como se observa en los cuadros 2a y 2b, 39 (92.8%) MMNSB presentaron comportamiento invasor y crecimiento vertical (Figura 4a), y solo tres MMB fueron melanoma *in situ* (Figura 2b). Treinta y cinco (85.7%) fueron tumores polimórficos mostrando poblaciones y distribuciones celulares heterogéneas con características epitelioides, plasmocitoides y fusiformes dispuestas en patrones alveolar-organoide, sólido y periteliomatoso (Figura 4c-e). Adicionalmente, en la mayoría de las muestras (37/42, 88.1%) se identificaron depósitos de melanina. La mediana de mitosis atípicas por  $\text{mm}^2$  (40x) fue mayor en los MMNS que en los MMB (9 [ $Q_1$ - $Q_3$ =5.5-16.5] vs. 6 [ $Q_1$ - $Q_3$ =3-9],  $p=0.033$ ). (Figura 5). Solo dos casos de MMB presentaron invasión neural (4.8%) en contraste con los 38 MMNS en los que se observó invasión vascular (90.5%) ( $p=0.107$ ) (Figura 6).

#### 5.4 Expresión inmunohistoquímica de MITF

En todos los casos se identificó inmunoexpresión de MITF, con una mediana de 80% (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>= 70-85%), en patrones focales y difusos. Como se observa en el cuadro 3, la mediana de células positivas a MITF fue comparable en ambas localizaciones (MMNS=80% [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>= 72.5-85%] vs. MMB= 77.5% [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>=60-85%]) (p=0.638). La mediana de inmunoexpresión fue similar en los casos con y sin recurrencia (80% [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>=52.5-86.2%] y 80% [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>=70-85%], respectivamente) (p=0.201). Respecto al patrón de invasión, la mediana de células positivas a MITF fue menor en los casos con invasión neural, en contraste con los tumores en los que no se observó invasión neural (42.5% [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>=30-55%] y 80% [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>=75-85%], respectivamente) (p=0.022).

Todos los melanomas *in situ* mostraron un alto porcentaje de inmunoexpresión de MITF (100%), en contraste con 12.8% de los melanomas invasores (p=0.001). En relación al patrón de distribución tumoral, el 25.1% de los casos con inmunoexpresión baja se disponían alveolarmente, el 59.1% de los casos con inmunoexpresión media presentaron un patrón mixto, y el 37.5% de los casos con inmunoexpresión alta tenían patrón pagetoide (p=0.024). En cuanto al tipo de celularidad tumoral, todos los casos con inmunoexpresión baja tenían componente mixto (p=0.004). Los 12 casos que presentaron invasión vascular tenían inmunoexpresión baja (100%), en contraste con el 62.5% de los casos con inmunoexpresión alta no presentaron invasión vascular (p=0.022) (Cuadro 4).

Al analizar el patrón de intensidad de inmunomarcaje, el 83.3% (35/42) de los MMNSB mostraron inmunomarcaje débil a moderado, y solo en el 16.7% presentó inmunomarcaje

fuerte. No se identificó asociación entre la intensidad del inmunomarcaje y el tiempo de evolución, la presencia de signos o síntomas, la presencia de ganglios palpables al momento del diagnóstico o el desarrollo de metástasis.

Los MMNSB *in situ* mostraron inmunoreactividad fuerte de MITF (100%) en comparación con los casos invasores, cuya expresión fue de débil a moderada (89.7%) ( $p=0.003$ ). Todos los casos con patrón alveolar y periteliomatoso mostraron intensidad débil a moderada, en contraste con los tumores pagetoides en los que se observó una intensidad fuerte ( $p=0.001$ ). Por otro lado, una mayor proporción de tumores con población polimórfica mostraron intensidad débil a moderada (33/36, 91.7%), a diferencia de las neoplasias monomórficas en los que 4/6 casos presentaron inmunomarcaje fuerte ( $p=0.004$ ) (Cuadro 5).

De manera interesante, la mayor proporción de casos que presentaron invasión vascular y de número de mitosis atípicas mostraron intensidad débil a moderada (89.5% y 95.2%) ( $p=0.011$  y  $p=0.559$ ).



**Cuadro 1.** Características demográficas y clínicas en 42 pacientes con MMNSB.

Características	MMB	MMNS	P	MMNSB
	(n=21)	(n=21)		(n=42)
	n (%)	n (%)		n (%)
<b>Sexo</b>				
Femenino	8 (38.1)	16 (76.2)	<b>0.028<sup>a</sup></b>	24 (57.1)
Masculino	13 (61.9)	5 (23.8)		18 (42.9)
<b>Mediana de edad (años) (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)</b>	55 (49-59)	62 (48-74)	0.478 <sup>b</sup>	56.5 (48.7-69)
<b>Consumo de tabaco</b>				
Si	9 (42.9)	5 (23.8)	0.326 <sup>a</sup>	14 (33.3)
No	12 (57.1)	16 (76.2)		28 (66.7)
<b>Consumo de alcohol</b>				
Si	9 (42.9)	4 (19.0)	0.181 <sup>a</sup>	13 (31.0)
No	12 (57.1)	17 (81.0)		29 (69.0)
<b>Color</b>				
Hiperpigmentado	20 (95.2)	13 (61.9)	<b>0.020<sup>a</sup></b>	33 (78.6)
Amelánico	1 (4.8)	8 (38.1)		9 (21.4)
<b>Tiempo de evolución</b>				
< 6 meses	8 (38.1)	7 (33.3)	0.942 <sup>c</sup>	15 (35.7)
7 a 11 meses	4 (19.0)	4 (19.0)		8 (19.0)
> 12 meses	9 (42.9)	10 (47.6)		19 (45.2)
<b>Sintomatología</b>				
Si	10 (47.6)	20 (95.2)	<b>0.001<sup>c</sup></b>	30 (71.4)
No	10 (47.6) n=20	0 (0) n=20		10 (23.8)
<b>Recurrencia</b>				
Si	6 (28.6)	5 (23.8)	1.000 <sup>a</sup>	11 (26.2)
No	15 (71.4)	16 (76.2)		31 (73.8)

Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>= intervalo intercuartilar; MMB= melanoma de mucosa bucal; MMNS= melanoma de mucosa nasosinusal.

<sup>a</sup>Prueba exacta de Fisher, <sup>b</sup>U-Mann-Whitney <sup>c</sup>Chi-Cuadrada.

**Cuadro 2a.** Características histopatológicas de 42 pacientes con MMNSB.

Características	MMB	MMNS	P	Total
	(n=21)	(n=21)		(n=42)
	n (%)	n (%)		n (%)
<b>Clasificación WESTOP</b>				
<i>In situ</i>	3 (14.3)	0 ( 0 )	0.232 <sup>a</sup>	3 ( 7.2)
Invasor	18 (85.7)	21 ( 100)		39 (92.8)
<b>Patrón de distribución</b>				
Alveolar / Organoide	8 (38.1)	5 (23.8)	0.218 <sup>b</sup>	13 (31.0)
Sólido	1 ( 4.7)	2 ( 9.5)		3 ( 7.1)
Pageteoide	3 (14.3)	0 ( 0 )		3 ( 7.1)
Periteliomatoso	0 ( 0 )	1 ( 4.8)		1 ( 2.4)
Mixto	9 (42.9)	13 (61.9)		22 (52.4)
<b>Tipo de célula</b>				
Epitelioide	4 (19.0)	2 ( 9.5)	0.663 <sup>a</sup>	6 (14.3)
Mixto	17 (81.0)	19 (90.5)		36 (85.7)
<b>Melanina</b>				
Presente	19 (90.5)	18 (85.7)	1.000 <sup>a</sup>	37 (88.1)
Ausente	2 ( 9.5)	3 (14.3)		5 (11.9)
<b>Mediana de mitosis (mm<sup>2</sup> a 40X) (Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>)</b>				
	6 ( 3-9 )	9 ( 5.5-16.5)	<b>0.033<sup>c</sup></b>	8 (4-11.2)
<b>Invasión vascular</b>				
Presente	17 (81.0)	21 ( 100)	0.107 <sup>a</sup>	38 (90.5)
Ausente	4 (19.0)	0 ( 0 )		4 ( 9.5)
<b>Invasión neural</b>				
Presente	2 ( 9.5)	0 ( 0 )	0.488 <sup>a</sup>	2 ( 4.8)
Ausente	19 (90.5)	21 ( 100)		40 (95.2)

MMB= melanoma de mucosa bucal; MMNS= melanoma de mucosa nasosinusal.

<sup>a</sup>Prueba exacta de Fisher <sup>b</sup>Chi-Cuadrada <sup>c</sup>U-Mann-Whitney

**Cuadro 2b.** Características histopatológicas de 42 pacientes con MMNSB.

Características	MMB	MMNS	P	Total
	(n=21)	(n=21)		(n=42)
	n (%)	n (%)		n (%)
<b><i>Necrosis</i></b>				
Ausente	7 (33.3)	3 (14.3)	0.200 <sup>b</sup>	10 (23.8)
≤30%	12 (57.1)	11 (52.4)		23 (54.8)
31-60%	1 ( 4.8)	5 (23.8)		6 (14.3)
>61%	1 ( 4.8)	2 ( 9.5)		3 ( 7.1)
<b><i>Infiltrado inflamatorio</i></b>				
Presente	18 (85.7)	21 ( 100)	0.232 <sup>a</sup>	39 (92.9)
Ausente	3 (14.3)	0 ( 0 )		3 ( 7.1)
<b><i>Tipo de infiltrado</i></b>				
Agudo	0 ( 0 )	2 ( 9.5)	0.348 <sup>b</sup>	2 ( 5.1)
Crónico	12 (66.7)	11 (52.4)		23 (59.0)
Mixto	6 (33.3)	8 (38.1)		14 (35.9)
<b><i>Distribución de infiltrado</i></b>				
Focal	8 (44.4)	11 (52.4)	0.751 <sup>b</sup>	19 (48.7)
Disperso	10 (55.6)	10 (47.6)		20 (51.3)
<b><i>Cantidad de infiltrado</i></b>				
Leve	7 (38.9)	8 (38.1)	0.257 <sup>b</sup>	15 (38.5)
Moderado	9 (50.0)	13 (61.9)		22 (56.4)
Intenso	2 (11.1)	0 ( 0 )		2 ( 5.1)

MMB= melanoma de mucosa bucal; MMNS= melanoma de mucosa nasosinusal.

<sup>a</sup>Prueba exacta de Fisher <sup>b</sup>Chi-Cuadrada <sup>c</sup>U-Mann-Whitney

**Cuadro 3.** Características clínicas e histopatológicas en 42 MMNSB de acuerdo con la proporción de inmunexpresión de MITF.

<b>Características</b>	<b>Mediana de células positivas</b>	<b>(Q<sub>1</sub> - Q<sub>3</sub>)</b>	<b>P</b>
<b><i>Localización</i></b>			
MMB	77.5	( 60.0 – 85.0 )	0.638 <sup>a</sup>
MMNS	80	( 72.5 – 85.0 )	
<b><i>Sexo</i></b>			
Femenino	80	( 75.0 – 88.7 )	0.050 <sup>a</sup>
Masculino	75	( 57.5 – 82.5 )	
<b><i>Tiempo de evolución</i></b>			
≤ 6 meses	70	( 55.0 – 85.0 )	0.201 <sup>b</sup>
7-11 meses	80	( 75.0 – 85.0 )	
≥ 12 meses	80	( 75.0 – 86.2 )	
<b><i>Recurrencia</i></b>			
Si	80	( 52.5 – 86.2 )	0.652 <sup>a</sup>
No	80	( 70.0 – 85.0 )	
<b><i>Invasión vascular</i></b>			
Si	80	( 70.0 – 85.0 )	<b>0.046<sup>a</sup></b>
No	90	( 78.7 – 93.7 )	
<b><i>Invasión neural</i></b>			
Si	42.5	( 30.0 – 55.0 )	<b>0.022<sup>a</sup></b>
No	80	( 75.0 – 85.0 )	
<b><i>Mitosis por mm<sup>2</sup> a 40x</i></b>			
>6	80	( 60.0 – 85.0 )	0.774 <sup>a</sup>
>7	80	( 71.2 – 85.0 )	

Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>= intervalo intercuartilar MMB= melanoma de mucosa bucal; MMNS= melanoma de mucosa nasosinusal; MMNSB= melanoma de mucosa nasosinusal y bucal. <sup>a</sup>U-Mann-Whitney, <sup>b</sup>Chi-Cuadrada.

**Cuadro 4.** Clasificación WESTOP, patrón de distribución y población celular de acuerdo con la proporción de inmunexpresión de MITF.

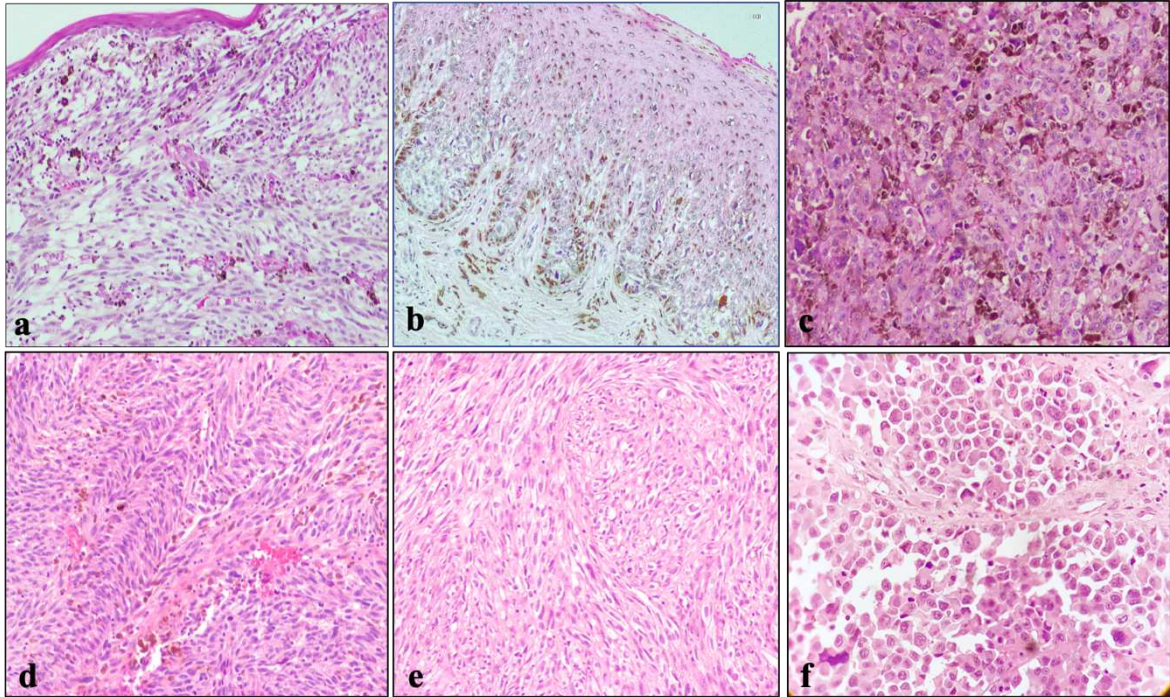
Características	< 70 %	70-85%	> 85%	P
	(n=12)	(n=22)	(n=8)	
	n (%)	n (%)	n (%)	
<b>Clasificación WESTOP</b>				
<i>In situ</i>	0 ( 0 )	0 ( 0 )	3 (37.5)	<b>0.001<sup>a</sup></b>
Invasor	12 ( 100)	22 ( 100)	5 (62.5)	
<b>Patrón de distribución</b>				
Alveolar /Organoide	3 (25.1)	8 (36.4)	2 (25.0)	<b>0.024<sup>a</sup></b>
Sólido	1 ( 8.3)	1 ( 4.5)	1 (12.5)	
Paqueteoide	0 ( 0 )	0 ( 0 )	3 (37.5)	
Periteliomatosa	1 ( 8.3)	0 ( 0 )	0 ( 0 )	
Mixto	7 (58.3)	13 (59.1)	2 (25.0)	
<b>Tipo de celularidad</b>				
Epitelioide	0 ( 0 )	2 ( 9.1)	4 (50.0)	<b>0.004<sup>a</sup></b>
Mixto	12 ( 100)	20 (90.9)	4 (50.0)	
<b>Invasión vascular</b>				
Si	12 ( 100)	21 (95.5)	3 (37.5)	<b>0.010<sup>a</sup></b>
No	0 ( 0 )	1 ( 4.5)	5 (62.5)	
<b>Invasión neural</b>				
Si	2 (16.7)	0 ( 0 )	0 ( 0 )	0.072 <sup>a</sup>
No	10 (83.3)	22 ( 100)	8 ( 100)	

MMB= melanoma de mucosa bucal; MMNS= melanoma de mucosa nasosinusal; MMNSB= melanoma demucosa nasosinusal y bucal. <sup>a</sup>Chi-Cuadrada

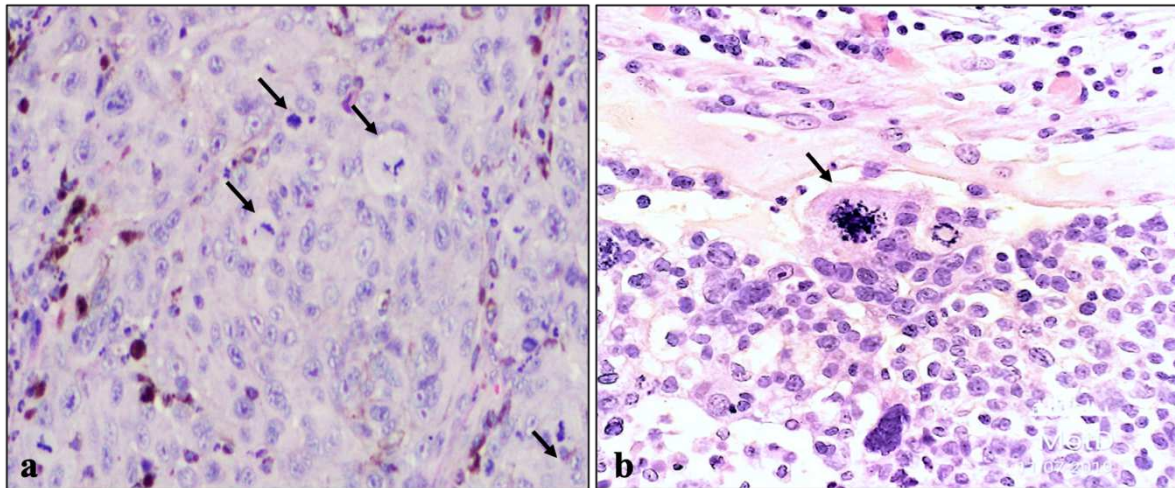
**Cuadro 5.** Características histopatológicas en 42 MMNSB de acuerdo con la proporción de intensidad de inmunexpresión de MITF.

<b>Características</b>	<b>Débil / Moderado</b>		<b>Fuerte</b>		<b>P</b>
	<b>n</b>	<b>(%)</b>	<b>n</b>	<b>(%)</b>	
<b><i>Clasificación WESTOP</i></b>					
<i>In situ</i> (n=3)	0	( 0 )	3	( 100)	<b>0.003<sup>a</sup></b>
Invasor (n=39)	35	(89.7)	4	(10.3)	
<b><i>Patrón de distribución</i></b>					
Alveolar / Organoide (n=13)	13	( 100)	0	( 0 )	<b>0.001<sup>b</sup></b>
Sólido (n=3)	3	( 100)	0	( 0 )	
Pagetoide (n=3)	0	( 0 )	3	( 100)	
Periteliomatoso (n=1)	1	( 100)	0	( 0 )	
Mixto (n=22)	18	(81.8)	4	(18.2)	
<b><i>Tumor por población celular</i></b>					
Monomórfico (n=6)	2	(33.3)	4	(66.7)	<b>0.004<sup>a</sup></b>
Polimórfico (n=36)	33	(91.7)	3	( 8.3)	
<b><i>Melanina</i></b>					
Si (n=37)	30	(81.1)	7	(18.9)	0.569 <sup>a</sup>
No (n=5)	5	( 100)	0	( 0 )	
<b><i>Invasión vascular</i></b>					
Si (n=38)	34	(89.5)	4	(10.5)	<b>0.011<sup>a</sup></b>
No (n=4)	1	(25.0)	3	(75.0)	
<b><i>Mitosis por mm<sup>2</sup> a 40x</i></b>					
>6 (n=15)	13	(86.7)	2	(13.3)	0.559 <sup>a</sup>
>7 (n=21)	20	(95.2)	1	( 4.8)	

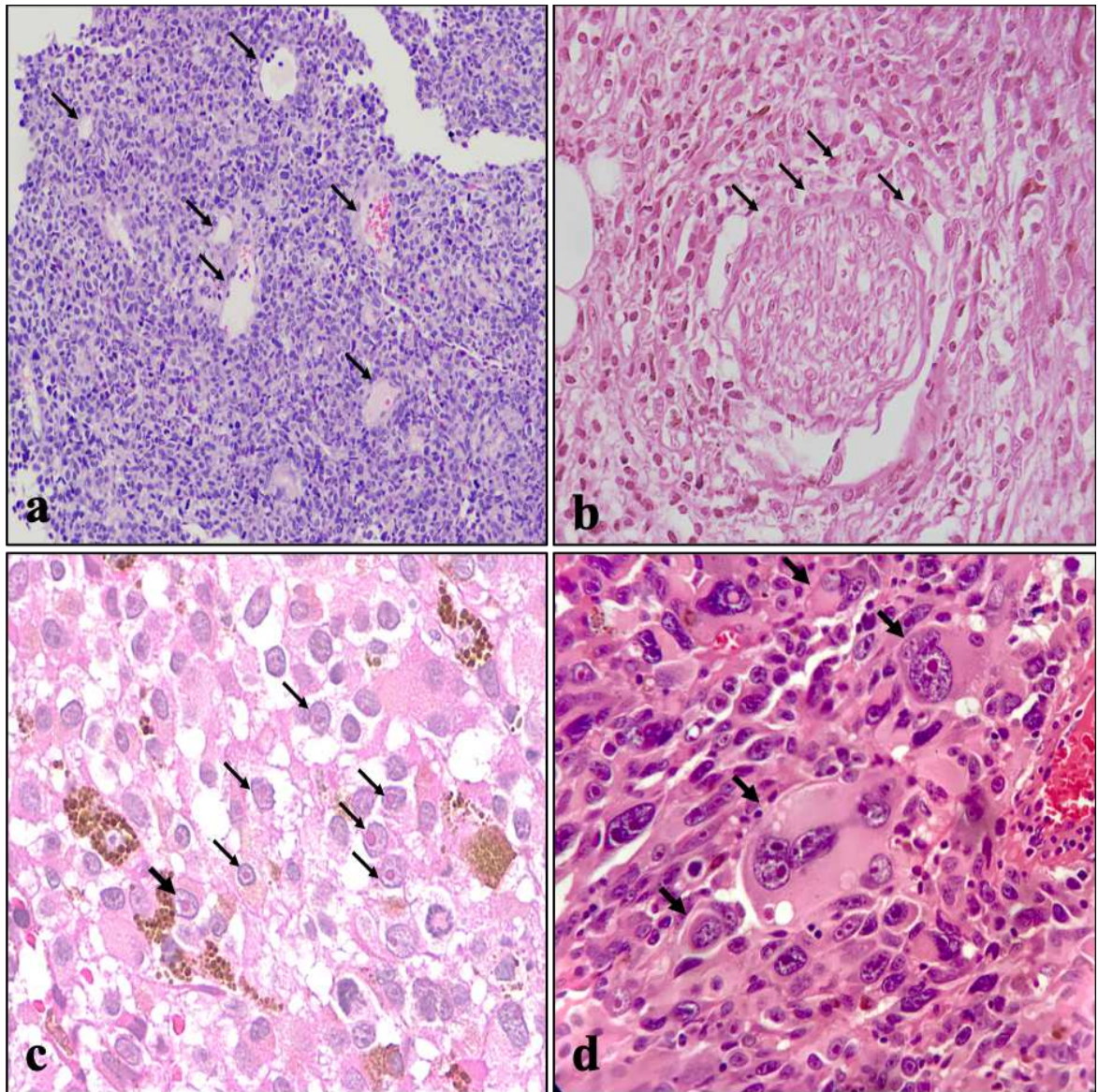
MMB= melanoma de mucosa bucal; MMNS= melanoma de mucosa nasosinusal; MMNSB= melanoma de mucosa nasosinusal y bucal. <sup>a</sup>Prueba exacta de Fisher, <sup>b</sup>Chi-Cuadrada.



**Figura 4. Hallazgos histopatológicos de MMNSB.** a. Diseminación vertical (tumor invasor) en MMB ubicado en paladar duro (H&E, 4X). b. Diseminación horizontal (tumor *in situ*) en MMB ubicado en encía (H&E, 4X). c. Patrón sólido en MMNS. Mantos de células tumorales distribuidas de forma dispersa y sin separaciones (H&E, 10X). d. Células neoplásicas fusiformes distribuidas en patrón sólido en MMB con escasos focos de melanina (H&E, 10X). e. Células neoplásicas claras distribuidas en patrón organoide en MMB (H&E, 10X). f. Distribución alveolar en MMB, en donde se observan células discohesivas de aspecto plasmocitoides delimitadas por septo de tejido conectivo (H&E, 10X).

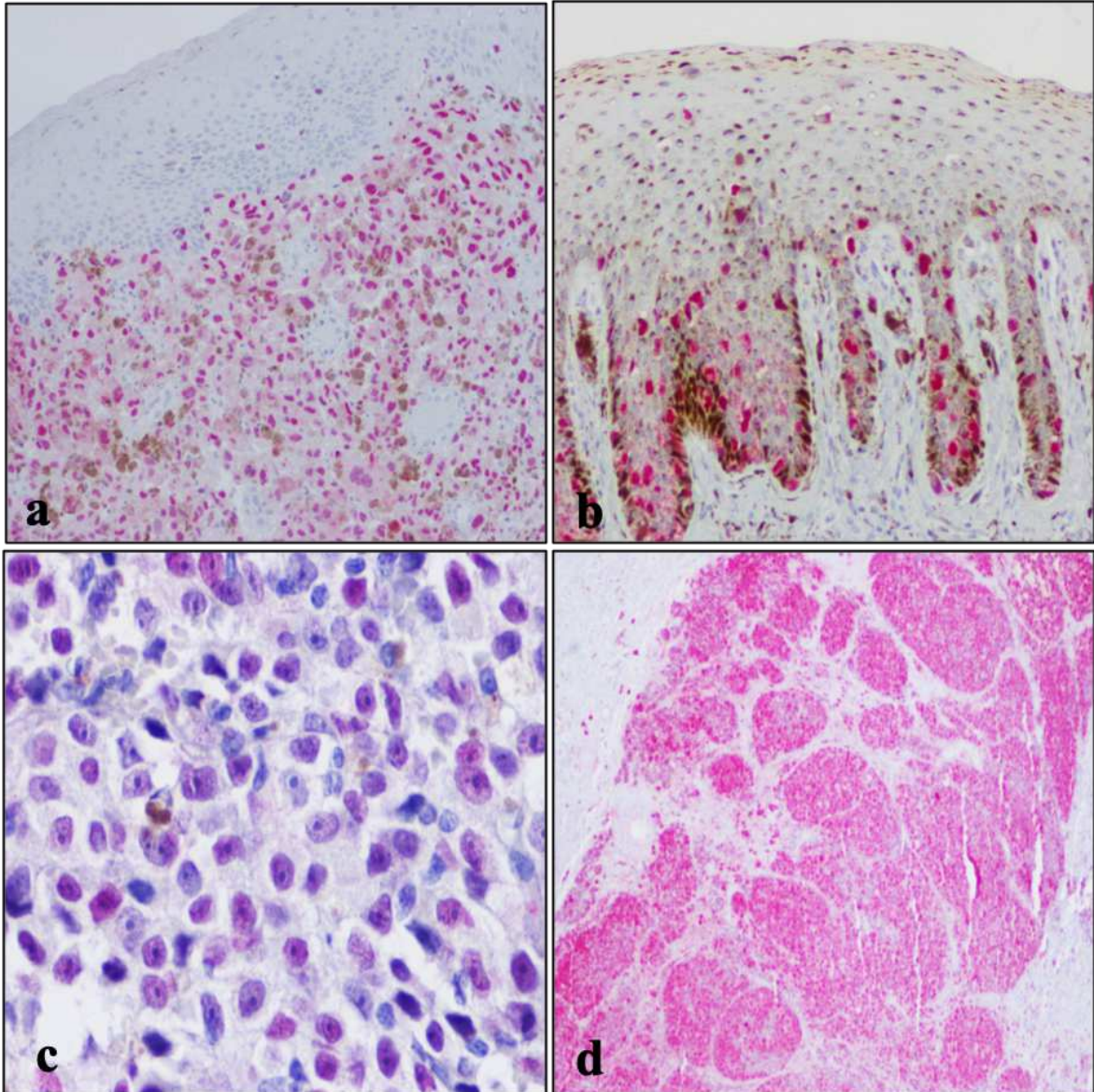


**Figura 5. Hallazgos histopatológicos de MMNSB.** a. Células neoplásicas epitelioides con mitosis aberrantes en melanoma de mucosa nasosinusal (H&E, 10X). b. Mitosis aberrante en melanoma de mucosa bucal (H&E, 40X).

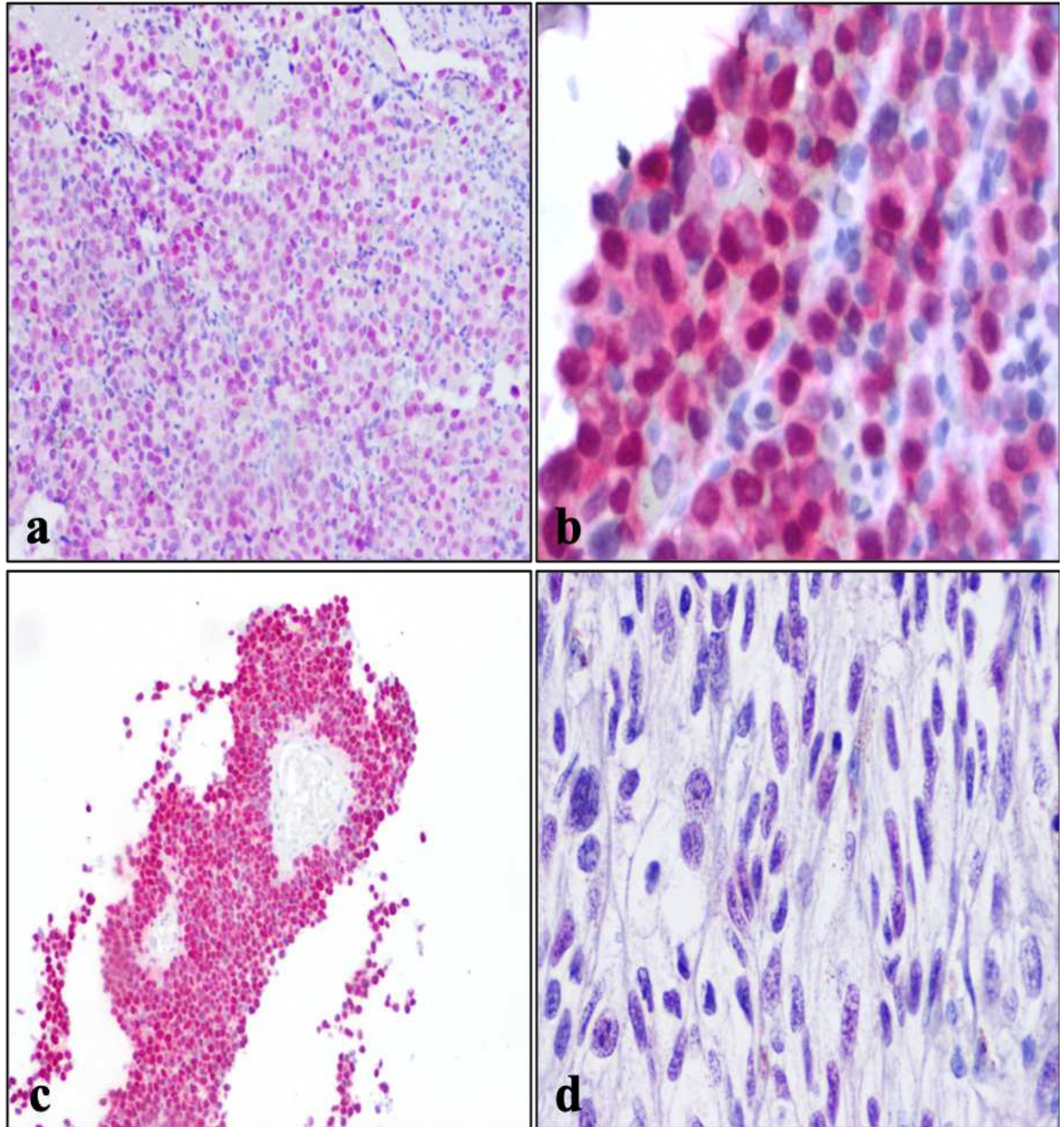


**Figura 6. Hallazgos histopatológicos de MMNSB.** **a.** Células neoplásicas epitelioides con invasión vascular en melanoma de mucosa nasosinusal (flechas) (H&E, 10X). **b.** Células neoplásicas epitelioides con invasión neural en melanoma de mucosa bucal (flechas) (H&E, 40X). **c.** Células neoplásicas con nucléolo eosinófilo prominente en melanoma de mucosa nasosinusal (flechas) (H&E, 40X). **d.** Células neoplásicas gigantes multinucleadas pleomórficas en melanoma de mucosa nasosinusal (flechas) (H&E, 40X).





**Figura 7. Inmunoexpresión de MITF en MMNSB. A.** MMB con diseminación vertical (invasor), células neoplásicas con inmunoexpresión alta (>85%), teñidas nuclearmente (rojo) en células neoplásicas y con gránulos de melanina (café) (Fosfatasa alcalina, 10X). **B.** MMB con crecimiento radial (*in situ*), células neoplásicas con inmunoexpresión alta (>85%) teñidas nuclearmente (rojo) en células neoplásicas y con gránulos de melanina (café) (Fosfatasa alcalina, 10X). **C.** MMNS con inmunoexpresión media (70-85%) teñidas nuclearmente (rojo) en células neoplásicas y con gránulos de melanina (café) (Fosfatasa alcalina, 40X). **D.** MMNS con inmunoexpresión media (70-85%) teñidas nuclearmente (rojo) en células neoplásicas (Fosfatasa alcalina, 4X).



**Figura 8. Inmunexpresión de MITF en MMNSB.** **a.** MMNS con inmunexpresión débil/moderado en núcleos de células neoplásicas de aspecto epitelioide (Fosfatasa alcalina, 10X). **b.** MMNS con inmunexpresión fuerte en núcleos de células neoplásicas de aspecto epitelioide (Fosfatasa alcalina, 40X). **c.** MMNS con inmunexpresión fuerte en núcleos de células epitelioide y plasmocitoide con invasión vascular (Fosfatasa alcalina, 10X). **d.** MMB con inmunexpresión débil-moderado en núcleos de células fusiformes (Fosfatasa alcalina, 40X).

## 6. DISCUSIÓN

El presente estudio es el primero en caracterizar la inmunoexpresión de MITF en melanomas nasosinusales y bucales primarios, encontrando un alto porcentaje positivo a la inmunoreacción, lo cual confirma el uso de MITF como marcador apropiado para identificar el linaje melanocítico; además, permitió observar que las características histopatológicas como la heterogeneidad celular y la invasión tumoral son factores que disminuyen su inmunoexpresión.

Las características clínico-patológicas encontradas, concuerdan con hallazgos descritos previamente en estudios realizados entre pacientes con MMNSB de Francia y Estados Unidos (Dréno y cols., 2017; Gal y cols., 2011). En cuanto a sexo, el MMNS se presenta con más frecuencia en mujeres (76.2%); mientras que los MMB, muestran resultados controversiales, algunos estudios han descrito que el sexo masculino es el más afectado, mientras que otros mencionan que no encuentran diferencias entre sexos (López y cols., 2016; Hsieh y cols., 2013). Los pacientes afectados con MMNSB se diagnostican entre la 5ª y 6ª década de la vida, lo cual concuerda con la mediana de edad encontrada en nuestro estudio (56.5 años) y es similar a lo reportado en trabajos previos (Hsieh y cols., 2015; Gru y cols., 2014; Gavriel y cols., 2011); sin embargo, es interesante comentar que encontramos tres pacientes menores a 40 años (27, 28 y 36 años) diagnosticados con la enfermedad (Feller y cols., 2017; López y cols., 2016; Lourenço y cols., 2014).

De acuerdo con otros estudios (Dréno y cols., 2017; Bhartiya y Prasad, 2015), se ha definido que la fosa y septo nasal, paladar duro y encía insertada son los sitios más afectados en los melanomas de mucosa situados en cabeza y cuello; se sugiere que esto se debe a que durante el desarrollo del eje céfalo-caudal, melanocitos y células de Schwann con capacidad de diferenciarse a células productoras de pigmento, pueden quedar atrapados en la mucosa de esa zona y proliferar, diferenciarse y migrar bajo ciertos estímulos; sin embargo, aún no se esclarece qué es lo que lo induce (Warszawik-Hendzel y cols., 2014; Lourenço y cols., 2013).

Es interesante observar que todos los casos de MMNS mostraron más signos y síntomas que los individuos con MMB, lo cual se reflejó en una proporción significativamente más alta diagnosticada en estadios más tempranos, lo que concuerda con otros autores (Dréno y cols., 2017; Moctezuma y cols., 2016; Michel y cols., 2014; Sarra y cols., 2013). Lo anterior es muy relevante dado que si bien la cavidad bucal es un sitio de fácil exploración y los tumores presentaban hiperpigmentación, éstos son diagnosticados tardíamente.

Aunque una alta proporción de MMB presentaron metástasis, esta fue a ganglios regionales y al momento del diagnóstico, a diferencia de los MMNS, que mostraron metástasis a distancia (pulmón, huesos y cerebro); probablemente debido a su crecimiento infiltrativo, lo que facilita el compromiso de estructuras anatómicas adyacentes, como las celdillas etmoidales y hueso esfenoides. Una vez que estos están afectados, la metástasis en el sistema nervioso central puede ocurrir a través de la fosa craneal anterior, lo que lleva a un pronóstico desfavorable (Amit y cols., 2017; Maldonado-Mendoza y cols., 2015).

La mayoría de los casos en este estudio, al igual que otros (Laurenço y cols., 2014; Prasad y cols., 2004; Prasad y cols., 2003) fueron neoplasias agresivas e infiltrantes, en las que predominaron los tumores polimórficos de celularidad heterogénea y patrón combinado. En nuestros resultados, el MMNS mostró tasas más altas de necrosis y mitosis que los MMB. En este contexto, la mayor tasa de necrosis combinada con la invasión vascular en MMNS podría estar relacionada con la alta red vascular de la mucosa sinonasal, a diferencia del entorno bucal (Ascierto y cols., 2017; Lourenço y cols., 2014). Es importante mencionar que características como el pleomorfismo celular, la necrosis y la afinidad por espacios vasculares, contribuyen a que los MMNSB presenten mal pronóstico, ya que son el primer paso para la metástasis regional y a distancia (Ascierto y cols., 2017; Prasad y cols., 2004).

Un hallazgo relevante del presente estudio fue la elevada inmunoexpresión de MITF, lo cual puede explicarse debido que este marcador es un factor de transcripción crítico para el desarrollo del linaje melanocítico y regula los genes asociados con la diferenciación celular, proliferación y supervivencia del melanocito (Kawakami y Fisher, 2017; Vachtenheim, 2017). Lo anterior sugiere que la alta expresión de MITF en melanomas primarios se asocia con tumores menos agresivos y una disminución del crecimiento de células neoplásicas malignas (Simmons y cols., 2017; Hartman y Czyz, 2015; Wellbrock y Arozarena, 2015).

El melanoma es una neoplasia heterogénea, compuesta por subpoblaciones de células tumorales con fenotipos moleculares y biológicos distintos, además comprenden diferentes tipos de células que varían en su potencial de crecimiento e invasión (Simmons y cols., 2017; Hartman y Czyz, 2015). Recientemente se ha descrito que MITF actúa como un reóstato en el

melanoma, determinando la identidad de las distintas subpoblaciones tumorales. Según este modelo, bajos niveles de MITF dan lugar a células arrestadas en G1, altamente invasivas con propiedades de célula troncal, las cuales, presentan una alta capacidad para iniciar tumores. Por el contrario, niveles elevados de MITF conducen a la activación de genes de diferenciación; mientras que los niveles intermedios de MITF permiten la proliferación de las células de melanoma. En consecuencia, estas neoplasias están conformadas por subpoblaciones celulares con distintos niveles de expresión de MITF (Levy y cols., 2006). Por lo tanto, se ha sugerido que la heterogeneidad celular y la progresión tumoral son factores claves que influyen en la inmunoexpresión y actividad de MITF (Bell y cols., 2014).

La alta inmunoexpresión e intensidad fuerte de MITF entre los tumores *in situ*, en comparación con la expresión débil-moderada entre los casos invasores, podría relacionarse con el papel que desempeña MITF junto con otras proteínas, tales como SNAI2/SLUG y ZEB1, las cuales, trabajan en conjunto para suprimir la función normal de E-cadherina, disminuyendo la adhesión de los melanocitos a los queratinocitos e induciendo la migración de estas células atípicas (Wels y cols., 2011). En este sentido, existen estudios realizados en cultivos de células de melanoma en donde la transición de epitelio-mesénquima y el aumento de la invasión han sido asociados a una baja inmunoexpresión de MITF, mientras que la alta inmunoexpresión se ha vinculado con el incremento en la proliferación de las células neoplásicas (Simmons y cols., 2017; Wellbrock y Arozarena, 2015; Wels y cols., 2011).

La disminución del inmunomarcaje de la proteína MITF en casos con invasión vascular e índice elevado de mitosis, podría asociarse a la progresión tumoral, sugiriendo que la

reducción de la inmunoexpresión se vincula con una menor supervivencia y mayor probabilidad de metástasis (Alaeddini y Etemad-Moghadam, 2015; Agnarsdóttir y cols., 2012; Zhuag y cols., 2007).

Con respecto a la recurrencia en estos tumores, Somasundaram y cols. (2012) sugieren que las terapias de agente único generalmente se dirigen a una subpoblación de células tumorales, mientras que dejan a otras células neoplásicas ilesas. En consecuencia, la recurrencia del tumor puede deberse a la presencia y potencial enriquecimiento de subpoblaciones tumorales que son resistentes a la terapia. Por lo tanto, un enfoque racional para atacar múltiples subpoblaciones de células neoplásicas es la aplicación de múltiples fármacos en lugar de la terapia con un agente único (Quintana y cols., 2010).

Un estudio reciente realizado en México, que incluyó 62 casos de MMNSB primarios (Maldonado-Mendoza y cols., 2019), no encontró la mutación *MITF*<sup>E318K</sup>, dentro del panel analizado, sugiriendo la nula participación de esta modificación en la génesis de los MMNSB. Cabe mencionar que *MITF*<sup>E318K</sup>, se ha relacionado con un mayor riesgo para desarrollar melanomas primarios múltiples (Guo y cols., 2013); sin embargo, la alta inmunoexpresión de la proteína encontrada en el presente estudio podría sugerir su participación durante las etapas iniciales de la progresión del tumor (Goding y cols., 2011), mientras que la amplificación de *MITF* parece ser un evento tardío en la progresión del melanoma, por lo que se relaciona la presencia de mutaciones en este gen principalmente en neoplasias metastásicas (Koludrovic y Davidson, 2013).

Entre las limitaciones del presente trabajo se pueden mencionar al diseño retrolectivo del estudio, en el que el investigador tiene un control limitado en la recolección de las variables. De tal manera que, los datos existentes pueden estar incompletos, ser imprecisos, o haber sido medidos de una manera indeterminada para responder la pregunta de investigación, como la descripción clínica detallada de las lesiones, la información precisa en relación con el consumo de tabaco y alcohol, y la falta de datos con relación al seguimiento y estado actual de los pacientes. De igual manera, es importante mencionar que si bien, el tamaño de la muestra es relativamente pequeño, el presente estudio se realizó en un centro nacional de referencia para el cáncer, durante un período de revisión de diecisiete años, y es el primero en el país en aportar información acerca del papel de la proteína MITF en esta neoplasia.

## **6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

Los resultados del presente estudio permiten concluir que:

- Los melanomas de la región de cabeza y cuello son lesiones agresivas, con una alta frecuencia de metástasis locoregional y a distancia. Específicamente, las neoplasias originadas en la mucosa bucal que son diagnosticadas en etapas más avanzadas de la enfermedad, probablemente por la ausencia de sintomatología que alerte de su presencia.
- La alta inmunoexpresión e intensidad de MITF encontrada en melanomas nasosinusales y bucales primarios, confirma su uso como marcador para identificar el linaje melanocítico.
- La presencia de características histopatológicas como la heterogeneidad celular e invasión tumoral son factores que disminuyen su inmunoexpresión.



El presente estudio puede servir como base para la realización de investigaciones futuras que permitan identificar la inmunoexpresión de la proteína MITF tanto en melanomas recurrentes como en tumores metastásicos presentes en la mucosa nasosinusal y bucal, entre los cuales también sería valioso estudiar las distintas vías de señalización que participan en la activación de la proteína, tales como la vía Wnt/ $\beta$ -catenina o la  $\alpha$ -MSH. Finalmente, los hallazgos descritos en este estudio, son el antecedente de la caracterización en la inmunoexpresión de otras proteínas relacionadas en la patogénesis del MMNSB, como son PTEN y TERT; lo cual, ayudará a comprender un poco más el posible origen y comportamiento biológico del MMNSB.

## 7. REFERENCIAS

- Adisa AO, Olawole WO, Sigbeku OF. Oral amelanotic melanoma. *Ann Ib Postgrad Med* 2012; 10:6-8.
- Agnarsdóttir M, Ponten F, Garmo H, Wagenius G, Mucci L. MITF Expression in cutaneous malignant melanoma. *J Mol Biomark Diagn* 2012; 3:1-7.
- Aguisa-Touré AH y Li G. Genetic alterations of PTEN in human melanoma. *Cell Mol Life Sci* 2012; 9:1475:91.
- Alaeddini M y Etemad-Moghadam S. Immunohistochemical profile of oral mucosal and head and neck cutaneous melanoma. *J Oral Pathol Med* 2015; 44:234-8.
- American Joint Committee on Cancer (2018). The AJCC Cancer Staging Manual. 8ª. Edición. Disponible en: <https://cancerstaging.org> Fecha de consulta: 14 agosto de 2018.
- Amit M, Tam S, Abdelmeguid AS, Roberts DB, Takahashi Y, Raza SM, Su SY, Kupferman ME, DeMonte F, Hanna EY. Mutation status among patients with sinonasal mucosal melanoma and its impact on survival. *Br J Cancer* 2017; 116:1564-1571.
- Arozarena I, Bischof H, Gilby D, Belloni B, Dummer R, Wellbrock C. In melanoma, beta-catenin is a suppressor of invasion. *Oncogene* 2011; 30:4531-43.
- Ascierto P, Accorona R, Botti G, Farina D, Fossati P, Gatta G, Gogas H, Lombardi D, Maroldi R, Nicolai P, Ravanello M, Vanella V. Mucosal melanoma of the head and neck. *Crit Rev Oncol Hematol* 2017; 112:136-152.
- Ballantyne AJ. Malignant melanoma of the skin of the head and neck. An analysis of 405 cases. *Am J Surg* 1970; 120:425-431.
- Bandarchi B, Jabbari CA, Vedadi A, Navab R. Molecular biology of normal melanocytes and melanomas cells. *J Clin Pathol* 2013; 66:644-8.
- Barker BF, Carpenter WM, Daniels TE, Kahn MA, Leider AS, Lozada-Nur F, et al. Oral mucosal melanomas: the WESTOP Banff workshop proceedings. Western Society of Teachers of Oral Pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997; 83:672-79.
- Bell RE, Khaled M, Netanel D. Transcription factor/microRNA axis blocks melanoma invasion program by miR-211 targeting NUA1. *J Invest Dermatol* 2014; 134:441-51.
- Bellester R, de Unamuno B, Botella R. Actualización en melanoma mucoso. *Actas Dermosifiliogr* 2015; 106:96-103.
- Bhartiya R y Prasad KM. Malignant Melanoma of Nasal Cavity – A Case Report. *J Clin Diagn Res* 2015; 9:21-2.
- Bologna SB, Nico MM, Hsieh R, Coutinho-Camilo CM, Buim ME, Fernandes JD, Sangueza M, Soares FA, Lourenço SV. Adhesion molecules in primary oral mucosal melanoma: study of claudins, integrins and immunoglobulins in a series of 35 cases. *Am J Dermatopathol* 2013; 35:541-54.
- Breslow A. Tumor thickness, level of invasion and node dissection in stage I cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1975; 182:572-575.

- Clark WH Jr, Chraybi M, Abd Alsamad I, Copie-Bergman C, Baia M, André J, Dumaz N, Ortonne N, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 1969; 29: 705-27.
- College of American Pathologists (2017). Protocol for the Examination of Specimens from Patients with Melanoma of the Skin. Disponible en <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates> Fecha de consulta: 4 de agosto del 2019.
- Davis EJ, Johnson DB, Sosman JA, Chandra S. Melanoma: What do all the mutations mean? *Cancer* 2018; 0:1-10.
- de Andrade BA, Leon JE, Carlos R, Delgado-Azañero W, Mosqueda-Taylor A, de Almeida OP. Immunohistochemical expression of p16, p21, p27 and cyclin D1 in oral nevi and melanoma. *Head Neck Pathol* 2012; 6:297-304.
- de Andrade BA, León JE, Carlos R, Delgado-Azañero W, Mosqueda-Taylor A, de Almeida OP. Expression of minichromosome maintenance 2, Ki-67, and geminin in oral nevi and melanoma. *Ann Diagn Pathol* 2013; 17:32-6.
- de Andrade BA, León JE, Carlos R, Delgado-Azañero W, Mosqueda-Taylor A, Graner E, de Almeida OP. Expression of fatty acid synthase (FASN) in oral nevi and melanoma. *Oral Dis* 2011; 17:808-12.
- de Andrade BA, Piña AR, León JE, Paes de Almeida O, Altemani A. Primary nasal mucosal melanoma in Brazil: clinicopathologic and immunohistochemical study of 12 patients. *Ann Diagn Pathol* 2012; 16:344-9.
- de Andrade BA, Toral-Rizo VH, León JE, Contreras E, Carlos R, Delgado-Azañero W, Mosqueda-Taylor A, de Almeida OP. Primary oral melanoma: a histopathological and immunohistochemical study of 22 cases of Latin America. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17:383-8.
- de Souza J, Mosqueda-Taylor A, de Almeida O, de Andrade B. Primary oral melanoma: a case report with immunohistochemical findings. *J Clin Exp Pathol* 2014; 4:1-3.
- Deinlein T, Wolf IH, Rainer B, Kupsa R, Richtig E, Hofmann-Wellenhof R, et al. Treatment of Primary and Metastatic Multifocal Mucosal Melanoma of the Oral Cavity with imatinib. *Case Rep Oncol* 2017; 10: 558-563.
- Delmas V, Beermann F, Martinozzi S. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev* 2007; 21:2923–35.
- Dréno M, Georges M, Espitalier F, Ferron C, Charnolé A, Dréno B, Malard O. Sinonasal mucosal melanoma: A 44-case study and literature analysis. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2017; 134:237-242.
- Feller L, Khammissa R, Lemmer J. A review of the aetiopathogenesis and clinical and histopathological features of oral mucosal melanoma. *The Scientific World Journal* 2017; 2017:1-7.

- Feller L, Masilana A, Khammissa RA, Altini M, Jadwat Y, Lemmer J. Melanin: the biophysiology of oral melanocytes and physiological oral pigmentation. *Head Face Med* 2014; 10:1-7.
- Gal TJ, Silver N, Huang B. Demographics and treatment trends in sinonasal mucosal melanoma. *Laryngoscope* 2011; 121:2026-33.
- Gavriel H, McArthur G, Sizeland A, Henderson M. Review: mucosal melanoma of the head and neck. *Melanoma Res* 2011; 4:257-66.
- Goding CR. A picture of Mitf in melanoma immortality. *Oncogene* 2011; 30:2304-2306.
- Gru AA, Becker N, Dehner LP, Pfeifer JD. Mucosal melanoma: correlation of clinicopathologic, prognostic, and molecular features. *Melanoma Res* 2014; 24:360-70.
- Guo R, Franco-Palacios M, Russell M, Goddard L, Hassell L, Gillies E, Fung KM. Microphthalmia transcription factor (MITF) as a diagnostic marker for metastatic melanomas negative for other melanoma markers. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6:1658-64.
- Haq R y Fisher DE. Biology and clinical relevance of the microphthalmia family of transcription factors in human cancer. *J Clin Oncol* 2011; 29:3474-82.
- Hartman ML y Czyz M. MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72:1249-60.
- Hartman ML y Czyz M. Pro-survival role of MITF in melanoma. *J Invest Dermatol* 2015; 135:352-58.
- Hocker TL, Singh MK, Tsao H. Melanoma Genetics and Therapeutic Approaches in the 21st Century: Moving from the Benchside to the Bedside. *J Investig Dermatol* 2008; 128:2575-95.
- Hoek KS y Goding CR. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2010; 23:746-59.
- Hou L, Pavan WJ. Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell derived melanocyte development: do all roads lead to MITF?. *Cell Res* 2008; 18:1163-76.
- Hsiao JJ y Fisher DE. The roles of microphthalmia-associated transcription factor and pigmentation in melanoma. *Arch Biochem Biophys* 2014; 563:28-34.
- Hsieh R, Maracello N, Camilo-Countinho C, Juliana F, Lopes C, Silvia L. Primary oral mucosal melanoma: a short review. *Pigmentary Disorders* 2016; 2:1-3.
- Hsieh R, Nico MM, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Sanguenza M, Lourenço SV. The CDKN2A and MAP kinase pathways: molecular roads to primary oral mucosal melanoma. *Am J Dermatopathol* 2013; 35:167-75.
- Kawakami A y Fisher DE. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Lab Invest* 2017; 6:649-656.
- Koivunen P, Back L, Pukkila M, Laranne J, Kinnunen I, Grénman R, Mäkitie AA. Accuracy of the current TNM classification in predicting survival in patients with sinonasal mucosal melanoma. *Laryngoscope* 2012; 122:1734-8.

- Koludrovic D y Davidson I. MITF, the Janus transcription factor of melanoma. *Future Oncol* 2013; 9:235-44.
- Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 2006; 9:406-14.
- López F, Rodrigo J, Cardesa A, Triantafyllou A, Devaney K, Mendenhall W, Haigentz M, Strojan P. Update on primary head and neck mucosal melanoma. *Head Neck* 2016; 38:147-155.
- López-Graniel CM, Ochoa-Carrillo EJ, Meneses-García A. Malignant melanoma of the oral cavity: diagnosis and treatment experience in a Mexican population. *Oral Oncol* 1999; 35:425-430.
- Lourenço SV, Bologna SB, Hsieh R, Sanguenza M, Fernandes JD, Nico MM. Establishment and characterization of an oral mucosal melanoma cell line (MEMO) derived from a longstanding primary oral melanoma. *Am J Dermatopathol* 2013; 35:248-51.
- Lourenço SV, Fernandes JD, Hsieh R, Coutinho-Camillo CM, Bologna S, Sanguenza M, Nico MM. Head and neck mucosal melanoma: a review. *Am J Dermatopathol* 2014; 36:578-87.
- Luna-Ortiz K, Aguilar-Romero M, Villavicencio-Valencia V, Zepeda-Castilla E, Vidrio-Morgado H, Peteuil N, Mosqueda-Taylor A. Comparative study between two different staging systems (AJCC TNM VS BALLANTYNE'S) for mucosal melanomas of the Head & Neck. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2016; 21: e425-430.
- Maldonado-Mendoza J, Ramírez-Amador V, Anaya-Saavedra G y cols. CD117 immunoexpression in oral and sinonasal mucosal melanoma does not correlate with somatic driver mutations in the MAPK pathway. *J Oral Pathol Med* 2019; 48:382-88.
- Maldonado-Mendoza J, Ramírez-Amador V, Anaya-Saavedra G, Irigoyen ME, Ruíz-García E, Meneses-García E. Clinicopathological characterization of primary oral and sinonasal melanoma in a referral centre in Mexico City: 2000-2012. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg* 2015; 44:427-32.
- Mellouli N, Sioud S, Garma M, Chokri A, Hamdi H, Selmi J. Oral malignant melanoma: History of malignant degeneration of a pigmented lesion. *J Oral Med Oral Surg* 2019; 25:1-7.
- Michel J, Perret-Court A, Fakhry N, Braustein D, Monesteir S, Richard MA, Grob JJ, Giovanni A, Dessi P. Sinonasal mucosal melanomas: the prognostic value of tumor classifications. *Head Neck* 2014; 36:311-6.
- Mihajlovic M, Vlajkovic S, Jovanovic P, Stefnovic V. Primary mucosal melanomas: A comprehensive review. *Int J Clin Exp Pathol* 2012; 5:739-753.
- Mikkelsen LH, Larsen AC, von Buchwald C, Drzewiecki KT, Prause JU, Heegaard S. Mucosal malignant melanoma - a clinical, oncological, pathological and genetic survey. *APMIS* 2016; 124:475-86.

- Mochel MC, Duncan LM, Piris A, Kraft S. Primary mucosal melanoma of the sinonasal tract: a clinicopathologic and immunohistochemical study of thirty-two cases. *Head Neck Pathol* 2015; 9:263-43.
- Moctezuma-Bravo GS, de León-Medina RD, Rodríguez-Quilantán FJ, Salgado-Nevárez MS, Moctezuma-Dávila M. Melanoma Nasomaxilar: revisión de la literatura y reporte de un caso. *Gaceta mexicana de oncología* 2016; 153:181-86.
- Mohan M, Sukhadia VY, Pai D, Bhat S. Oral malignant melanoma: systematic review of literature and report of two cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013; 1164:247-54.
- Naffouje S, Naffouje R, Bhagwandin S, Salti GI. Microphthalmia transcription factor in malignant melanoma predicts occult sentinel lymph node metastases and survival. *Melanoma Res* 2015; 25:496-502.
- Narasimham K, Kucuk O, Lin HS, Heilbrun LK, Carron M, Venkatramanamoorthy R, Mathog R. Sinonasal mucosal melanoma: a 13-year experience at a single institution. *Skull Base* 2009; 194:255-62.
- Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol* 2008; 35:433-444.
- Palmieri G, Capone M, Ascierto ML, Gentilcore G, Stroncek DF, Casula M, Sini MC, Palla M, Mozzillo N, Ascierto PA. Main roads to melanoma. *J Transl Med* 2009; 7:86-93.
- Paulo LF, Servato JP, Rosa RR, Oliveira MT, Faria PR, Silva SJ, Cardoso SV, Loyola AM. Primary amelanotic mucosal melanoma of the oronasal region: report of two new cases and literature review. *Oral Maxillofac Surg* 2015; 194:333-9.
- Pingarrón L, González J, Ma CY, Yu ZW, Zhang CP. Melanoma de mucosa intraoral: ¿enfermedad local o sistémica?. *Rev Esp Cir Oral Maxilofac* 2014; 361:15-20.
- Ploper D y De Robertis EM. The MITF family transcription factors: Role in endolysosomal biogenesis, Wnt signaling and oncogenesis. *Pharmacol Res* 2015; 19: 36-43.
- Prasad ML, Busam KJ, Patel SG, Hoshaw-Woodard S, Shah JP, Huvos AG. Clinicopathologic differences in malignant melanoma arising in oral squamous and sinonasal respiratory mucosa of the upper aerodigestive tract. *Arch Pathol Lab Med* 2003; 127:997-1002.
- Prasad ML, Patel SG, Busam KJ. Primary mucosal desmoplastic melanoma of the head and neck. *Head Neck* 2004; 26:373-7.
- Prasad ML, Patel SG, Huvos AG, Shah JP, Busam KJ. Primary mucosal melanoma of the head and neck: a proposal for microstaging localized, Stage I (lymph node-negative) tumors. *Cancer* 2004; 1008:1657-64.
- Prasad ML, Patel SG, Shah JP, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ. Prognostic significance of regulators of cell cycle and apoptosis, p16(INK4a), p53, and bcl-2 in primary mucosal melanomas of the head and neck. *Head Neck Pathol* 2012; 62:184-90.

- Quintana E, Shackleton M, Foster HR. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell* 2010; 18:510–23.
- RARECAREnet (2017). Information Network on Rare Cancers, Disponible en: [www.rarecarennet.eu/rarecarennet/](http://www.rarecarennet.eu/rarecarennet/). Fecha de consulta: 10 de abril del 2018.
- Reséndiz-Colosía JA, Valenzuela-Flores AG, Gallegos-Hernández FJ, Flores-Díaz R, Barroso-Bravo S, Rodríguez-Cuevas SA. Primary melanoma of the oral mucosa. Experience of the Oncology Hospital of Centro Medico Nacional Siglo XXI. *Cir Cir* 2007; 75:257-262.
- Ruiz-Godoy LM, Mohar-Betancourt A, Ochoa-Carrillo F, Beltrán-Ortega A, Meneses-García A. Melanoma de Mucosa de Cabeza y Cuello; Experiencia en el Instituto Nacional de Cancerología. *Patología* 1992; 30:157-161.
- Salti GI, Manougian T, Farolan M, Shilkaitis A, Majumdar D, DAS GUPTA TK. Microphthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res* 2000; 60: 5012–6.
- Sarra L, Rodríguez JC, García-Valea M, Arédez-Ferrer A, Vino A, Guassardo B. Melanoma mucoso de tabique nasal. *Rev Esp Cir Oral Maxilofac* 2013; 354:167-69.
- Schadendorf D, Fisher, DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, Roesch, A. Melanoma. *Nat Rev Dis Primers* 2015; 231:1-17.
- Shain AH y Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 2016; 16:345-58.
- Shtivelman E, Davies MQ, Hwu P, Yang K, Lotem M, Oren M, Flaherty KT, Fisher DE. Pathways and therapeutic targets in melanoma. *Oncotarget* 2014; 57:1701-52.
- Simmons JL, Pierce CJ, Al-Ejeh F, Boyle GM. MITF and BRN2 contribute to metastatic growth after dissemination of melanoma. *Sci Rep* 2017; 7:1-10.
- Somasundaram R, Villanueva J, Herlyn M. Intratumoral heterogeneity as a therapy resistance mechanism: role of melanoma subpopulations. *Adv Pharmacol* 2012; 65:335.59.
- Tacastacas JD, Bray J, Cohem YK, Arbesman J, Kim J, Koon HB, Honda K, Cooper KD, Gerstenblith MR. Update on primary mucosal melanoma. *J Am Acad Dermatol* 2014; 712:366-75.
- Tanaka N, Amagasa T, Iwaki H, Shioda S, Takeda M, Ohashi K, Reck SF. Oral malignant melanoma in Japan. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 1: 81-90.
- Tlholoe MM, Khammissa RA, Bouckaert M, Altini M, Lemmer J, Feller L. Oral mucosal melanoma: some pathobiological considerations and an illustrative report of a case. *Head Neck Pathol* 2015; 91:127-34.
- Tyrrell H y Payne M. Combatting mucosal melanoma: recent advances and future perspectives. *Melanoma Manag* 2018; 5:1-11.
- Vachtenheim J. The Many Roles of MITF in Melanoma. *Single Cell Biol* 2017; 6:1-4.

- Warszawik-Hendzel O, Stowinska M, Okszevska M, Rudnicka L. Melanoma of the oral cavity: pathogenesis, dermoscopy, clinical features, staging and management. *J Dermatol Care Rep* 2014; 83:60-66.
- Weber CO. Surgical Experience and Research, in Addition to Interesting Observations from the Surgical Clinic and the Protestant Hospital Bonn. Berlin, Germany. *G. Reimer* 1859; 304-305.
- Wellbrock C y Arozarena I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res* 2015; 4:390-406.
- Wels C, Joshi S, Koefinger P, Bergler H, Schaidler H. Transcriptional activation of ZEB1 by Slug leads to cooperative regulation of the epithelial- mesenchymal transition-like phenotype in melanoma. *J Invest Dermatol* 2011; 131:1877-1885.
- Williams MD, Franchi A, Helliwell T, Müller S, Thompson LDR. Data Set for the Reporting of Mucosal Melanomas of the Head and Neck: Explanations and Recommendations of the Guidelines from the International Collaboration on Cancer Reporting. *Arch Pathol Lab Med* 2019; 5:603-609.
- Wu Y, Zhong Y, Li C, Song H, Guo W, Ren G. Neck dissection for oral mucosal melanoma: caution of nodular lesion. *Oral Oncol* 2014; 504:319-24.
- Yu CH, Chem HH, Liu CM, Jeng YM, Wang JT, Wang YP, Liu BY, Sun A, Chiang CP. HMB-45 may be a more sensitive maker than S-100 or Melan-A for immunohistochemical diagnosis of primary oral and nasal mucosal melanomas. *J Oral Pathol Med* 2005; 34:540-5.
- Zhuag L, Lee CS, Scolyer RA. Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. *Mod Pathol* 2007; 20:416–26.



# ANEXOS



Datos demográficos				Fecha: / /
ID:	Nombre:	Edad:	Sexo: ( )	Edo. de Origen:
Ocupación: ( )	<b>Consumo de tabaco:</b> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Ex <input type="checkbox"/> Si: E. inicio: ___ U/día: ___ U/semana: ___ U/mes: ___ U/año: ___ Total: ___ Ex: E. inicio: ___ E. Interrupción ___ U/día: ___ U/semana: ___ U/año: ___ Total: ___			
Contacto con carcinógenos: ( ) Especifique:	<b>Consumo de alcohol:</b> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Ex <input type="checkbox"/> <small>(<sup>1</sup>Cerveza y pulque 330 ml; <sup>2</sup>vino 125 ml; <sup>3</sup>tequila, ron, licor, mezcal, whisky, vodka, brandy 30 ml)</small> Si: E. inicio: ___ U/día: ___ U/semana: ___ U/mes: ___ U/año: ___ Total: ___ Ex: E. inicio: ___ E. Interrupción ___ U/día: ___ U/semana: ___ U/año: ___ Total: ___			

Características clínicas			
Tiempo de evolución: __ meses	Tamaño: ___ cm.	Color: ( )	Localización: Cavidad bucal: ( ) Extensión: Cavidad Nasal: ( ) Extensión:
Presencia de ganglios palpables: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sin dato <input type="checkbox"/>	Recurrencia: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sin dato <input type="checkbox"/>	Metástasis: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sin dato <input type="checkbox"/>	
Estadio: III <input type="checkbox"/> IVA <input type="checkbox"/> IVB <input type="checkbox"/> IVC <input type="checkbox"/>	Sintomatología: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sin dato <input type="checkbox"/> Especifique:	Tratamiento: Rt <input type="checkbox"/> Qt <input type="checkbox"/> Cx <input type="checkbox"/>	
Fecha diagnóstico INCAN:	Estado del paciente: Vivo con enfermedad <input type="checkbox"/> Vivo sin enfermedad <input type="checkbox"/> Fallecido <input type="checkbox"/> Sin datos <input type="checkbox"/>	Fecha de defunción:	
Fecha última consulta:			

Características histopatológicas	
Clasificación WESTOP: <i>In situ</i> <input type="checkbox"/> Invasor <input type="checkbox"/>	Patrón de crecimiento: Horizontal <input type="checkbox"/> Vertical <input type="checkbox"/>
<b>Patrón de distribución:</b> Alveolar / Organoide <input type="checkbox"/> Sólido <input type="checkbox"/> Pagetoide <input type="checkbox"/> Periteliomatoso <input type="checkbox"/> Mixto <input type="checkbox"/> <b>Tipo de celularidad:</b> Fusiforme <input type="checkbox"/> Epiteloide <input type="checkbox"/> Plasmocitoide <input type="checkbox"/> Claras <input type="checkbox"/> Pleomórficas <input type="checkbox"/> Mixto <input type="checkbox"/> Otros:	
<b>Presencia de melanin</b> <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> <b>Invasión neural:</b> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> <b>Invasión vascular:</b> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> <b>Infiltrado inflamatorio:</b> Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Tipo: ( ) Cantidad ( ) Distribución ( ) <b>Necrosis:</b> No <input type="checkbox"/> ≤ 25-50% <input type="checkbox"/> 51-75% <input type="checkbox"/> >75% <input type="checkbox"/> <b>Mitosis por campo mm<sup>2</sup>:</b> Ninguna <input type="checkbox"/> ≤6 <input type="checkbox"/> >10 <input type="checkbox"/>	

Expresión inmunohistoquímica	
MITF	
Número de células:	
Número de células positivas:	
Porcentaje de células positivas:	
Sitio de marcaje: Núcleo <input type="checkbox"/>	
Intensidad de expresión: Negativa <input type="checkbox"/> Débil <input type="checkbox"/> Mod. <input type="checkbox"/> Fuerte <input type="checkbox"/>	

**ANEXO II. Criterios para etapificación clínica de Melanomas de mucosa nasosinusal y bucal considerados en el estudio.**

<b>Clasificación TNM del melanoma mucoso de cabeza y cuello (American Joint Committee on Cancer, 2018)</b>
<b><i>Tumor primario (T)</i></b>
T3: enfermedad mucosa T4a: enfermedad moderada avanzada; tumor que afecta a tejidos blandos profundos, cartílago, hueso o piel subyacente T4b: enfermedad muy avanzada; tumor que afecta al cerebro, duramadre, pares craneales bajos (IX, X, XI, XII), espacio masticador, arteria carótida, espacio prevertebral o estructuras mediastinales
<b><i>Ganglios regionales (N)</i></b>
NX: ganglios linfáticos no evaluables N0: sin metástasis en ganglios linfáticos regionales N1: metástasis en ganglios linfáticos regionales
<b><i>Metástasis a distancia (M)</i></b>
M0: sin metástasis a distancia M1: metástasis a distancia

<b>Estadificación Clínica del cáncer de la AJCC (American Joint Committee on Cancer, 2018)</b>			
<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<i>III</i>	T3	N0	M0
<i>IVA</i>	T4a T3- T4a	N0 N1	M0 M0
<i>IVB</i>	T4b	Cualquier N	M0
<i>IVC</i>	Cualquier T	Cualquier N	M1

**ANEXO III.** Criterios histopatológicos de Melanomas de mucosas nasosinusal y bucal considerados en el estudio.

<b>Western Society of teachers of Oral Pathology (WESTOP) de 1995 (Barker y cols., 1997).</b>	
<i>Melanoma in situ</i>	Aquel en el que se observa proliferación melanocítica limitada al epitelio y la interfase de epitelio-tejido conectivo; los cuales deben presentar suficiente y uniforme atíпия.
<i>Melanoma invasor</i>	Melanoma que muestra patrón de crecimiento vertical, en el que la neoplasia se ubica en tejido conectivo profundo.
<i>Melanoma combinado (in situ e invasor)</i>	Melanoma que presenta un patrón combinado de tipo invasivo y del componente <i>in situ</i> .
<i>Hiperplasia melanocítica atípica</i>	También conocida como proliferación melanocítica atípica, es un término aceptado para designar lesiones con características histopatológicas que no son propias de una lesión benigna, como puede ser la presencia de melanocitos con núcleos angulados e hipercromáticos, escasas mitosis o pleomórficos. Ésta es considerada una lesión melanocítica premaligna.
<b>Adecuación a criterios de WESTOP</b>	
<i>Melanoma in situ</i>	Aquel en el que observamos proliferación melanocítica limitada al epitelio y la interfase de epitelio-tejido conectivo; la cual presenta atípica suficiente y uniforme.
<i>Melanoma invasor</i>	Melanoma que muestra infiltración de la membrana basal, patrón de crecimiento vertical, con más de 10 células neoplásicas en lámina propia superficial y/o presencia de la neoplasia en tejido conectivo profundo.
<b>Patrón de crecimiento</b>	
<i>Horizontal /Radial</i>	Crecimiento en fase radial con diseminación lateral y superficial, es decir, paralelo a la membrana basal.
<i>Vertical</i>	Crecimiento infiltrante al tejido conectivo subyacente.
<b>Patrón de distribución</b>	
<i>Alveolar/Organoide</i>	Alveolar: Nidos celulares redondeados rodeados por estroma vascularizado. Existe pérdida de cohesión de las células en el centro de los agregados. Organoide: Nidos celulares de tamaño variable delimitados por

	septos de tejido conectivo. Las células que se localizan en el centro de los nidos son densas y compactas.
<i>Sólido</i>	Mantos o masas de células neoplásicas con múltiples formas, distribuidas de manera cohesiva sin separaciones.
<i>Pagetoide</i>	Distribución caótica de células tumorales epitelioides individuales y en pequeños nidos en el epitelio distribuidos de forma dispersa.
<i>Periteliomatoso</i>	Presencia de células tumorales redondas u ovals, agrupadas alrededor de espacios vasculares en forma de pequeños cordones.
<i>Mixto</i>	Presencia de 2 o más patrones de distribución celular.
<i>Otros</i>	Presencia de cualquier otro patrón de distribución que no sea contemplado entre los más comunes, antes mencionados.

### **Características citológicas**

<i>Fusiforme</i>	Células alargadas o ahusadas; con núcleo central, oval o ahusado y basófilo; de membrana celular no bien definida. Las cuales pueden formar estructuras fasciculares que se entrecruzan.
<i>Epiteliode</i>	Células poligonales de citoplasma amplio eosinófilo, núcleo redondo central y bordes definidos.
<i>Plasmocitoide</i>	Células redondas u ovals, citoplasma escaso, núcleo redondo y excéntrico y bordes definidos.
<i>Células claras</i>	Células redondas, ovals o poligonales con citoplasma amplio y claro; núcleo central, redondo y pequeño y membrana celular bien definida.
<i>Pleomórficas</i>	Variabilidad en tamaño y forma de las células y/o sus núcleos.
<i>Otros</i>	Células indiferenciadas de forma redonda pequeña y azul, así como células gigantes multinucleadas

### **Presencia de melanina**

<i>Melanótico</i>	Presencia de células atípicas distribuidas en nódulos o nidos en cuyo interior observan acúmulos de gránulos no refringentes pequeños distribuidos al azar.
<i>Amelanótico</i>	Lesión compuesta por células atípicas distribuidas en nódulos o nidos donde la melanina está ausente o es muy escasa.

### **Presencia de necrosis**

Se evalúo según la proporción de tejido en toda la laminilla que presente daño celular caracterizado por la incapacidad de mantener la integridad de la membrana plasmática, ausencia de elementos citoplasmáticos, aumento de la eosinofilia y apariencia homogénea en ella, rompiendo en su núcleo (cariolisis), reducción en su tamaño (picnosis) o fragmentación de éste (cariorrhexis); según cuatro categorías: *ausente*,  $\leq 25-50\%$ ,  $51-75\%$  y  $75\%$ .

**Número de mitosis por mm<sup>2</sup> (40x) CAP  
(Cancer Protocol Skin Melanoma, 2017)**

Se encontró el sitio con más mitosis atípicas (“hot spot”) bajo el objetivo de 40x, luego se inició el recuento de mitosis extendiéndose a 6 campos adyacentes, no superpuestos. Si no se encontró el sitio “hot spot” y/o las mitosis son escasas y/o están dispuestas al azar por todo el tumor, se comenzó el recuento a partir de una mitosis atípica representativa. En los tumores *in situ* no se realizó conteo de mitosis atípicas.

**Presencia de invasión vascular y neural**

<i>Vascular</i>	Presencia de células tumorales en lumen vascular, unido a la pared o cubierto por endotelio.
<i>Neural</i>	Presencia de células tumorales dentro de fibras nerviosas.

ANEXO IV. Operacionalización de las variables.

Definición operacional de variables			
<b>Variable</b>	<b>Tipo</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Operacionalización</b>
<i>Dependiente</i>			
<b>Diagnóstico</b>	Cualitativa	Nominal	Melanoma nasosisunal y bucal
<i>Independientes</i>			
<b>Edad</b>	Cuantitativa	Continua	Años cumplidos
<b>Sexo</b>	Cualitativa	Dicotómica	Hombre, mujer
<b>Localización</b>	Cualitativa	Nominal	Encía, paladar, mucosa yugal, tabique nasal, cornetes y fosas nasales
<b>Tiempo de evolución</b>	Cuantitativa	Continua	Meses
<b>Tamaño</b>	Cuantitativa	Continua	Centímetros
<b>Color</b>	Cualitativa	Dicotómica	Melánico, amelánico
<b>Ganglios palpables</b>	Cualitativa	Nominal	Si, no, sin dato
<b>Recurrencia</b>	Cualitativa	Nominal	Si, no, sin dato
<b>Metástasis</b>	Cualitativa	Nominal	Si, no, sin dato
<b>Estadio</b>	Cualitativa	Ordinal	III, IVA, IVB, IVC
<b>Sintomatología</b>	Cualitativa	Nominal	Si, no, sin dato
<b>Tratamiento</b>	Cualitativa	Nominal	Radioterapia, quimioterapia, cirugía
<b>Estado del paciente</b>	Cualitativa	Nominal	Vivo con enfermedad, vivo sin enfermedad, fallecido, sin datos
<b>Clasificación WESTOP</b>	Cualitativa	Dicotómica	<i>In situ</i> , invasor
<b>Patrón de crecimiento</b>	Cualitativa	Dicotómica	Horizontal, vertical
<b>Patrón de distribución</b>	Cualitativa	Nominal	Alveolar/organoide, sólido, pagetoide, periteliomatosa, otros
<b>Tipo de celularidad</b>	Cualitativa	Nominal	Fusiforme, epiteloide, plasmocitoide, claras, pleomórficas, otros
<b>Melanina</b>	Cualitativa	Dicotómica	Presencia, ausencia

<b>Invasión neural</b>	Cualitativa	Dicotómica	Presencia, ausencia
<b>Invasión vascular</b>	Cualitativa	Dicotómica	Presencia, ausencia
<b>Infiltrado inflamatorio</b>	Cualitativa	Dicotómica	Presencia, ausencia
<b>Tipo de infiltrado inflamatorio</b>	Cualitativa	Nóminal	Crónico, agudo, mixto
<b>Cantidad de infiltrado inflamatorio</b>	Cualitativa	Nóminal	Leve, moderado e intenso
<b>Distribución de infiltrado inflamatorio</b>	Cualitativa	Dicótómica	Focal, disperso
<b>Necrosis</b>	Cualitativa	Ordinal	No, ≤25-50%, 51-75%, >75%
<b>Mitosis por mm<sup>2</sup> (40x)</b>	Cualitativa	Ordinal	N/A, <6, >7
<b>Anticuerpos: MITF</b>			
<b>Immunoexpresión</b>	Cualitativa	Dicotómica	Presencia y ausencia
	Cualitativa	Ordinal	<70, 75-85, >85%
	Cuantitativa	Continua	Porcentaje
<b>Intensidad</b>	Cualitativa	Ordinal	Negativa, débil/moderada y fuerte