



Estudio de patrones de expresión por inmunohistoquímica de la proteína supresora tumoral bap1 en melanoma cutáneo y su relación con parámetros clínico-patológicos e índice de proliferación celular

Marco Mario Mazzotta.

Tesis (Dr. en Medicina y Cirugía)--Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Médicas, 2021.

Aprobada: 14 de marzo de 2022

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>

Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

Esta obra se encuentra protegida por una Licencia Creative Commons 4.0 Internacional



Estudio de patrones de expresión por inmunohistoquímica de la proteína supresora tumoral bap1 en melanoma cutáneo y su relación con parámetros clínico-patológicos e índice de proliferación celular by Marco Mario Mazzotta is licensed under a Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

**“ESTUDIO DE PATRONES DE EXPRESIÓN POR
INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA PROTEÍNA
SUPRESORA TUMORAL BAP1 EN MELANOMA
CUTÁNEO Y SU RELACIÓN CON PARÁMETROS
CLÍNICO-PATOLÓGICOS E ÍNDICE DE
PROLIFERACIÓN CELULAR”**

Trabajo de Tesis para optar al
título de Doctor en Medicina y Cirugía

Marco Mario Mazzotta

CÓRDOBA
REPÚBLICA ARGENTINA

Año 2021

COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS

DIRECTOR

Prof. Dra. María Elisa Dionisio de Cabalier

INTEGRANTES

Prof. Dr. Jorge Humberto Mukdsi

Prof. Dr. Ismael Fonseca

Artículo 30° del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Medicina y Cirugía:
“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA CON LAS
OPINIONES DE ESTA TESIS”

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis a todas aquellas personas que les sea de utilidad, y especialmente a mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a la Prof. Dra. María Elisa Dionisio de Cabalier, directora de esta tesis, por su valiosa experiencia e incansable espíritu de crecimiento, cuya guía y estímulo permanente posibilitaron la concreción de esta tesis doctoral.

Un agradecimiento especial, a los miembros de la comisión de seguimiento de tesis, Prof. Dres. Jorge Mukdsi e Ismael Fonseca por sus aportes, apoyo y sugerencias.

A todos los docentes y ex-docentes de la I ° Cátedra de Patología (FCM, UNC), que han brindado su apoyo y colaboración en toda ocasión.

Al personal administrativo, técnico y de archivo del servicio de Patología del Hospital Nacional de Clínicas, por facilitar espacio físico y calor humano de trabajo, y brindar su colaboración, especialmente a Natalia, Mónica y Gustavo.

A los médicos del servicio de Dermatología del Hospital Nacional de Clínicas, por su colaboración con el aporte de información clínica y facilitar el trabajo interdisciplinario diario.

A mis colegas, el Prof. Ideal Negri y Prof. Susana Szlabi, por su colaboración e intercambio de experiencias e interrogantes.

A la Dra. Verónica Bengió, por compartir su experiencia y estimular el crecimiento personal y profesional.

A mi familia, por brindarme su apoyo y contención de forma permanente.

Marco Mazzotta

ÍNDICE

RESUMEN	7
SUMMARY	9
CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN	11
1.1. El melanoma cutáneo. Generalidades, epidemiología y clínica	12
1.2. Factores de riesgo, patogenia y concepto de melanomagénesis.....	13
1.3. Clasificación del melanoma	15
1.4. Factores pronósticos del melanoma	18
1.5. La proteína BAP1: funciones normales y asociación con neoplasias	20
1.6. BAP1: rol diagnóstico y pronóstico en cáncer.	27
1.7. BAP1: potencial rol predictivo para terapias existentes y en desarrollo ..	32
1.8. Hipótesis y objetivos	34
CAPÍTULO II - MATERIALES Y MÉTODOS	35
2.1. Diseño del estudio.....	36
2.2. Variables de estudio.....	36
2.2.1. Variables clínico-patológicas	36
2.2.2. Variables histopatológicas	39
2.2.3. Variables de inmunohistoquímica	41
2.3. Técnicas e instrumentos de medición	41
2.3.1. Recolección de datos.....	41
2.3.2. Evaluación de preparados histológicos con microscopía óptica	42
2.3.4. Confección de micromatrices de tejido (<i>Tissue microarrays</i>).....	43
2.3.5. Realización de cortes coloreados con hematoxilina y eosina	43
2.3.6. Técnica de inmunohistoquímica	44
2.3.7. Técnica de blanqueamiento de melanina	47
2.3.8. Evaluación de variables de inmunohistoquímica	48
2.4. Análisis estadístico.....	49
Variabilidad interobservador	49
2.5. Alcances y límites de la investigación	50
2.6. Consideraciones éticas	50

CAPÍTULO III - RESULTADOS	51
3.1.Descripción de la muestra de estudio	52
3.1.1.Descripción por variantes clínico-patológicas	57
3.2.Análisis de asociación y correlación de variables	60
3.2.1.Prueba de correlación entre variables continuas	60
3.2.2.Comparación entre variantes de melanoma	61
3.2.3.Asociaciones entre BAP1 nuclear y otras variables.....	61
3.2.4.Asociaciones de patrones de BAP1 citoplasmático	64
3.2.5.Asociaciones entre categorías de Ki-67 y otras variables.....	65
3.3. Análisis confirmatorio (modelos de regresión logística)	65
CAPÍTULO IV - DISCUSIÓN	68
4.1. Discusión	69
4.2. Conclusiones.....	95
BIBLIOGRAFÍA	99
ANEXO	115
Aspectos éticos.....	115
Trabajos científicos presentados/disertaciones	116

RESUMEN

El melanoma cutáneo es una neoplasia maligna de incidencia creciente y mal pronóstico. Se han identificado mutaciones genéticas que afectan BAP1, enzima deubiquitinasa (DUB) de múltiples funciones y a la cual se le atribuye función supresora tumoral. La ausencia de su expresión nuclear (BAP1n) se observa en neoplasias esporádicas y aquellas desarrolladas en el síndrome hereditario de predisposición al cáncer BAP1. En melanoma uveal, frecuente en este síndrome, y otros cánceres, la negatividad de BAP1n se asocia a mal pronóstico, pero en el melanoma cutáneo esporádico esto no se ha determinado, y algunos trabajos señalan una asociación contraria. Además, hay observaciones recientes sobre la existencia de un patrón de BAP1 citoplasmático (BAP1c) perinuclear focal (PN), atribuido a un plegamiento anómalo de la proteína de tipo amiloide, con pronóstico incierto y del cual se hipotetiza que podría favorecer la oncogénesis. La identificación de nuevos biomarcadores tisulares, pronósticos y predictivos, en esta neoplasia agresiva cuyas terapias en estadios avanzados aún no demuestran un efecto sostenido a largo plazo, es importante, y las enzimas DUB representan blancos potencialmente atractivos para terapias oncológicas dirigidas. Nuestro objetivo fue analizar los patrones de expresión de BAP1 en el melanoma cutáneo primario, en relación a variables clínico-patológicas de valor pronóstico y al índice de proliferación celular.

En este estudio, se examinaron retrospectivamente 116 biopsias de melanomas cutáneos primarios, del servicio de Patología del Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba. Los tejidos se fijaron en formol e incluyeron en parafina. Se estudiaron variables clínicas e histopatológicas, y por técnica de inmunohistoquímica (IHQ), se estudió el índice de proliferación celular (% de Ki-67) y los patrones de BAP1n y BAP1c. El análisis estadístico se realizó mediante pruebas de Chi-cuadrado y Fischer para variables categóricas, test de Kruskal-Wallis y correlación de Pearson para variables continuas (Ki-67, mitosis, Breslow y BAP1n), y modelos de regresión logística para estudiar las relaciones con parámetros de mal pronóstico (diseminación tumoral regional, Ki-67 elevado y

ulceración) y citomorfología epiteloide. La variabilidad interobservador se evaluó con el estadístico Kappa de Cohen y test t para dos muestras.

Del total de melanomas, 46% correspondieron a variante extensivo superficial, 26% a nodular, 15% a acrolentiginoso y 13% a lentigo maligno. El 47% presentó BAP1n bajo (<33%) y 30% BAP1c PN. Ambos parámetros se asociaron significativamente ($p < 0,05$) a variante nodular, ausencia de nevus, fase de crecimiento vertical, Breslow > 1 mm, niveles de Clark IV-V, presencia de ulceración, citomorfología epiteloide, Ki-67 elevado ($\geq 20\%$) y entre ambos patrones la relación fue significativa ($p < 0,0001$). BAP1c PN además se asoció a invasión vascular ($p = 0,0076$). En modelos de regresión logística, la presencia de diseminación tumoral regional se asoció significativamente con incremento de Breslow (OR 1,30; IC 1,03-1,64), localización en tronco (OR 17,69; IC 1,29-242,28) y aumento de Ki-67 (OR 1,07; IC 1,02-1,12), y la ulceración tuvo tendencia a ser significativa ($p = 0,0540$). BAP1c PN mostró relación significativa con Ki-67 elevado ($\geq 20\%$) (OR 4,58; IC 1,38-15,25) y BAP1n bajo con citomorfología epiteloide (OR 0,91; IC 0,88-0,94). Ambos patrones tuvieron relación significativa con presencia de ulceración (OR 3,96; IC 1,06-14,80; y OR 0,98; IC 0,96-1, respectivamente). La correlación entre BAP1n y Ki-67 fue inversa con tendencia a ser significativa ($r = -0,1613$, $p = 0,08$).

En conclusión, la detección por IHQ de BAP1n bajo y BAP1c PN se asoció de forma significativa a parámetros predictivos de pronóstico adverso, como mayor espesor de Breslow, nivel de Clark, ulceración, variante nodular y Ki-67 $\geq 20\%$. No se observó relación significativa con mayor probabilidad de presentar metástasis regional al diagnóstico inicial, a diferencia de Breslow, localización en tronco y ulceración. Las asociaciones encontradas en nuestro estudio apoyarían, al menos en un nivel morfológico, el rol supresor tumoral de BAP1 en el melanoma cutáneo primario, y la alta representación de BAP1c PN en variante nodular la apoyaría como entidad biológicamente distinta. No obstante, su valor como biomarcador tisular pronóstico y predictivo independiente y el significado de BAP1c PN en esta neoplasia necesita de estudios adicionales para establecerse.

SUMMARY

Cutaneous melanoma is a malignant neoplasm of increasing incidence and poor prognosis. Genetic mutations affecting BAP1 have been identified, which is a deubiquitinase enzyme (DUB) with multiple functions and to which a tumor suppressor function is attributed. The absence of its nuclear expression (BAP1n) is observed in sporadic neoplasms and those developed in the hereditary syndrome of predisposition to cancer BAP1. In uveal melanoma, common in this syndrome, and other cancers, BAP1n negativity is associated with a poor prognosis, but in sporadic cutaneous melanoma this has not been determined, and some studies indicate an opposite association. In addition, there are recent observations on the existence of a focal perinuclear (PN) cytoplasmic BAP1 (BAP1c) pattern, attributed to an abnormal amyloid-like folding of the protein, with an uncertain prognosis and which it is hypothesized that it could favor oncogenesis. The identification of new prognostic and predictive tissue biomarkers in this aggressive neoplasm whose therapies in advanced stages do not yet demonstrate a sustained long-term effect, is important, and DUB enzymes represent potentially attractive targets for targeted cancer therapies. Our aim was to analyze the expression patterns of BAP1 in primary cutaneous melanoma, in relation to clinicopathological variables of prognostic value and the cell proliferation index.

In this study, 116 biopsies of primary cutaneous melanomas were retrospectively examined, from the Pathology service of the Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba. The tissues were fixed in formalin and embedded in paraffin. Clinical and histopathological variables were studied, and by immunohistochemical technique, the cell proliferation index (% of Ki-67) and the patterns of BAP1n and BAP1c were studied. Statistical analysis was performed using Chi-square and Fischer tests for categorical variables, Kruskal-Wallis test and Pearson's correlation for continuous variables (Ki-67, mitosis, Breslow and BAP1n), and logistic regression models to study the relationships of variables with poor prognostic parameters (regional tumor spread, elevated Ki-67 and ulceration) and epithelioid cytomorphology. The interobserver variability was evaluated with Cohen's Kappa statistic and t-test for two samples.

Of the total melanomas, 46% corresponded to superficial spreading variant, 26% to nodular, 15% to acrolentiginous and 13% to malignant lentigo. 47% presented low BAP1n (<33%) and 30% BAP1c PN. Both parameters were significantly associated with nodular variant, absence of nevus, vertical growth phase, Breslow > 1 mm, Clark IV-V levels, presence of ulceration, epithelioid cytomorphology, elevated Ki-67 ($\geq 20\%$) and between both patterns the relationship was significant ($p < 0.0001$). BAP1c PN was also associated with vascular invasion ($p = 0.0076$). In logistic regression models, the presence of regional tumor spread was significantly associated with increase of Breslow (OR 1.30; CI 1.03-1.64), localization in the trunk (OR 17.69; CI 1.29-242.28) and increase of Ki-67 (OR 1.07; CI 1.02-1.12), and ulceration tended to be significant ($p = 0.0540$). BAP1c PN showed a significant relationship with elevated Ki-67 ($\geq 20\%$) (OR 4.58; CI 1.38-15.25) and low BAP1n with epithelioid cytomorphology (OR 0.91; CI 0.88-0.94). Both patterns had a significant relationship with the presence of ulceration (OR 3.96; CI 1.06-14.80; and OR 0.98; CI 0.96-1, respectively). The correlation between BAP1n and Ki-67 was inverse with a tendency to be significant ($r = -0.1613$, $p = 0.08$).

In conclusion, the detection by IHC of low BAP1n and BAP1c PN was significantly associated with predictive parameters of adverse prognosis, such as greater Breslow thickness, Clark level, ulceration, nodular variant and Ki-67 $\geq 20\%$. There is no significant relationship with a greater probability of presenting regional metastasis at initial diagnosis, unlike Breslow, localization in the trunk and ulceration. The associations found in our study would support, at least on a morphological level, the tumor suppressive role of BAP1 in primary cutaneous melanoma, and the high representation of BAP1c PN in nodular variant would support it as a biologically distinct entity. However, its value as an independent prognostic and predictive tissue biomarker and the significance of BAP1c PN in this neoplasm requires further studies to be established.

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. El melanoma cutáneo. Generalidades, epidemiología y clínica

El melanoma es una neoplasia maligna originada de los melanocitos, y es uno de los cánceres más letales, dando cuenta del 73% de las muertes relacionadas con cáncer de piel. Su incidencia se ha incrementado en las últimas décadas y constituye el 1,6% de los cánceres, excluyendo el cáncer cutáneo no melanoma, sobre todo en poblaciones blancas de países industrializados (1). Puede presentarse en cualquier tejido al cual hayan migrado células derivadas de la cresta neural, siendo más frecuente en la piel y con menor frecuencia en localizaciones extracutáneas, principalmente ojo (coroides, cuerpo ciliar, iris y conjuntiva) y mucosas (cavidad nasal, senos, orofaringe y mucosas anorrectal, vulvar y vaginal) (2). Se han descrito además casos aislados en: esófago, estómago, intestino, vesícula y vía biliar, vía respiratoria, pulmón, vejiga, uretra, cérvix (2), y en sistema nervioso central, donde deriva de melanocitos de las leptomeninges y usualmente afecta médula espinal (3). La incidencia de los melanomas extracutáneos ha permanecido estable desde 1970 (4), y en general tienen peor pronóstico que los cutáneos (5). En cuanto a su epidemiología, antes de los 40 años, el cutáneo es más frecuente en mujeres y en extremidades inferiores, y después de esa edad, predomina en hombres y en cabeza y cuello (1, 6). La espalda es el sitio más común de localización en hombres y las extremidades inferiores en mujeres (7). El subtipo extensivo superficial es el más frecuente a nivel mundial (30-60%), pero el tipo acrolentiginoso es más común en raza negra, asiática y es el más frecuente en la mayoría de países latinoamericanos (8, 9). En Argentina se creó el Registro Argentino de Melanoma Cutáneo (RAMC) en 2003 por la Sociedad Argentina de Dermatología y la Fundación del Cáncer de Piel, con el fin de obtener información epidemiológica. El primer reporte, publicado en 2010, recopiló datos del período 2003-2009 de instituciones públicas y privadas de distintas provincias, con 3.832 casos. La edad promedio fue 55,1 años en mujeres y 58,5 en hombres, la localización más frecuente en mujeres fue en miembros inferiores y en los hombres fue en el tronco. El tipo histológico más común fue extensivo superficial (54%) seguido por

nodular (27%), lentigo maligno (8%) y acrolentiginoso (6%). En el 56% de lesiones el Breslow fue $<1,01$ mm, y los melanomas provenientes del sistema público presentaron un mayor espesor que los del sector privado (10). El segundo reporte, publicado en 2020, abarcó el período 2002-2018, con 10.199 casos y reportó peor pronóstico en ancianos, hombres, morfología nodular y acrolentiginosa (11). Paralelamente al aumento en la incidencia, se observa un aplanamiento en la curva de mortalidad (1,12), atribuido a que se presentan lesiones cada vez más pequeñas y en estadio temprano, curables con tratamiento quirúrgico (13). Clínicamente, para detectar lesiones tempranas, existe la nemotecnia ABCDE, siendo A: asimetría, B: bordes irregulares, C: color, D: diámetro mayor a 5 o 6 mm y E: evolución o cambio de las características (14). En cuanto a la mortalidad de esta neoplasia maligna, la sobrevivida a 5 años es de 98,4% en pacientes con enfermedad localizada, 64% con metástasis regional y de 22,5% con enfermedad metastásica a distancia (1,15). Las nuevas herramientas terapéuticas para enfermedad avanzada han mostrado mejora en la sobrevivida e incluso curaciones, pero su impacto a largo plazo aún no se ha establecido, y la curación sigue siendo quirúrgica (16, 17).

1.2. Factores de riesgo, patogenia y concepto de melanomagénesis.

En el desarrollo del melanoma cutáneo participan factores genéticos y ambientales. El factor ambiental más importante es la exposición a radiación ultravioleta (UV), natural (de la radiación solar) o artificial (por ejemplo: uso de camas solares), y se identificó a la exposición intensa e intermitente al sol, con antecedente de quemaduras solares en edad joven, como un factor de riesgo significativo (18). La exposición solar crónica es importante en variantes lentigo maligno y desmoplásico (19). Otros factores de riesgo son: antecedente familiar o personal de melanoma, 5 o más nevos displásicos, más de 100 nevos totales, y factores constitucionales como piel y ojos claros, pelo rubio o colorado, presencia de pecas y pobre habilidad para broncearse, y otros como factores de riesgo que se han señalado son terapia PUVA e inmunosupresión (20). En relación a los factores genéticos, 10% de los melanomas son familiares, identificándose alelos de alto riesgo de desarrollo de melanoma, como CDKN2A, CDK4, RB, XP (A-G) y BAP1; de riesgo intermedio: MC1R y MITF; y riesgo bajo:

TERT, IRF4, CASP8, entre otros. Los melanomas presentan la carga más alta de mutaciones de todos los cánceres, y muchas de ellas incluyen el sello ultravioleta “C>T” (transición citosina a timina, en sitios dipirimidina) (21). Las mutaciones pueden ser somáticas o de línea germinal, y las primeras dan cuenta de la mayoría de defectos moleculares en melanoma. La identificación de moléculas y vías de señalización ayudaron a elaborar el concepto actual de melanomagénesis, habiéndose propuesto modelos de progresión tumoral (22, 23), no tan bien caracterizados como en otros cánceres como el colorrectal. La mayoría incluye la progresión desde un melanocito al melanoma metastásico, con la siguiente secuencia hipotética (Figura 1): melanocito → nevo displásico/atípico → melanoma in situ/melanocitoma → melanoma invasivo → metástasis. Estos modelos se apoyan en la identificación de anomalías genómicas compartidas entre melanomas y nevos (24). En los pasos intermedios de la progresión tumoral se encuentran los nevos atípicos y los “melanocitomas”, lesiones recientemente reconocidas (25), que progresan por acumulación escalonada de mutaciones somáticas y eventos epigenéticos (21). Al igual que otros tumores, la proliferación neoplásica se inicia por mutaciones de ganancia de función de genes promotores del crecimiento, también denominados oncogenes, genes conductores o *drivers* (ej: BRAF, NRAS, HRAS, KIT, GNAQ, GNA11, etc). Estas alteraciones generalmente son seguidas por la pérdida de la función de genes supresores tumorales (ej: APC, P-53, NF-1, PTEN, CDKN2A, BAP1), y posteriormente activación de genes adicionales relacionados con el crecimiento y la supervivencia (ej: TERT) (24). Entre los oncogenes conductores más comunes, característicamente excluyentes entre sí en cualquier tumor primario dado, se encuentran mutaciones de BRAF (presentes en aproximadamente la mitad de melanomas cutáneos) o NRAS. En los melanomas más avanzados, el patrón mutuamente exclusivo puede cambiar, ya que pueden existir varias mutaciones impulsoras en los subclones, que pueden seleccionarse, debido a la terapia sistémica dirigida a ciertos componentes de la vía de señalización. Aunque algunos tumores siguen un modelo predecible, los melanocitos pueden encontrar distintos caminos moleculares hacia el melanoma. Más aún, este tumor tiene la habilidad de frenar su progresión en estadios avanzados y producir recurrencias muy tardías, hasta cuatro décadas posteriores al diagnóstico (26). Si bien muchos melanomas (30%-50%) surgen

de un nevo melanocítico preexistente, la mayoría de éstos son estables (27), y por lo tanto no se recomienda la escisión generalizada de estas lesiones para prevenir el melanoma.

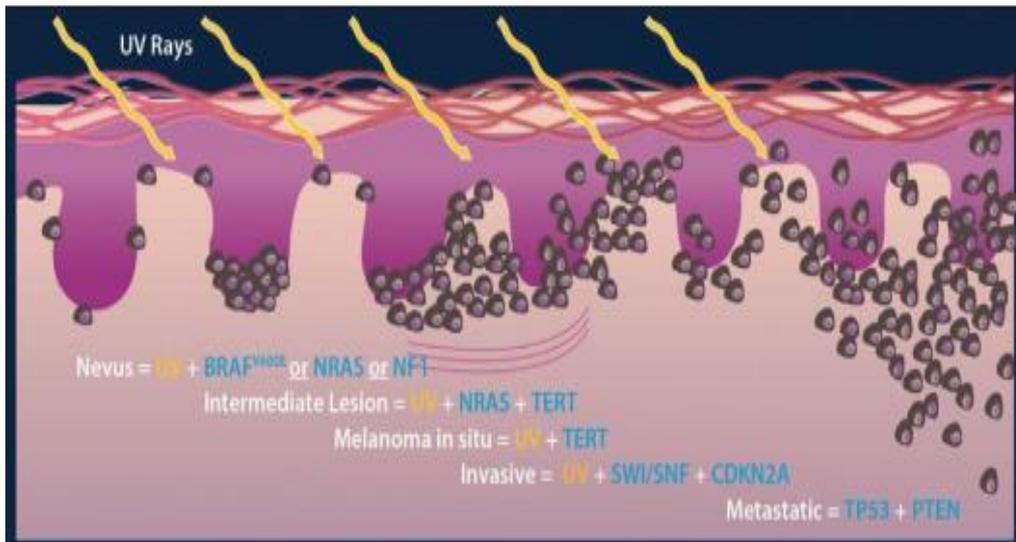


Figura 1: Progresión tumoral. Roles de factores ambientales y eventos genéticos y epigenéticos en la progresión de un melanocito normal al melanoma invasivo. Letras en blanco: lesiones; amarillo: radiación UV; azul: genes mutados. Extraído de Weedon Skin Pathology 5th edition, 2021.

1.3. Clasificación del melanoma

La propuesta de clasificación original de Clark (28) y McGovern (29), aún vigente, reconoce cuatro tipos principales o variantes clínico-patológicas: extensivo superficial, lentigo maligno, acrolentiginoso y nodular. Se han descrito otras de menor frecuencia que no se encuadran fácilmente en los tipos anteriores (ej: desmoplásico) y en aproximadamente 5% no puede asignarse una variante en particular. Los diferentes subtipos tienen distintos escenarios clínicos y rasgos histológicos propios. Clínicamente, el extensivo superficial suele presentarse en personas de mediana edad con antecedente de exposición solar intermitente intensa, principalmente en espalda en varones y piernas en mujeres (diferencias de localización anatómica atribuidas a distintos patrones de exposición solar en hombres y mujeres) (30); el lentigo maligno se da en personas de edad avanzada con pobre habilidad para broncearse, con exposición solar crónica y localizado generalmente en cabeza y cuello; el acrolentiginoso es más común en descendientes de raza amarilla y negra, edad avanzada, se localiza en palmas,

plantas, nivel subungueal y periungueal, y suele asociarse a antecedentes de traumatismos; y el melanoma nodular es más común en varones de edad avanzada y localización en cabeza y cuello (31, 32), aunque puede ser clínicamente heterogéneo (33, 34). Histológicamente, el melanoma cutáneo evoluciona a través de 2 etapas, en la primera, la fase de crecimiento radial o no tumorigénica, las células neoplásicas se expanden centrífugamente en el eje horizontal de la piel a través de radios imperfectos. En la siguiente, el tumor infiltra la dermis y eleva la epidermis para formar un nódulo cuya dirección neta de crecimiento incluye el eje vertical, por lo que se denomina fase de crecimiento vertical o tumorigénica (35). Las variantes extensivo superficial, lentigo maligno y acrolentiginoso comienzan siempre con una fase de crecimiento radial, con diferencias histológicas: células tumorales intraepidérmicas con diseminación pagetoide o en “suelta de zorros” a estratos epidérmicos altos en extensivo superficial, y crecimiento en hilera en la capa basal epidérmica, en las variantes lentigo maligno y acrolentiginoso; mientras que el melanoma nodular presenta fase de crecimiento vertical pura de entrada, con morfología nodular y ausencia de fase radial (36, 29). Ackerman (37) y otros autores (38) han cuestionado la validez de este sistema tradicional de clasificación de los melanomas en variantes clínico-patológicas, ya que después de todo, las estrategias terapéuticas tradicionales han sido independientes de las mismas. No obstante, algunos trabajos sostienen que la variante nodular es un subtipo biológicamente distinto y más agresivo de melanoma, independientemente del espesor tumoral, observando que el pronóstico para el melanoma nodular delgado es peor comparado con el del melanoma extensivo superficial delgado, con rangos reportados de supervivencia libre de enfermedad de 82 a 84,9% para el primero vs 91-96,4% para el segundo (39, 40).

Observaciones posteriores señalaron que los melanomas cutáneos pueden surgir de 2 vías distintas, una caracterizada por su asociación con exposición solar intermitente, nevo displásico previo, alta frecuencia de mutación BRAF^{V600E} y subtipo extensivo superficial; y la otra con exposición solar crónica, sin nevo previo y subtipo lentigo maligno (41). Estos aportes, sumados a posteriores avances en el conocimiento de aspectos moleculares del melanoma, gracias al advenimiento de estudios genómicos de gran escala, como NGS (*Next*

Generation Sequencing), sentaron las bases para un nuevo sistema de clasificación, que abarca no solo características histológicas, sino también clínicas, epidemiológicas y genéticas, denominada “clasificación de vías multidimensionales”, propuesta por Bastian (23). En la misma se contempla la extensión del daño por radiación UV o daño solar acumulado (42, 43), la célula de origen y los hallazgos genómicos característicos, y fue adoptada en la clasificación reciente de WHO 2018 (Tabla 1), en la que se reconocen 9 subconjuntos o "vías" para el desarrollo de melanomas. En cada una de estas existe un espectro, con los subtipos de melanoma ubicados en el extremo maligno del mismo, y sus potenciales precursores benignos en el opuesto (33, 34). Entre estos extremos se encuentran lesiones intermedias, que exhiben anomalías genómicas compartidas con nevus y melanomas, con más mutaciones que los primeros y menos que los segundos. Se incluyen en este grupo los melanocitomas (25), definidos recientemente por WHO como: neoplasias tumorigénicas de melanocitos dérmicos, papulonodulares, con atipia y/o celularidad incrementada comparadas con nevus, y un riesgo incrementado, aunque bajo, de progresión neoplásica. Entre estas lesiones se encuentran los tumores melanocíticos intradérmicos asociados a BAP1 (TMIAB o MBAIT: *melanocytic BAP1 associated intradermal tumor*), el melanocitoma penetrante profundo y el epiteloide pigmentado (ex melanoma tipo equino), entre otros. En este nuevo sistema de clasificación de WHO la variante nodular no se asigna a ninguna vía en especial, pudiendo provenir de cualquiera de ellas. En algunas vías se desconocen las lesiones intermedias o existen “vacíos o gaps moleculares”, que serán rellenados con futuras evidencias. Las clasificaciones convencionales probablemente evolucionarán hacia nuevos sistemas de clasificación molecular, basados en la taxonomía integrada de lesiones melanocíticas de Bastian; sin embargo, por el momento, la clasificación histomorfológica del melanoma sigue siendo el estándar (20, 33, 34).

Tabla 1 CLASIFICACIÓN DE MELANOMA (WHO 2018)				
Extensión del daño por radiación UV	Vía	Lesiones precursoras		Subtipos de melanoma
		Benignas	Intermedias	
1.Melanomas en piel con bajo daño solar acumulado	I	Nevus	Nevus displásico	Melanoma extensivo superficial
		NPP	Melanocitoma en NPP	Melanoma en NPP (raro)
		NBIN	Melanocitoma en NBIN	Melanoma en NBIN/spitzoide (raro)
		¿?	MEP	Melanoma en MEP (raro)
2.Melanomas en piel con alto daño solar acumulado	II	¿?	Lentigo de Hutchinson	Melanoma lentigo maligno
	III	¿?	Displasia in situ	Melanoma desmoplásico
3.Melanomas en sitios sin exposición solar o sin asociaciones etiológicas conocidas con exposición solar	IV	Nevus deSpitz	Tumor de Spitz atípico (melanocitoma)	Melanoma Spitz
	V	Nevus acral	Displasia in situ	Melanoma acral
	VI	¿Melanosis?	Displasia in situ	Melanoma mucoso-lentiginoso
	VII	Nevus congénito	Nódulo proliferativo (melanocitoma)	Melanoma originado en nevus congénito
	VIII	Nevus azul	Nevus azul atípico (melanocitoma)	Melanoma originado en nevus azul
	IX	¿Nevus?	¿Displasia?	Melanoma uveal
4.Exposición solar variable	N/A	Origen en cualquiera de las vías		Melanoma nodular
				Melanoma nevoide
MEP: melanocitoma epiteloides pigmentado. NBIN: nevus BAP1 inactivado. NPP: nevus penetrante profundo				

1.4. Factores pronósticos del melanoma

El factor pronóstico más importante del melanoma cutáneo primario y que influye en el tratamiento, independientemente del subtipo histológico, es el espesor tumoral de Breslow (44, 45). También son importantes los patrones de crecimiento, ya que los melanomas en fase de crecimiento radial pura tienen un pronóstico excelente, mientras que las lesiones en fase vertical tienen competencia potencial para la metástasis (35). La probabilidad de este evento aumenta principalmente con atributos como incremento del espesor tumoral y presencia de ulceración, que forman la base del sistema de estadificación patológica actual del melanoma primario de *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) (44-49); y otros como el índice mitótico (mitosis/mm²) (50, 51), invasión linfovascular (52), neurotropismo (20) y linfocitos infiltrantes tumorales (53, 54). El índice mitótico es un factor pronóstico importante, sobre todo en

melanomas T1 (espesor ≤ 1 mm), asociado con positividad de ganglio linfático y peor sobrevida libre de enfermedad (50, 51). La infiltración linfocitaria del tumor es un rasgo favorable, particularmente cuando es de tipo *brisk* o enérgico (53, 54), al igual que la regresión tumoral, característica estrechamente relacionada a la anterior, que se asocia a menor probabilidad de tener ganglio centinela positivo (55, 56) siendo un factor de protección para supervivencia, probablemente debido a una activación del sistema inmune del huésped. La presencia de metástasis ganglionar regional es el factor de mal pronóstico independiente más importante sin tener en cuenta la metástasis a distancia, al igual que los depósitos tumorales separados de la masa tumoral principal, que incluyen los satélites, microsátélites y metástasis en tránsito, designados con el término de “enfermedad metastásica regional no ganglionar”, que corresponde al estadio patológico N1c en el actual sistema de AJCC (44, 45). El nivel de Clark, que utiliza barreras anatómicas en vez de la medición del espesor tumoral, ya no es más requerido a fines de estadificación, a pesar de su significado pronóstico en análisis univariados (20, 57). La asociación histológica con nevus se ha correlacionado con factores pronósticos favorables, mientras que la asociación clínica por el contrario lo hace con factores desfavorables (58). Por otra parte, el valor pronóstico independiente de la variante nodular ha sido tema de debate, y la mayoría de los estudios encontró que no existen diferencias pronósticas entre los subtipos de melanoma cuando estos presentan el mismo espesor tumoral. No obstante, como ya se señaló, hay trabajos que compararon el comportamiento de melanomas nodulares delgados con el de melanomas extensivos superficiales del mismo espesor, concluyendo que los primeros se asocian a características más agresivas (31, 32). Además, si bien la mayoría de melanomas delgados tiene buen pronóstico con la escisión quirúrgica, hay casos que producen metástasis, por lo que estos autores sostienen que el peor pronóstico no puede ser atribuido solamente al mayor espesor tumoral y que el subtipo nodular sería una entidad biológicamente distinta y más agresiva (59). La última edición de WHO 2018 señala que el melanoma nodular no es una variante específica, pudiendo originarse de cualquier vía, en la cual las células tumorales adquieren precozmente anomalías genéticas requeridas para la invasión, en un orden secuencial alterado (“saltando pasos”), que lo impulsan tempranamente hacia la fase de crecimiento vertical, con duración corta o casi

nula de la fase radial. Debido a este origen variado, los rasgos epidemiológicos y genéticos de esta variante son heterogéneos (33, 34). El índice mitótico representa un pequeño número de células tumorales que se encuentran en la fase M del ciclo celular, mientras que el marcador de proliferación Ki-67 se expresa en todas las fases del mismo (G1, S, M y G2) excepto en la fase de reposo o G0 (60), siendo de esta forma una buena medida de la proliferación celular, habiéndose encontrado relación con malignidad y curso clínico agresivo en varias neoplasias humanas, incluyendo melanomas (61), aunque no demostró ser un factor pronóstico independiente (62). En melanomas de espesor menor a 1,5 mm se ha visto que es un indicador de mal pronóstico y predictivo de metástasis (63). En cuanto al tratamiento quirúrgico, la escisión local amplia es el tratamiento estándar para melanoma. Se puede ofrecer biopsia de ganglio centinela dependiendo del espesor y otros parámetros pronósticos. Esta última y el vaciamiento ganglionar proveen información pronóstica, pero hay debate si estas prácticas proporcionan un beneficio en supervivencia en la mayoría de pacientes (16).

1.5. La proteína BAP1: funciones normales y asociación con neoplasias

Uno de los genes relacionados al cáncer más atractivo bajo investigación es *Bap1* (proteína 1 asociada a BRCA1), un gen supresor tumoral. Las razones de este creciente interés se relacionan con el amplio espectro de vías directa o indirectamente moduladas por el mismo, y compartidas por muchos tumores (64). Presenta 17 exones, se localiza en el brazo corto del cromosoma 3p21.1 y codifica la proteína BAP1, que es una enzima deubiquitinasa (DUB), de 729 aminoácidos, que inicialmente se identificó como una proteína que se unía al dominio RING de la proteína supresora tumoral BCRA1 (65). La misma tiene un dominio catalítico N-terminal, con actividad hidrolasa carboxiterminal (UCH) de ubiquitina, y en extremo C-terminal dos señales de localización nuclear (NLS) (65). En medio de estos extremos presenta dominios de unión a distintas proteínas, como BARD1, ASXL1/2 y HCF1 (66, 67). Regula múltiples actividades formando complejos con varias proteínas (68), y se le atribuye función supresora de tumores, que en un principio fue asociada exclusivamente a la localización nuclear (69), aunque recientes evidencias también señalan que dependería también de la localización citoplasmática. Como parte de estos complejos

multiproteicos, BAP1 coopera en la regulación de muchas vías involucradas en la homeostasis celular, incluyendo diferenciación celular, proliferación, reparación de daños al ADN, muerte celular programada y gluconeogénesis (64). En el núcleo, BAP1 se une a numerosas proteínas (Figura 2), incluyendo HCF1, YY1, OGT, KDM1B, y FOXK1/2 (70). Como resultado de estas múltiples interacciones, modula muchas actividades. Se sabe que es crítico para la síntesis de ADN normal y en la replicación bajo condiciones de estrés, interactuando y deubiquitinizando INO80, reclutándolo en las horquillas de replicación y suprimiendo de esta manera la inestabilidad genómica (71, 72, 73). También modula la proliferación celular al interactuar con numerosos factores de transcripción, regulando la expresión de genes y participando en el control del ciclo celular (74, 75), mediante deubiquitinización y activación de HCF1, que es activador del factor de transcripción E2F (65, 76), necesario para la transición G1/S y citocinesis apropiada (77). También juega un papel crucial en la remodelación de la cromatina, interactuando con ASXL1/2 para formar el complejo PR-DUB, que participa en dicha actividad (70, 78). Además, tiene un papel importante en la reparación de roturas de ADN, por recombinación homóloga regulada por la unión BAP1-BARD1, proceso clave para reducir el daño genético y prevenir el cáncer (79, 80). En el citoplasma, BAP1 actúa modulando la carcinogénesis ambiental, promoviendo la apoptosis posterior al daño en el ADN, mediante deubiquitinización y estabilización del receptor IP3R3 del retículo endoplásmico, que permite la liberación de calcio al citoplasma y el transporte del mismo dentro de la mitocondria. La elevación del calcio iónico intramitocondrial produce la liberación de citocromo c al citoplasma, que activa la apoptosis (81). En individuos heterocigotas BAP1^{+/-}, los niveles reducidos de BAP1 hacen que disminuya la reparación del daño de ADN producido por estímulos ambientales, así como la apoptosis, favoreciendo la acumulación de células con ADN dañado y el desarrollo de cáncer. BAP1 también promueve la ferroptosis, una forma de muerte celular no apoptótica (82), reprimiendo la expresión de SLC7A11, una proteína de membrana celular que importa cistina y exporta glutamato (83). La cistina es un precursor de la biosíntesis del glutatión (GSH), y la caída en sus niveles reduce la actividad antioxidante y provoca la peroxidación de lípidos, induciendo la ferroptosis. A pesar de la evidencia que indica función antiproliferativa, otros estudios relacionan BAP1 con el crecimiento

y proliferación celular (74, 75, 76). Además, interviene en la diferenciación celular, desde células pluripotenciales a diferenciación en ectodermo, mesodermo y cresta neural, mediante la regulación de marcadores epigenéticos, como H3K27ac. La pérdida de BAP1 es letal en la embriogénesis teniendo un efecto proapoptótico en células madre (*stem cell*) embrionarias, fibroblastos, hepatocitos y células de páncreas en ratones, pero no en melanocitos ni células mesoteliales (84). BAP1 también puede ejercer un rol promotor de supervivencia en respuesta al estrés metabólico, reprimiendo a UPR (unfolded protein response) (85), y, además, modula el metabolismo celular, ya que a través del complejo O-GlcNAc transferasa/HCF1, regula y estimula la gluconeogénesis modulando la estabilidad del coactivador transcripcional PGC1 α (86). Una reducción en los niveles de BAP1 produce un cambio en el metabolismo celular, pasando de fosforilación oxidativa a glucólisis anaeróbica (87). Este efecto puede deberse a reducción del calcio intramitocondrial, requerido por muchas enzimas que regulan la fosforilación oxidativa (86, 88). Las actividades separadas de BAP1 en el núcleo y el citoplasma proporcionan una justificación mecánica para la fuerte actividad supresora de tumores de esta enzima DUB.

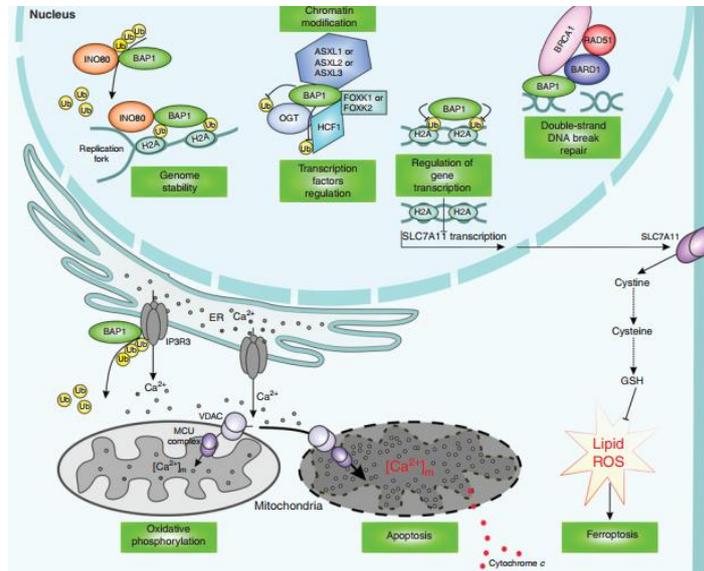


Figura 2: Funciones de BAP1 nuclear y citoplasmático. *Nucleares (arriba):* BAP1 recluta INO80 asegurando replicación eficiente de ADN, regula la expresión génica interactuando con ASXL1, HCF1, FOXK1, OGT; reprime la expresión de SLC7A11, que importa cistina extracelular, precursor del glutatión (GSH), que participa en la eliminación de radicales libres de oxígeno (ROS), cuya sobreproducción resulta en ferroptosis; y uniéndose a BARD1 y otras proteínas participa en reparación de ADN. *Citoplasmáticas (abajo):* la integridad de los canales de IP3R3 del RE depende de BAP1 que remueve ubiquitina de los mismos. El balance entre ubiquitinación por FBXL2 (150) y deubiquitinación mantiene un equilibrio requerido para la transferencia de Ca⁺² desde RE a la mitocondria. La mitocondria necesita calcio para la fosforilación oxidativa, sin embargo, concentraciones altas causan apoptosis. VDAC: canales aniónicos dependientes de voltaje. MUC: uniporter de calcio mitocondrial. Extraído de Carbone M et al. Biological mechanisms and clinical significance of BAP1 mutations in human cancer. *Cancer discovery* 2020, 10(8), 1103-1120.

Debido a la poderosa actividad supresora tumoral de BAP1 y su rol en la modulación de la interacción “gen-ambiente”, cada vez más investigadores estudian los mecanismos biológicos y las implicancias médicas de las mutaciones somáticas y germinales de BAP1. A pesar de que BAP1 es un gen involucrado en cáncer bien establecido, algunos mecanismos por los que promueve el desarrollo y progresión de las células tumorales sólo se conocen parcialmente. Esto se debe principalmente a la habilidad de BAP1 de interactuar con muchos sustratos, lo que resulta en la regulación de un número extraordinario de procesos celulares claves, de forma variable según el contexto y linaje celular, pudiendo diferir entre distintos tipos de cánceres o especies (64). La pérdida de BAP1 estimula la carcinogénesis en varios tejidos. Todos los tipos de mutaciones como inserciones, deleciones, cambio de marco de lectura, de sentido erróneo y sin sentido pueden ocurrir en el gen BAP1, tanto somáticas como de línea germinal (89, 90, 91), que funcionalmente pueden producir proteína truncada con pérdida de la capacidad de localización nuclear, estabilidad reducida de la proteína o del ARNm con su consecuente degradación, y pérdida de dominio catalítico hidrolasa (92). Como verdadero supresor tumoral, BAP1 parece respetar la hipótesis del doble golpe de Knudson, en donde el primer golpe implica la pérdida de heterocigosidad (*LOH: loss of heterozygosity*) por deleción de 3p21, y una mutación subsecuente ocurre en el alelo restante. El desarrollo de neoplasias por inactivación de BAP1 puede deberse a desregulación del ciclo celular, la falta de actividad reparativa del ADN (93) que genera inestabilidad genómica, deterioro del papel regulador en la transcripción de genes (66, 94), y también colaboraría la pérdida de funciones citoplasmáticas. Bajo condiciones genotóxicas o de estrés (ej: exposición a carcinógenos ambientales como el asbesto o radiación UV) normalmente se induce daño al ADN y muerte celular, pero las células con niveles bajos de BAP1 escapan a la apoptosis. El equilibrio entre el daño del ADN y la muerte celular determina el resultado: cuantas más células dañadas por el ADN sobreviven a la exposición, mayor es el riesgo de que una de ellas se convierta en neoplasia maligna. En los individuos portadores de mutaciones de BAP1 de línea germinal heterocigota se observó el efecto *Warburg*, que además de ser un sello distintivo de las células cancerosas (que obtienen casi la misma cantidad de energía de la glucólisis anaeróbica que del ciclo de Krebs) (95, 96), también se encuentra en células

normales de los individuos portadores y puede contribuir a la alta incidencia de cáncer observado entre ellos (88), ya que este fenómeno además de proteger a las células tumorales de la hipoxia, promueve su crecimiento, estimulado por el ácido láctico secretado en el espacio extracelular, que también induce la angiogénesis y las protege de células inmunes (96, 97, 98). También las mutaciones de BAP1 alterarían la polaridad celular y uniones intercelulares, debido al control que ejerce en la accesibilidad de factores de transcripción a genes del citoesqueleto (mediante remodelación de cromatina), induciendo un fenotipo maligno (99). Por otro lado, el hallazgo reciente de que la pérdida de BAP1 conduce a diferenciación defectuosa y el detenimiento en un fenotipo primitivo en el desarrollo de vertebrados y melanoma uveal, sugiere que la pérdida de BAP1 puede promover la progresión tumoral a través de la inducción de la desdiferenciación celular y comportamiento *stem cell-like* (100).

Las mutaciones heterocigotas de línea germinal en BAP1 causan una condición hereditaria de transmisión autosómica dominante, conocida como síndrome hereditario de predisposición al cáncer BAP1, probablemente subestimado en frecuencia (101). Los individuos portadores de estas mutaciones desarrollan múltiples cánceres durante su vida, con presentación a edades tempranas, con una penetrancia de al menos 85%, que puede alcanzar 100% a medida que envejecen. Esta condición confiere alta susceptibilidad para el desarrollo principalmente de mesotelioma (101), melanoma uveal (103) y con menor frecuencia melanoma cutáneo (104) y carcinoma renal de células claras (105), que son los cánceres nucleares de este síndrome. La mayoría de las mutaciones son de truncamiento (delecciones grandes), y los carcinomas basocelulares y mamarios, que también son frecuentes, probablemente se sumarán a la lista de “cánceres nucleares” con la acumulación de evidencia (105, 106). Otros cánceres de menor frecuencia en este síndrome son meningioma (107), colangiocarcinoma (107), adenocarcinoma pulmonar, carcinomas basocelulares y epidermoides, entre otros (108, 109). Los melanomas cutáneos usualmente ocurren en el contexto de un paciente con melanoma uveal (104). Los tumores resultan de la pérdida de heterocigosidad, tanto por una segunda mutación o delección, o modificación epigenética. El descubrimiento de este síndrome hereditario fue gracias a Carbone y col que estudiaron la población de

tres localidades remotas de Cappadocia, Turquía, en las cuales el 50% de los habitantes murió de mesotelioma (110), observando que la susceptibilidad a este tumor se transmitía con herencia mendeliana a través de múltiples generaciones (110). En Cappadocia, la población estuvo expuesta a erionita (111), una fibra mineral carcinogénica similar a los asbestos. Sin embargo, no todas las familias expuestas desarrollaron mesotelioma (110, 112), por lo que concluyeron que se producía en familias genéticamente predispuestas, debido a la interacción gen-ambiente. También estudiaron familias de Estados Unidos, “L” de Louisiana y “W” de Wisconsin, con alta frecuencia de mesotelioma entre sus miembros, no expuestos a erionita ni asbestos salvo algunos miembros de la familia L (113), y descubrieron que los individuos afectados con mesotelioma, melanoma uveal y cáncer de mama en ambas familias, albergaban mutaciones con deleciones de BAP1, estudiadas con hibridación genómica comparada y secuenciación de Sanger. Nombraron a esta condición “síndrome de cáncer BAP1” (114). Paralelamente, Wiesner y col observaron que las mutaciones de BAP1 se relacionaban con tumores melanocíticos benignos, desarrollados a una edad temprana, inicialmente identificados como tumores de Spitz atípicos (115). Estudios posteriores revelaron que estos tumores tienen características histológicas y moleculares únicas, distintas a los tumores de Spitz y otras lesiones melanocíticas, por lo cual fueron llamadas MBAITs o tumores melanocíticos spitzoides atípicos. Actualmente, la detección de estos tumores permite a los dermatólogos identificar portadores potenciales de mutaciones de BAP1 de línea germinal, con confirmación posterior por secuenciación de ADN (116,117). Cuando se publicaron estos estudios independientes (111, 113), los autores observaron que varios individuos de las familias con mesotelioma tenían MBAITs, y viceversa: aquellas familias que tenían estos tumores cutáneos detectados en consulta dermatológica, presentaban alta frecuencia de mesoteliomas. Los MBAITs son considerados un marcador cutáneo de la enfermedad (114), ya que son los tumores con mayor penetrancia y edad más temprana de presentación. Con frecuencia son múltiples, con forma de papulonodular y tienen un fenotipo histopatológico característico, bifásico, con un componente nodular intradérmico expansivo constituido por melanocitos epiteloideos (spitzoides), combinado con células de nevus convencional adyacentes, más pequeñas. También se los ha denominado tumores

melanocíticos spitzoides o epiteloides con BAP1 inactivado, nevus clonal, nevus de Wiesner o BAPoma (33, 115). La evaluación de su presencia puede utilizarse como método de *screening* para el síndrome de cáncer BAP1, sobre todo en los siguientes escenarios: 1-individuos con historia familiar de melanoma o cáncer pancreático (≥ 3 casos en un lado de la familia); 2-individuos con múltiples (≥ 3) melanomas primarios, incluyendo 1 antes de los 45 años; 3- ≥ 1 MBAIT e historia familiar de mesotelioma, meningioma y/o melanoma uveal; y 4- ≥ 2 MBAITs (20, 119). Posteriormente se describieron MBAITs con presentación esporádica, solitarios, con histopatología similar a los hereditarios y con inactivación de BAP1 en los melanocitos epiteloides (120, 121, 122). La reciente clasificación de tumores WHO 2018, incorpora estas neoplasias en la vía del bajo daño solar acumulado, compartiendo con melanoma extensivo superficial la alta frecuencia de mutación BRAF^{V600E} (33,120). Las características citológicas epiteloides asemejan las de los nevus de Spitz, de allí la denominación de spitzoides, pero carecen de elementos característicos de éstos, como hiperplasia epidérmica, hendiduras de la unión y cuerpos de Kamino. Además, tienen histoarquitectura diferente, de tipo papulonodular, y carecen del perfil genético característico de la vía de Spitz. En relación a la citomorfología epiteloide, también existen evidencias in vitro e in vivo que la pérdida de BAP1 está íntimamente ligada al desarrollo de la misma en neoplasias malignas (103, 123), habiéndose observado que esta morfología en melanoma uveal es un indicador de mal pronóstico (33). Por otro lado, la deficiencia de BAP1 no es exclusiva de células epiteloides, y fue reportada recientemente en melanoma originado en nevus azul (124).

Las mutaciones somáticas de BAP1 se encuentran en 45% de melanomas uveales (103), 60-70% de mesoteliomas (mayor frecuencia en el tipo epiteloide) (70, 125) y 15% de carcinomas renales de células claras (126, 127), que son los cánceres más frecuentes del síndrome de cáncer BAP1 (70). También se encuentran en otros cánceres con menor frecuencia: 13% de carcinomas tímicos (128), 7-32% de colangiocarcinomas (129, 130), 4% de carcinomas basocelulares (90), entre otros. Las mutaciones somáticas inactivadoras de BAP1 han sido reportadas en 5 a 6% de los melanomas cutáneos esporádicos (115). Varios grupos estudiaron la expresión nuclear de BAP1 en este tumor:

Murali y col (131, 132) que encontraron negatividad en 5,6% de 135 casos, Piris y col (116) en 2,5% de 40 casos, y una serie pequeña reciente de Aung y col (133) reportó 4 casos esporádicos con negatividad nuclear por inmunohistoquímica, confirmada con FISH.

1.6. BAP1: rol diagnóstico y pronóstico en cáncer.

La inmunohistoquímica de BAP1, además de ser importante en el diagnóstico de los MBAITs, se utiliza con fines diagnósticos en mesotelioma (134). Por un lado, para diferenciarlo de lesiones benignas (hiperplasia mesotelial atípica, cambios reactivos por pleuritis crónica y derrames pleurales), y de carcinomas pulmonares metastásicos en pleura, que muestran tinción nuclear positiva, y también ayuda a definir, cuando existe invasión en mesotelioma, si las células fusadas son benignas (miofibroblastos) o malignas, en el caso del mesotelioma bifásico, que tiene elementos epiteloides y fusados (134). La interpretación óptima de la inmunohistoquímica de BAP1 es crítica para los fines utilizados, y confusa en la experiencia de Carbone y col, que revisaron sus características (70). En mesotelioma observaron que la inmunotinción es nuclear y citoplasmática en células estromales y tumorales con BAP1 *wild type* (Figura 3). La ausencia de expresión nuclear de BAP1 detectada por inmunohistoquímica tiene excelente correlación con la inactivación bialélica del gen (70, 115), ya que la mayoría de las mutaciones resultan en proteína truncada que se degrada rápidamente o carece de la señal de localización nuclear, siendo un método confiable, rápido, costo-efectivo, sensible y específico, lo que permite realizar tamizaje en casos sospechosos de síndrome familiar (115). Incluso puede ser más sensible que la secuenciación al detectar alteraciones que son resultado de otros mecanismos distintos a las variaciones de la secuencia del ADN (70). En cambio, la tinción nuclear positiva es evidencia de BAP1 *wild-type* (135), y notablemente se encuentra en células no tumorales (estromales, inflamatorias, etc) de pacientes portadores de mutaciones de línea germinal de BAP1, porque el alelo *wild-type* produce proteína normal. Por lo tanto, la inmunohistoquímica de BAP1, que no es un estudio cuantitativo, no ayuda a identificar estos pacientes. En cuanto a la tinción del citoplasma, Carbone y col reconocen dos escenarios posibles. En la mayoría de las células sin tinción

nuclear, no hay tinción en citoplasma (Figura 3, C y D), y a veces, una proteína BAP1 mutada, presente pero biológicamente inactiva, con incapacidad de trasladarse al núcleo, se puede acumular en citoplasma donde forma amiloide (70), y produce tinción citoplasmática sin tinción nuclear acompañante (Figura 3, E y F). La pérdida de función de BAP1 no siempre equivale a pérdida de expresión nuclear, ya que puede ser resultado de una proteína con dominio funcional perdido, pero con retención de su capacidad de localización nuclear (136). Por ejemplo, en carcinoma renal, se observó que de 150 casos con expresión nuclear positiva de BAP1, 148 mostraron BAP1 wild-type por secuenciación de ADN. Los dos casos con BAP1 con expresión nuclear positiva tenían mutación *missense* en el dominio catalítico (126).

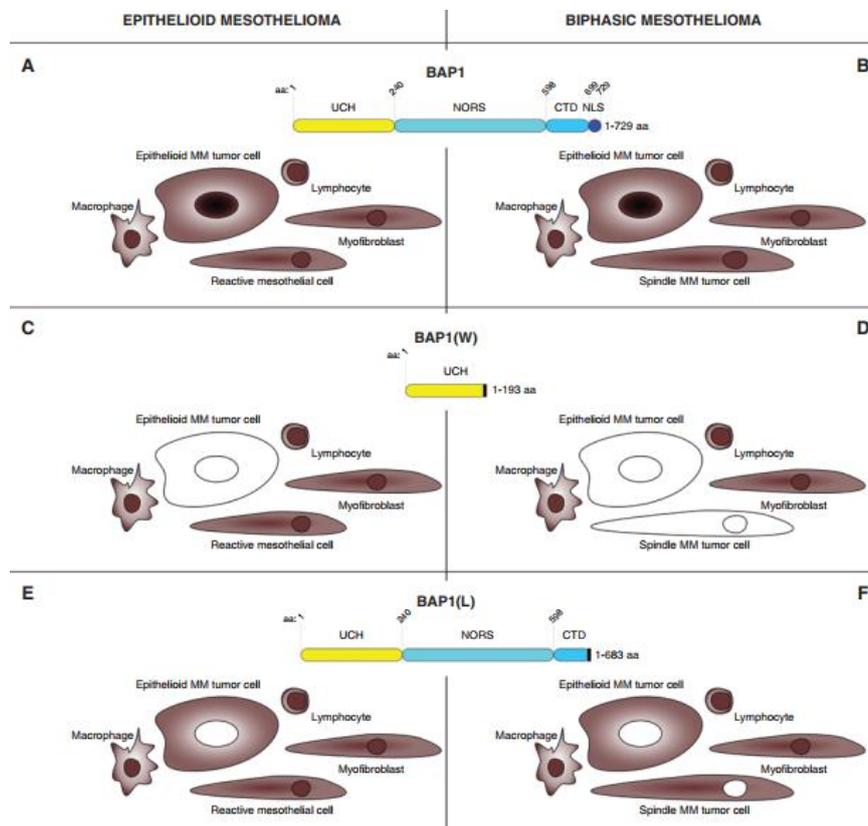


Figura 3: representación esquemática de IHQ de BAP1 en mesotelioma, epiteloide y bifásico. A y B: BAP1 wild-type, con tinción nuclear y citoplasmática de células normales y tumorales. C y D: BAP1 mutado con delección grande, en familia W, con ausencia completa de tinción en células tumorales. E y F: BAP1 con otro tipo de mutación menos extensa, de familia L, con ausencia de tinción nuclear en células tumorales. Extraído de Carbone, M., Harbour, J. W., Brugarolas, J., Bononi, A., Pagano, I., Dey, A., ... & Gaudino, G. (2020). Biological mechanisms and clinical significance of BAP1 mutations in human cancer. *Cancer discovery*, 10(8), 1103-1120.

Aunque la inactivación de BAP1 se ha reportado en un amplio espectro de cánceres, su rol pronóstico aún presenta resultados no concluyentes en muchos

de ellos. En cuanto al significado pronóstico de las mutaciones de línea germinal, el mesotelioma es menos agresivo en el contexto del síndrome familiar de predisposición al cáncer BAP1. Las mutaciones germinales de BAP1 tienen en este caso un significado pronóstico validado, incrementando la supervivencia a 5 años 7 veces, comparado con el que posee BAP1 *wild-type* (137). Se especula que el microambiente tumoral con niveles reducidos de esta proteína sería más efectivo en controlar el crecimiento tumoral, y es un área de intensa investigación, ya que esto puede ayudar a encontrar nuevas formas de combatir el cáncer. En contraste, las mutaciones germinales de BAP1 se asocian con peor pronóstico e incremento del riesgo de metástasis en melanoma uveal (138). Con respecto al carcinoma renal, no es claro si las mutaciones germinales se asocian con mejor pronóstico.

Con respecto al significado pronóstico de las mutaciones de BAP1 en las neoplasias esporádicas, los mesoteliomas con mutaciones somáticas adquiridas de BAP1 pueden tener un pronóstico relativamente mejor comparado a los que presentan BAP1 *wild-type* (139-143), sin embargo, algunos estudios no apoyan este hallazgo (144). Contrariamente, las mutaciones inactivadoras de BAP1 se asocian con un resultado desfavorable con mayor riesgo de metástasis en melanoma uveal (145-149), carcinoma renal de células claras (150, 151), con escasa evidencia opuesta (152), y colangiocarcinoma (153,154). En este último, otros autores reportaron correlación con mejor pronóstico o ausencia de relación con parámetros adversos (155, 156). En un metanálisis reciente, se encontró que la inactivación bialélica de BAP1 se asoció a mayor grado tumoral en carcinoma colorrectal y renal, y a sexo femenino ($p < 0,0001$) (140). Con respecto al melanoma cutáneo esporádico, el estudio piloto de Murali y col (131) sobre 158 melanomas cutáneos primarios esporádicos encontró correlación entre inactivación de BAP1, variante desmoplásica y peor pronóstico (menor supervivencia libre de enfermedad). Contrariamente, algunos autores señalaron un posible rol favorecedor de la oncogénesis, por ejemplo, Kumar y col (157) observaron que la depleción genética de BAP1 en células de melanoma reduce la proliferación, induce apoptosis e inhibe el crecimiento tumoral, con disminución de los niveles de survivina. Otro trabajo reciente señaló asociación entre menores niveles de ARNm de BAP1 y mejor pronóstico en melanoma cutáneo, en oposición al

melanoma uveal (158). Por otra parte, se ha encontrado que el factor de transcripción KLF5, que es altamente expresado en cáncer de mama triple negativo (*basal-like*) y es promotor de la proliferación y crecimiento tumoral, es estabilizado mediante deubiquitinización por BAP1, y el *knockdown* de este último inhibe la tumorigenicidad y desarrollo de metástasis pulmonar (159). Por lo tanto, el rol específico de BAP1 en la patogénesis, significado clínico y pronóstico en varios cánceres, entre ellos el melanoma cutáneo esporádico, no ha sido completamente establecido.

Con respecto a la expresión de BAP1 citoplasmática, se ha descrito el transporte de esta molécula entre el citoplasma y el núcleo (160), y las líneas celulares derivadas de pacientes con mesotelioma, la proteína BAP1 mutante se asoció con el secuestro citoplásmico de la proteína debido a la pérdida de la señal de localización nuclear (161). Se ha observado, por inmunohistoquímica, la retención de la expresión citoplasmática en casos con expresión nuclear negativa, por ejemplo, en melanoma uveal, MBAITs y otras neoplasias (108, 113, 115). Por lo general, la misma es difusa o tipo fondo (*background*), pero se ha notado además un patrón peculiar de expresión perinuclear focal o *clumped perinuclear pattern* en 53% de MBAITs esporádicos negativos para BAP1 nuclear (162) y en melanomas uveales (163). Garfield y col (164) también observaron dicho patrón en 59 casos de un total de 102 MBAITs (58%), que presentaban citomorfología rabdoide. Se hipotetizó que dicha localización puede ser resultado de una mutación que impide un correcto procesamiento o transporte de la proteína, quedando atrapada en el aparato de Golgi, asociándose a mutaciones con pérdida de función en comparación con melanomas con BAP1 citoplasmático difuso, y sin evidencia de que afecte significativamente la supervivencia global (163). Zhang y col (165) encontraron que la alta expresión de BAP1 citoplasmático en los gliomas se asoció significativamente con una peor supervivencia general, aunque no se mencionó ninguna localización subcelular específica en este estudio. De Rienzo y col (166) observaron recientemente cuatro patrones de tinción de BAP1 en mesotelioma pleural: solo nuclear (36%), solo citoplasmático (25%), ausencia de tinción (12%) y combinaciones (27%). La primera se asoció a alelos *wild-type* y patrón sarcomatoide, y el patrón sólo citoplasmático no se asoció con mutaciones en dominios específicos, pero sí con

morfología epitelioide, marcadores de transición epitelio-mesenchimal y mejor pronóstico. Estos autores no hicieron referencia al patrón citoplasmático perinuclear focal de BAP1. Con respecto a este último, se ha sugerido que el mecanismo para la observación de BAP1 perinuclear focal puede deberse a mutaciones en el dominio catalítico de la proteína, que exponen las regiones hidrófobas, desestabilizan su estructura y conducen a la formación de agregados beta amiloides (Figura 4), apoyado en la reactividad del anticuerpo específico de oligómero (A11) que demostró que las proteínas BAP1 mutantes forman agregados prefibrilares (167). El secuestro citoplasmático o localización perinuclear como consecuencia de la agregación de proteínas es un fenómeno conocido y se observa también en el supresor tumoral p53 (168). Las proteínas p53 mutantes no sólo se agregan a sí mismas, sino que también inducen la agregación de la proteína de tipo salvaje (169). Estos agregados inducen citotoxicidad, que es contraria a su función supresora de tumores. La ganancia de función tóxica es importante en el caso de las enfermedades amiloides y ahora se considera que el cáncer puede ser una enfermedad relacionada al mismo. La muerte de células neoplásicas puede liberar estos agregados causando quimiorresistencia o transmitirse de manera similar a priones (170), y recientemente ha surgido la hipótesis de priones en el cáncer (171).

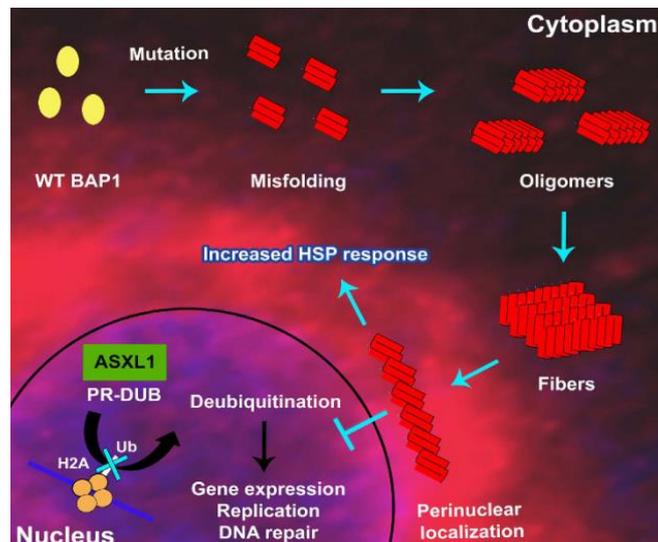


Figura 4: Modelo esquemático de representación de mutación de BAP1 y su efecto en la pérdida funcional. Las conformaciones nativas y mutantes de BAP1 se representan de amarillo y rojo respectivamente. BAP1 mutante forma oligómeros estables para inducir formación fibrilar. La agregación de BAP1 inhibe la localización nuclear, que previene la formación del complejo PR-DUB y la deubiquitinación subsecuente de la histona H2A. Extraído de Bhattacharya, S., Hanpude, P., & Maiti, T. K. (2015). Cancer associated missense mutations in BAP1 catalytic domain induce amyloidogenic aggregation: a new insight in enzymatic inactivation. *Scientific reports*, 5(1), 1-14.

1.7.BAP1: potencial rol predictivo para terapias existentes y en desarrollo

Aquellos tumores en estadios avanzados resistentes a regímenes terapéuticos actuales podrían beneficiarse de nuevas terapias que exploren efectos dirigidos hacia mutaciones de BAP1 o utilicen su *status* mutacional como un biomarcador de sensibilidad a diferentes terapias (rol predictivo). Por ejemplo, dos estudios recientes demostraron mayor sensibilidad de células de mesotelioma con BAP1 *wild-type* a gemcitabina, droga que se incorpora al ADN y causa freno de la replicación y apoptosis (172,173). El *status* de BAP1 puede también predecir sensibilidad a otros agentes quimioterápicos que causan daño en el ADN y muerte celular. Recientemente, Webster y col demostraron que la pérdida de Bap1 cooperó con el driver oncogénico BRAF^{V600E} en el desarrollo de melanoma en modelos murinos, y los ratones con tumores deficientes en Bap1 tuvieron una respuesta completa al tratamiento combinado con vemurafenib (inhibidor de BRAF) y cobimetinib (inhibidor de MEK). Esta terapia combinada es el *standard of care* del melanoma humano con mutación BRAF^{V600E} (174), y la determinación del *status* de BAP1 podría en estos casos ayudar a identificar los pacientes que tengan más probabilidad de responder a este régimen terapéutico. En carcinoma renal metastásico, la mutación de BAP1 no se correlacionó con beneficio clínico bajo terapia de rapalog (175), a pesar de la mayor agresividad del carcinoma renal portador de esta mutación (176). Los cánceres con inactivación de BAP1 también podrían ser potenciales respondedores de otras terapias. Por ejemplo, su pérdida deriva en alteración del mecanismo de reparación de ADN dañado, confiriendo inestabilidad genómica y sensibilidad a agentes inhibidores de PARP, como olaparib (93). PARP es una enzima asociada a la cromatina, involucrada en la reparación del ADN dañado. La pérdida de BAP1 puede sensibilizar las células de carcinoma renal y mesotelioma a estos inhibidores (177,178). Por otra parte, las histonas deacetilasas (HDAC) son reguladores epigenéticos alterados en cáncer, y se ha observado incremento de las mismas posterior a la pérdida de BAP1 (179), lo que podría sensibilizar los tumores a inhibidores de HDAC, como SAHA o vorinostat (64,70). Estos últimos pueden revertir la dediferenciación asociada con la pérdida de BAP1 e inducir la salida del ciclo celular en células de melanoma uveal (180). También se ha observado una relación entre BAP1 y el

microambiente inflamatorio tumoral en carcinoma renal, encontrándose que el subtipo inflamado se asocia a mutaciones de BAP1, y el subtipo no inflamado a mayor angiogénesis (181). Similarmente, en nevos y melanocitomas pertenecientes a la categoría de MBAITs se ha descrito presencia de infiltrado linfocitario intenso de tipo *brisk*, intratumoral (25, 33). De forma contraria, la pérdida de BAP1 se asocia con un microambiente tumoral inmunosupresivo en melanoma uveal (182). Estos hallazgos pueden ayudar a identificar pacientes que respondan a terapias inhibitoras de checkpoints inmunes (inmunoterapia), como pembrolizumab (bloqueador de PD1), y de angiogénesis (183). Por otra parte, las enzimas DUB, entre las cuales se encuentra BAP1, se han propuesto como una diana atractiva para el tratamiento del cáncer y otras enfermedades, porque tienen la capacidad de modular el destino de las proteínas de una manera específica y selectiva, por ejemplo, dirigiendo la célula hacia la recuperación o la muerte. Aquellas que deubiquitinizan las proteínas oncogénicas, evitando su degradación en el proteasoma, pueden servir de blanco para compuestos que inhiban su actividad, mientras que contrariamente las que deubiquitinizan proteínas supresoras tumorales podrían estimularse. Este enfoque para atacar el cáncer podría contrarrestar los problemas inevitables que se enfrentan en las terapias oncológicas dirigidas, como la resistencia a los medicamentos y la recurrencia de la enfermedad (184). Empresas como Progenra® están investigando actualmente el resultado de seleccionar estas DUB en combinación con terapias convencionales contra el cáncer (185,186).

Las evidencias expuestas son contradictorias y sugieren que el rol de BAP1 en la progresión neoplásica puede ser más complejo que la clásica función supresora de tumores que se le atribuye. Entender los efectos de las distintas mutaciones y su correlación con el fenotipo celular y molecular será de ayuda para comprender la biología tumoral y el desarrollo terapéutico para combatir el cáncer en general. Además, el uso de inmunohistoquímica como herramienta rápida y costo-efectiva para el estudio de BAP1 podrá ser relevante en su validación como potencial biomarcador pronóstico y predictivo, para estratificación de pacientes en grupos de riesgo y planificación de decisiones terapéuticas, en neoplasias altamente agresivas como el melanoma cutáneo.

1.8.Hipótesis y objetivos

Por lo expuesto, se plantearon la siguiente hipótesis y objetivos.

1.8.1.Hipótesis

El patrón citoplasmático perinuclear focal y la baja expresión nuclear de proteína BAP1 en melanoma cutáneo se asocian a parámetros histopatológicos adversos e índice proliferativo elevado.

1.8.2.Objetivos

1.8.2.1.General

Caracterizar la expresión de BAP1 en melanoma cutáneo y estudiar su asociación con parámetros clínicos, histopatológicos e índice de proliferación celular.

1.8.2.2.Específicos:

- Describir variables clínico-patológicas e histopatológicas en la muestra en estudio.
- Determinar el índice de proliferación celular (porcentaje de expresión del antígeno Ki-67).
- Caracterizar la expresión de BAP1 por inmunohistoquímica tanto a nivel nuclear como citoplasmático.
- Describir las variantes o tipos de melanoma cutáneo en relación a variables clinicopatológicas, histopatológicas y de inmunohistoquímica, estableciendo comparaciones.
- Determinar la correlación entre la expresión de BAP1 nuclear, índice de proliferación celular, espesor de Breslow e índice mitótico.
- Estudiar la relación entre los patrones de expresión de BAP1 nuclear (bajo y alto) y citoplasmático (difuso y perinuclear focal) y variables clinicopatológicas, histopatológicas y nivel de expresión de Ki-67 (bajo y alto).

CAPÍTULO II - MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño del estudio

El presente trabajo fue realizado en el servicio de Patología del Hospital Nacional de Clínicas, perteneciente a la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba. El mismo se planteó como un estudio de tipo observacional, descriptivo/analítico, retrospectivo y con alcance correlacional. La muestra estuvo constituida por biopsias de pacientes adultos hospitalarios con diagnóstico de melanoma cutáneo primario, del período comprendido entre enero de 1996 y diciembre de 2016. El tipo de muestreo fue no probabilístico, por conveniencia. Como criterios de inclusión se consideraron biopsias con diagnóstico de melanoma cutáneo, primarios, esporádicos, de las variantes clínico-patológicas principales (extensivo superficial, lentigo maligno, acrolentiginoso y nodular), pertenecientes a pacientes adultos (mayores de 21 años) atendidos en el Hospital Nacional de Clínicas de Córdoba. Se excluyeron del estudio a melanomas extracutáneos, melanomas primarios posteriores al inicial, melanomas metastásicos, variantes de baja frecuencia (nevoide, Spitz, originado en nevo penetrante profundo, originado en melanocitoma epiteloides pigmentado, desmoplásico, originado en nevo azul y originado en nevo congénito), melanomas sin clasificación y pacientes menores de 21 años.

2.2. Variables de estudio

Para facilitar su estudio, las variables fueron clasificadas en: 1-clínico-patológicas (relacionadas con el paciente y su epidemiología), 2-histopatológicas (evaluadas con microscopía óptica); y 3-inmunohistoquímicas. A continuación, se enumeran las mismas con sus respectivos criterios de definición y clasificación.

2.2.1. Variables clínico-patológicas

- **Edad:** en años (al momento del diagnóstico histopatológico). Categorización adicional en menor/igual o mayor de 60 años.
- **Género:** Varón, Mujer.
- **Sitio anatómico:** Cabeza y cuello, Tronco, Miembro superior y Miembro inferior (43).

- **Diámetro tumoral:** medido en centímetros (cm), en sentido lateral.
 - **Variante clínico-patológica de Clark:** los criterios diagnósticos pueden encontrarse en la Clasificación de tumores cutáneos WHO 2018 (33,34) y se mencionan a continuación (Figura 5). Categorización adicional en “Nodular” y “No nodular” (31).
1. **Extensivo superficial:** presencia de fase radial cuyo componente *in situ* tiene extensión intraepidérmica pagetoide de melanocitos atípicos.
 2. **Acrolentiginoso:** presencia de fase radial cuyo componente *in situ* presenta morfología lentiginosa (proliferación de melanocitos atípicos en hilera en capa basal) en epidermis acral (capa córnea gruesa y compacta).
 3. **Lentigo maligno:** presencia de fase radial cuyo componente *in situ* presenta morfología lentiginosa, en epidermis no acral (capa córnea en cesto).
 4. **Nodular:** ausencia fase radial y presencia de fase vertical con morfología nodular. Se admite un componente *in situ* suprayacente con extensión lateral ausente o limitada.

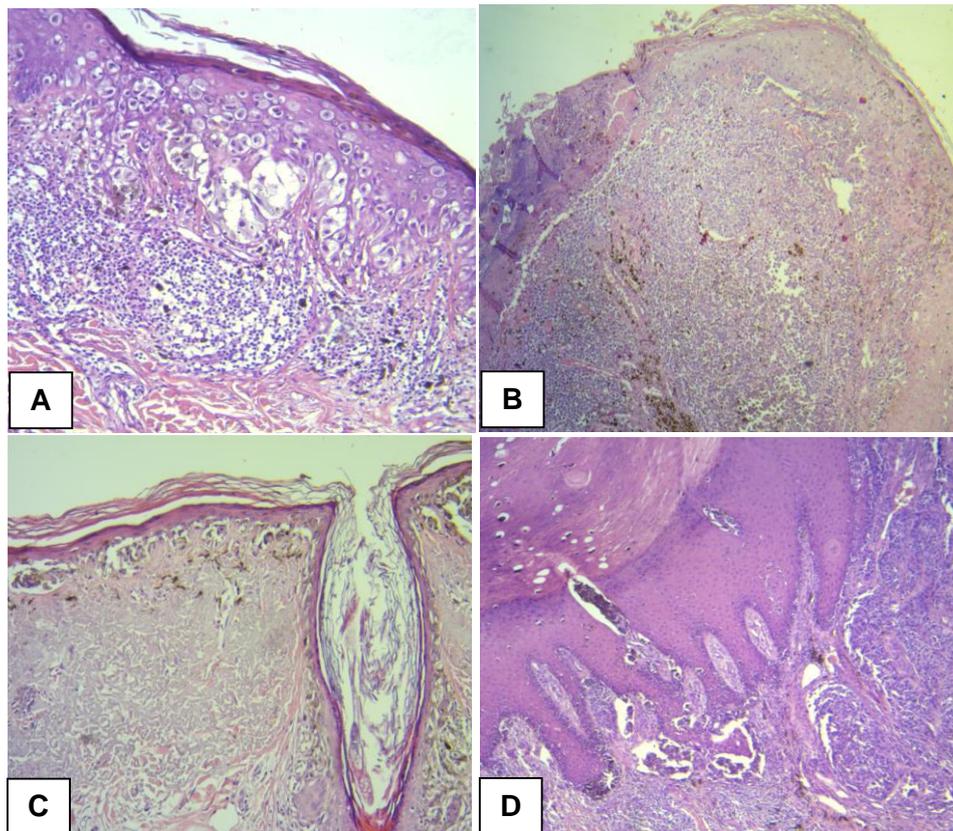


Figura 5: Variantes de melanoma cutáneo, A: Extensivo superficial, con extensión pagetoide de melanocitos atípicos, B: Nodular, con fase vertical pura, C: Lentigo maligno, con proliferación lentiginosa en capa basal de epidermis atrófica y D: Acrolentiginoso, con proliferación lentiginosa y en nidos en capa basal de epidermis acral (A: 100X H/E, B: 50X H/E, C: 50X H/E, D: 50X H/E. Magnificaciones originales). Casuística propia.

● **Diseminación tumoral (diagnóstico inicial):** debido a que ningún caso presentó metástasis a distancia al momento del diagnóstico inicial, siendo la ausencia de la misma uno de los criterios para indicar la resección quirúrgica de la lesión primaria, se estudió este parámetro según dos categorías, definidas como: Localizado (sin metástasis) o con metástasis regional. En esta última se consideraron la presencia de: 1-microsatélites (definidos en la sección siguiente: “variables histopatológicas”), 2-satélites (nódulos tumorales detectados macroscópicamente en la dermis, a menos de 2 cm del tumor primario) 3-metástasis en tránsito (nódulos tumorales macroscópicos a más de 2 cm del tumor primario) y 4-metástasis en ganglio linfático centinela o regional. Los microsatélites, satélites y metástasis ganglionar forman parte de la categoría “enfermedad metastásica no ganglionar” definiendo el estadio p-N1c en la 8ª edición del sistema de estadificación AJCC (44,45).

● **Remanente névico:** se consideró como tal a la presencia de focos residuales de nevo melanocítico, de tipo displásico o convencional, adyacentes a la lesión principal, hallazgo respaldado en la información clínica de desarrollo de melanoma sobre lesión névica preexistente.

● **Daño solar acumulado:** dependiente de la interrelación entre los hábitos de exposición solar y fototipo del paciente, y evaluado mediante la elastosis solar observada microscópicamente en la dermis adyacente al tumor, definida como presencia de fibras basófilas en el tejido conectivo, de grosor variable, y se divide en 3 grados de intensidad: 1 (leve): fibras basófilas separadas e intercaladas con haces de colágeno; 2 (moderada): fibras basófilas entrecruzadas y fusionadas, pero sin llegar a formar masas homogéneas; y 3 (severa): masas homogéneas de material basófilo (ausencia de fibras individuales). Los grados 0 (ausente) y 1 (leve) representan un daño solar acumulado “bajo” y los grados 2 (moderado) y 3 (severo) “alto” (33).

2.2.2. Variables histopatológicas

● **Fase de crecimiento (Radial/Vertical)**: La fase radial comprende melanocitos neoplásicos que crecen en sentido horizontal aislados o en nidos pequeños en ubicación intraepidérmica y pudiendo involucrar focalmente la dermis papilar (melanoma microinvasivo). La fase vertical se define por la presencia de un grupo de células en la dermis más grande que el grupo más grande en la epidermis, o de cualquier actividad mitótica en la dermis, consistente con una lesión cuyo foco de proliferación está cambiando completamente dentro de la epidermis hasta dentro de la dermis también (20).

● **Niveles anatómicos (Clark)**: I: Sólo tumor intraepidérmico (melanoma in situ); II: El tumor está presente en la dermis papilar pero no la llena ni la expande; III: El tumor llena y expande la dermis papilar; IV: El tumor invade la dermis reticular; V: El tumor invade la hipodermis. Categorización adicional en: niveles I-II-III y IV-V (20, 46).

● **Espesor del tumor primario (Breslow)**: Es el grosor máximo del tumor en escala de milímetros (mm). El punto de referencia superior es el borde superior de la capa granulosa de la epidermis suprayacente, y si la lesión está ulcerada en toda su extensión, la base de la úlcera. El punto de referencia inferior es el punto más profundo de invasión tumoral. Adicionalmente se categorizó esta variable en: menor o igual a 1 mm (delgado), mayor a 1 y hasta 4 mm (grosor intermedio), y más de 4 mm (grueso) (46, 50).

● **Ulceración**: defecto epidérmico de espesor total (incluida la ausencia de estrato córneo y membrana basal) con depósito de fibrina y neutrófilos; y adelgazamiento, borramiento o hiperplasia reactiva de la epidermis circundante en ausencia de traumatismo o un procedimiento quirúrgico reciente (46).

● **Índice mitótico**: número de mitosis por milímetro cuadrado de tejido tumoral (mitosis/mm²) (46).

● **Citomorfoloía**: forma de la célula tumoral: epiteloide (citoplasma amplio, poligonal o redondeado, anfófilo, con membrana citoplasmática definida, y núcleo vesiculoso con nucléolo prominente, excéntrico) (Figura 6) y no epiteloide (25, 115).

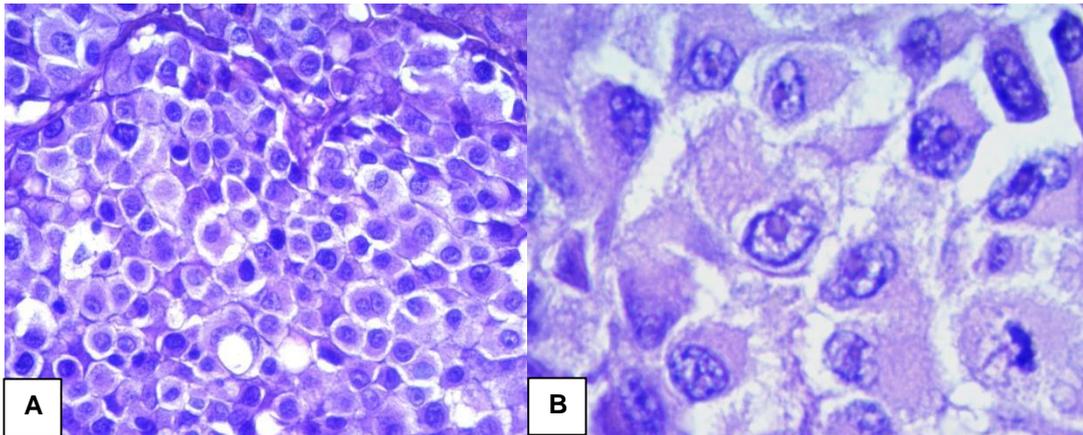


Figura 6: Citomorfología epiteloide, A: células tumorales de morfología epiteloide, dispuestas en patrón sólido con escaso estroma interpuesto; B: mayor detalle de las células epiteloides, con núcleos vesiculosos y nucléolos prominentes, citoplasmas acidófilos y bordes poligonales (A: 400X, B: 1000X, magnificaciones originales). Casuística propia.

- **Regresión tumoral:** reemplazo de células tumorales por inflamación linfocítica, atenuación de la epidermis y fibrosis dérmica no laminada con células inflamatorias, melanofagocitosis y telangiectasia (46, 56).

- **Invasión linfovascular:** presencia de células de melanoma dentro de la luz de los vasos sanguíneos o linfáticos, o ambos (46).

- **Neurotropismo:** presencia de células de melanoma contiguas a las vainas nerviosas, circunferencialmente (invasión perineural) o dentro de los nervios (invasión intraneural). Se identifica en la periferia del tumor (46).

- **Microsatélites:** masa microscópica de células tumorales adyacente o profunda a un melanoma primario y discontinua del mismo, no separada por cicatrización fibrosa y/o inflamación (esto puede representar una regresión tumoral) (46).

- **Infiltrado linfocitario tumoral:** los linfocitos deben rodear o infiltrarse entre las células tumorales del componente invasivo del tumor. Categorías: No identificado: no hay linfocitos presentes; No enérgico (No Brisk): los linfocitos se infiltran en el melanoma solo de manera focal o no rodeando toda la base del tumor invasivo; Enérgico (Brisk): los linfocitos se infiltran de manera difusa en toda la base del tumor invasivo o muestran una permeación difusa del tumor invasivo (46).

2.2.3. Variables de inmunohistoquímica

- **Índice de proliferación celular:** porcentaje (%) de núcleos tumorales con marca positiva para el antígeno Ki-67, con escala de 0 a 100%. Clasificación en categorías “baja expresión”: <20% y “alta expresión”: ≥20% (62).

- **BAP1 nuclear (BAP1n):** porcentaje (%) de núcleos tumorales con marca positiva para la proteína BAP1, con escala de 0 a 100%. Categorización en expresión “baja”: <33% y “alta” ≥33% (149).

- **BAP1 citoplasmático (BAP1c):** categorización en dos tipos de patrones: “predominantemente difuso” (tipo background) o “predominantemente perinuclear focal” (con forma de grumo o capuchón, adyacente al núcleo tumoral) según división propuesta en la literatura (163).

2.3. Técnicas e instrumentos de medición

Se enumeran a continuación los procedimientos y técnicas realizadas, incluyendo en cada sección la descripción de los instrumentos utilizados.

2.3.1. Recolección de datos

La búsqueda de los casos se realizó inicialmente en el software de PC “Diagnóstico” del Servicio de Patología, encontrando el listado total de casos de melanoma al cual se le aplicaron criterios de inclusión y exclusión, obteniendo los casos definitivos. A partir de sus números de protocolo, se obtuvieron del archivo del servicio, los tacos de parafina de muestras tumorales fijadas en formol 10% con procesamiento técnico de rutina. También se recolectaron los preparados histológicos con coloración de hematoxilina y eosina (H/E) y las fichas de estudio anatomopatológico, con los datos de filiación del paciente, edad, sexo, sitio de obtención de la muestra, antecedentes clínicos y sospechas diagnósticas, remitidas por los servicios de Dermatología y Cirugía del Hospital Nacional de Clínicas junto con las muestras de biopsia. Se efectuó revisión de los datos clínicos e histopatológicos consignados en los informes anatomopatológicos de cada caso.

2.3.2. Evaluación de preparados histológicos con microscopía óptica

Adicionalmente al registro de datos de interés de los informes de biopsia, se efectuó revisión de los preparados histológicos coloreados con H/E obtenidos de archivo de cada caso. Las siguientes variables histopatológicas de tipo cualitativas: fase de crecimiento, nivel de Clark, ulceración, regresión, infiltrado linfocitario, citomorfología, invasión vascular y perineural, se evaluaron mediante observación de los preparados con microscopio óptico trinocular PrimoStar Carl Zeiss ®. Las variables histopatológicas cuantitativas, se evaluaron según la siguiente metodología:

- Medición de espesor tumoral en milímetros (Breslow): Se midió con un micrómetro ocular calibrado 10:100 Carl Zeiss® en ángulo recto con la piel normal adyacente, en escala de milímetros (mm). El punto de referencia superior fue el borde superior de la capa granulosa de la epidermis de la piel suprayacente y en lesiones ulceradas, la base de la úlcera. El punto de referencia inferior fue el punto más profundo de invasión tumoral (46).

- Conteo de mitosis y asignación de tasa mitótica: Primero se buscaron las regiones tumorales con mayor cantidad de figuras mitóticas (“hot spot”). Luego se contaron las mitosis en un campo inicial de gran aumento (400X), y el recuento se extendió a los campos no superpuestos inmediatamente adyacentes hasta que se evaluó un área de tejido correspondiente a 1 mm². Cuando no se encontró ningún hot spot y las mitosis fueron escasas y/o dispersas al azar, se eligió una mitosis representativa y, comenzando con ese campo, el recuento se extendió a los campos inmediatamente adyacentes hasta cubrir 1 mm². El recuento se expresó como el número (entero) de mitosis/mm². Cuando el tumor involucraba un área menor de 1 mm², se registró el número de mitosis como si se encontraran dentro de un milímetro cuadrado. Para obtener una medición precisa de 1 milímetro cuadrado, se efectuó calibración del campo de gran aumento con micrómetro ocular para determinar el número de estos campos que equivale a un milímetro cuadrado, equivaliendo a 5 campos en microscopio trinocular Carl Zeiss ® (46).

2.3.4.Confección de micromatrices de tejido (*Tissue microarrays*)

Para la realización de la inmunohistoquímica, se confeccionaron micromatrices de tejido que permiten examinar varias secciones histológicas a la vez, obtenidas de un ensamblado en el que se toman “biopsias cilíndricas” de tejidos preexistentes incluidos en parafina (bloques donantes) e insertando las mismas en un bloque “receptor” de forma ordenada. Esta técnica tiene la ventaja de que todas las muestras se procesan a la vez utilizando condiciones idénticas. Además, reduce notablemente la cantidad de tejido de archivo necesario para un estudio en particular, preservando así una gran cantidad de tejido restante para otras necesidades de investigación o diagnóstico (187,188). Se confeccionaron 10 micromatrices, con 3 columnas (A, B y C) y 4 filas (n° 1 a 40), con una variación de la técnica convencional, como se describe a continuación:

1-Utilizando bisturí sacabocado (punch) de 6 mm se extrajeron muestras cilíndricas de tumor de los bloques de parafina donantes, seleccionando áreas tumorales representativas y libres de necrosis.

2-Se armaron bloques receptores utilizando plataforma de inclusión de tejidos, colocando parafina fundida a 65°C en moldes plásticos transparentes, sobre grillas dibujadas en papel milimetrado de tamaño coincidente y visibles debajo, con columnas y filas que indicaron el orden de colocación de los cilindros donantes.

3-Se introdujeron los cilindros donantes en los moldes receptores, según el orden establecido por las grillas correspondientes, dentro de la parafina fundida, mantenida en ese estado gracias a la temperatura estable de 65°C.

4-Se redujo la temperatura de la plataforma de inclusión por debajo del punto de fusión de la parafina, hasta que comenzó a solidificarse en la base de los moldes. Posteriormente, estos se retiraron de la plataforma y se dejaron solidificar completamente a temperatura ambiente. Finalmente, los bloques de microarrays resultantes se desmoldaron.

2.3.5.Realización de cortes coloreados con hematoxilina y eosina

Para controlar la calidad de los microarrays y verificar presencia de tumor viable y libre de necrosis, previo a realizar pruebas de inmunohistoquímica, se realizaron cortes coloreados con H/E, con los siguientes pasos: 1-Realización de

cortes de 3-5 micras con micrótomo y colocación en portaobjetos; 2-Desparafinización en xilol e hidratación en alcoholes de graduación decreciente, 1 minuto en cada paso (100° y 96°); 3-Coloración con hematoxilina durante 5 minutos; 4-Viraje en agua corriente durante 10 minutos; 5-Lavado en agua destilada; 6-Coloración con eosina 1 minuto; 7-Deshidratación en alcoholes de graduación creciente (96° y 100°); 8-Aclaración en xilol y montaje con cubreobjetos utilizando Bálsamo de Canadá.

2.3.6.Técnica de inmunohistoquímica

A partir de las micromatrices de tejido, se realizó técnica de inmunohistoquímica manual, siguiendo un protocolo utilizado en el servicio de Patología del HNC, basado en la literatura (189), con los siguientes pasos:

1-Realización de cortes: de 3 micras de espesor en portaobjetos con carga positiva. Se dejaron en estufa a 60°C durante una noche.

2-Desparafinación: en xilol a temperatura ambiente, en 4 cambios de 10 min cada uno. Posteriormente se hidrataron los cortes mediante pases en alcoholes de graduación decreciente (100° y 96°) y se colocaron en agua destilada.

3-Recuperación antigénica inducida por calor: se realizó en baño térmico a temperatura de 95°C, colocando los portaobjetos dentro de recipientes Coplin con buffer citrato (pH 6), por 45 min. Luego se sacaron y dejaron enfriar por 30 min.

4-Bloqueo de peroxidasa endógena: se agregó solución de peróxido de hidrógeno de 30 volúmenes, diluido al 10%, por 35 min sobre los cortes en cámara húmeda tapada. Luego se lavaron con buffer fosfato salino (PBS, 0,01 M, pH 7,4) durante 5 min.

5-Bloqueo de fondo: para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo primario a proteínas, se aplicó Background Block (Cell Marque®) por 10 min, en cámara húmeda tapada. Luego se lavaron con buffer PBS durante 5 min.

6-Aplicación de anticuerpos primarios: se secaron con cuidado los cortes, se les aplicaron los anticuerpos primarios previamente diluidos y se dejaron incubar durante una noche en cámara húmeda tapada. Posteriormente se lavaron con buffer PBS durante 5 min.

7-Aplicación del anticuerpo secundario biotinilado: se secaron los cortes y se aplicó sistema de detección CytoScan® HRP Link (Cell Marque®), dejando incubar durante 15 min con cámara húmeda tapada. Luego se lavaron con buffer PBS durante 5 min.

8-Aplicación de anticuerpo terciario estreptavidina-peroxidasa: Posteriormente se secaron los cortes y se aplicó sistema de detección CytoScan® HRP Label (Cell Marque®), dejando incubar durante 15 min con cámara húmeda tapada. Luego se lavaron con buffer PBS durante 5 min.

9-Aplicación de cromógeno: se secaron los cortes y se les aplicó solución de DAB y sustrato (DAB Kit Substrate, Cell Marque®), y se dejó actuar entre 5 a 7 min.

10-Contraste, deshidratación y montaje: posteriormente se colocaron los portaobjetos en agua destilada, y luego se colorearon con hematoxilina durante 30 s. Se realizó viraje en agua corriente a temperatura ambiente y luego se deshidrataron los cortes mediante pases por alcoholes de graduación creciente (96° y 100°). Por último, se realizaron pases por Xileno y se montaron los portaobjetos con bálsamo de Canadá y cubreobjetos.

2.3.6.1. Anticuerpos primarios utilizados y sus controles

Para BAP-1 se utilizó anticuerpo primario Anti-BAP1 (policlonal de conejo, Abcam®) con titulación hasta conseguir dilución final de 1/100 que mostró mejor relación señal/fondo de la marca positiva (rango de dilución recomendado: 1/40 y 1/200). Controles positivos (Figura 7): control externo seleccionado fue testículo (positividad en espermatozoides) y el interno fibroblastos y linfocitos, siendo la tinción aceptada: citoplasmática y nuclear (mayor intensidad de la nuclear). Para Ki-67 se utilizó anticuerpo primario anti-Ki-67 (monoclonal de conejo, Clon SP6, Cell Marque®), en dilución 1/100. El control positivo externo seleccionado fue adenocarcinoma de colon y el interno los núcleos de células basales epidérmicas, y la tinción aceptada la nuclear (Figura 8). Como controles negativos de ambas marcaciones se utilizaron los anteriormente mencionados, reemplazándose el anticuerpo primario por buffer PBS en la técnica de inmunohistoquímica (Figura 9).

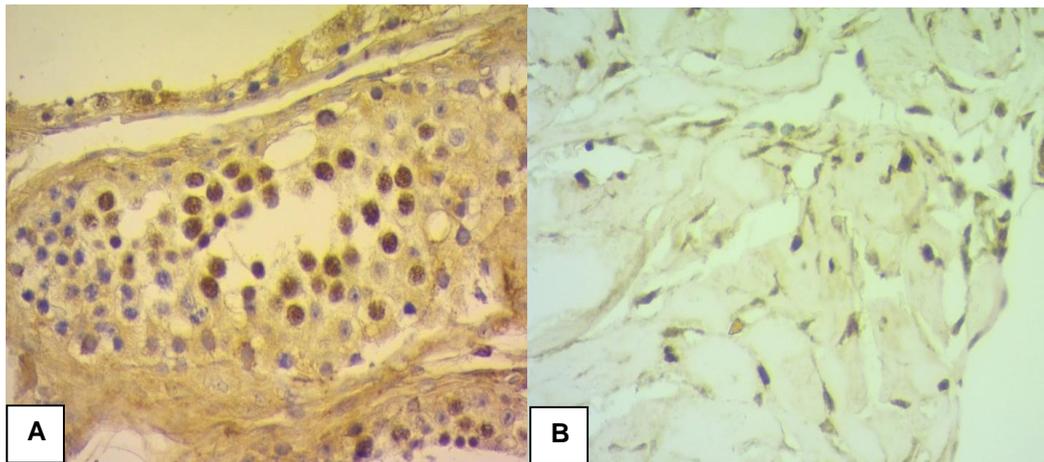


Figura 7: A: Control positivo externo de BAP1 (núcleos de espermatocitos teñidos de marrón); B: Control positivo interno de BAP1 (núcleos de fibroblastos teñidos de marrón) (400X, magnificación original). Casuística propia.

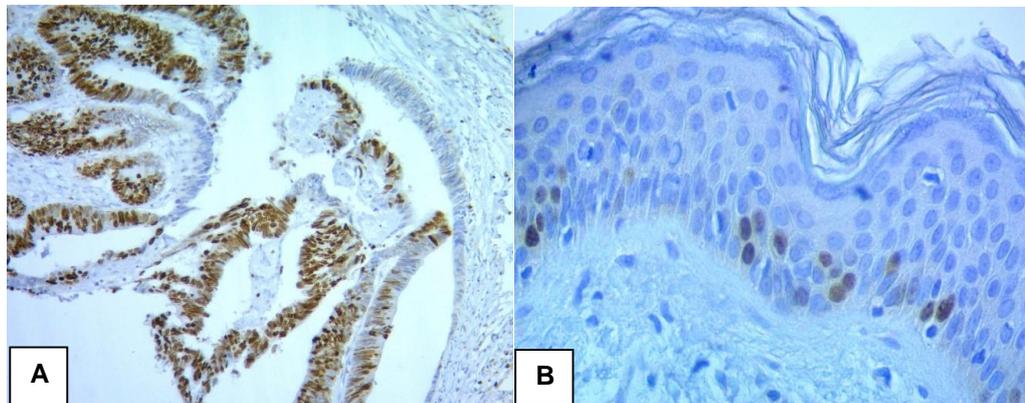


Figura 8: A: Control positivo externo de Ki-67 (núcleos celulares de adenocarcinoma de colon teñidos de marrón); B: Control positivo interno de Ki-67 (núcleos de células basales epidérmicas teñidos de marrón) (A: 100X, B: 400X, magnificaciones originales). Casuística propia.

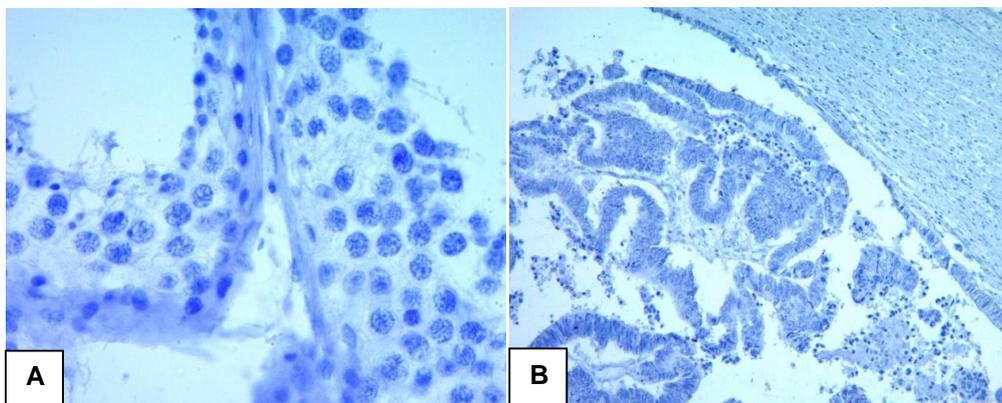


Figura 9: A: Control negativo de BAP1 (ausencia de tinción marrón en núcleos y citoplasmas de espermatocitos); B: Control negativo de Ki-67 (ausencia de tinción marrón en núcleos celulares de adenocarcinoma de colon) (A: 400X, B: 100X, magnificaciones originales). Casuística propia.

2.3.7. Técnica de blanqueamiento de melanina

Para poder evaluar en melanomas con moderada y abundante melanina, variables histopatológicas e inmunohistoquímicas, se utilizó una técnica de blanqueamiento de melanina, que consistió en someter a los cortes a peróxido de hidrógeno de 30 volúmenes, diluido en buffer PBS en relación 1:3, dentro de recipientes Coplin, durante 150 min a temperatura de 60°C (estufa). Para evaluar las variables histopatológicas, se elaboraron preparados histológicos coloreados con H/E con este proceso incorporado posteriormente al paso n° 2 (desparafinización e hidratación de cortes) y previamente al paso n° 3 (tinción con hematoxilina). Para evaluar las variables inmunohistoquímicas se realizó una modificación del protocolo basándose en trabajos previos (190,191), incorporando el proceso de blanqueamiento posterior al paso de recuperación antigénica inducida por calor (paso n° 3), omitiéndose, debido a su redundancia, el paso n° 4 (bloqueo de la peroxidasa endógena). El tejido de control positivo utilizado en el blanqueamiento fue de melanocitoma epiteloide pigmentado, tumor que característicamente presenta muy alto contenido de melanina (Figura 10). No se observó alteración de detalles citológicos ni histoarquitecturales, ni disminución de la antigenicidad tisular en comparación con la técnica de inmunohistoquímica sin paso de blanqueamiento, habiendo realizado previamente pruebas de esta técnica en tejidos de control con marcaciones de BAP1, Ki-67 y Melan-A.

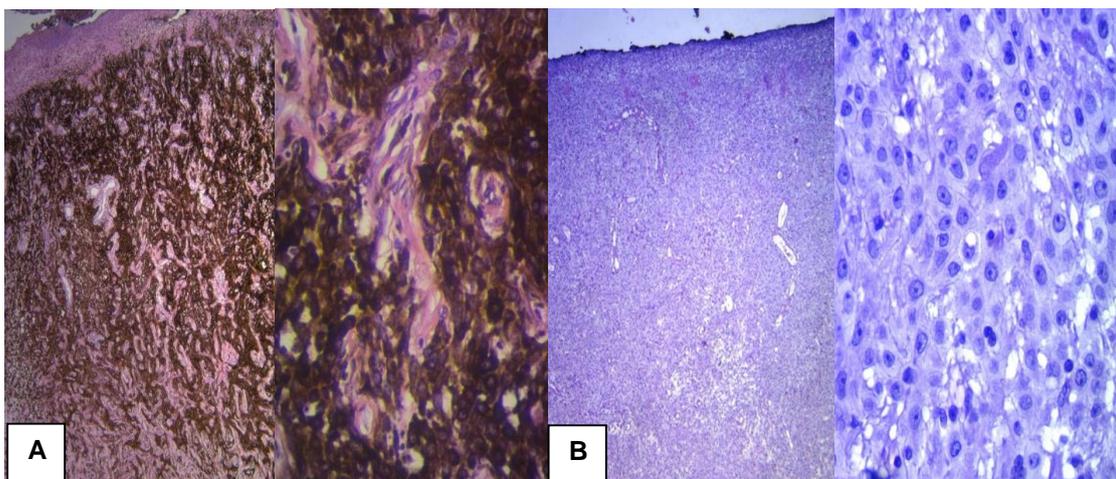


Figura 10: Técnica de blanqueamiento de melanina con peróxido de hidrógeno. A: tejido tumoral con abundante melanina, B: el mismo tumor al que se le aplicó blanqueamiento (50X a la izquierda y 100X a la derecha en cada microfotografía. Magnificaciones originales, H/E). Casuística propia.

2.3.8. Evaluación de variables de inmunohistoquímica

Las inmunomarcaciones fueron evaluadas en microfotografías digitales, que se tomaron de campos de gran aumento (400X) cubriendo toda la extensión de cada corte de tejido tumoral. Se utilizó cámara microfotográfica AxioCam ERc5s, conectada a microscopio trinocular Carl Zeiss®, y a PC por vía USB. Para la toma de fotografías se empleó la aplicación de captura digital de imágenes ZEN 2011 AxioVision y se realizó mejora de brillo y contraste de las mismas. Para establecer el índice de proliferación celular (% Ki-67) y el % de BAP1 nuclear, se empleó la aplicación de dominio público ImageJ, versión 1.53e, del National Institutes of Health (USA, 2015) (192), utilizando la herramienta “multi-point” que permite contar elementos realizando marcas numeradas. En las microfotografías de cada caso se marcaron con un color los núcleos tumorales teñidos de marrón (positivos para el antígeno), y con otro los núcleos tumorales azules (negativos), obteniendo la relación entre ambos y el porcentaje de núcleos positivos (Figura 11). La evaluación de los patrones citoplasmáticos de BAP1 se realizó de manera semicuantitativa. Las microfotografías fueron compartidas a dos médicos patólogos que las valoraron de forma independiente, desconociendo datos clínicos e histopatológicos de cada caso, para establecer el nivel de concordancia.

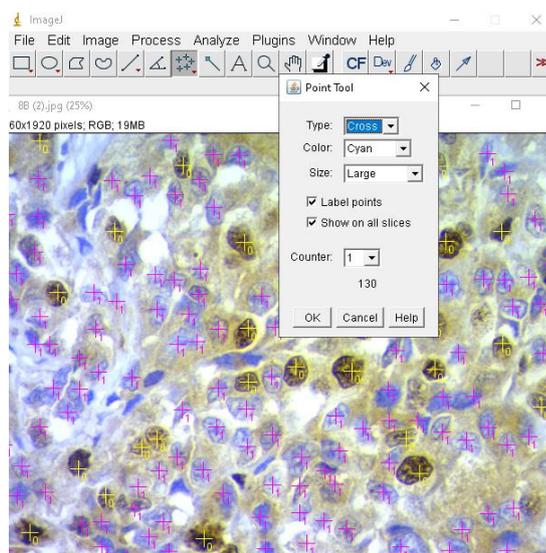


Figura 11: Herramienta “multi-point” de la aplicación ImageJ, para establecer porcentaje de marcación de BAP1 nuclear y Ki-67 en microfotografías digitales. Las marcas en amarillo (cruces) indican núcleos positivos para el antígeno, al contrario que las marcas en magenta. (microfotografía de 400X, magnificación original, Ki-67).

2.4. Análisis estadístico

Colaboró en esta sección la Dra. Laura Aballay, de la asignatura de estadística y bioestadística de la Escuela de Nutrición de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de Córdoba. El estudio se realizó en las siguientes etapas: descripción de la muestra, análisis de asociación y correlación entre variables y finalmente un análisis confirmatorio.

1-Estudio descriptivo: se analizó la distribución de frecuencias de las variables categóricas y se calcularon medidas resúmenes de posición y dispersión para variables continuas.

2-Análisis de asociación y correlación entre variables: se construyeron tablas de contingencia y se aplicaron las pruebas Chi-cuadrado Pearson y test exacto de Fischer para estudiar asociación entre variables categóricas de interés y establecer si las diferencias eran estadísticamente significativas. Se obtuvieron los coeficientes de correlación de Pearson entre variables continuas, y para comparar estas últimas entre los subtipos de melanoma, se estimaron diferencias de medias mediante prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

3-Análisis confirmatorio: para estudiar el efecto de las variables clínico-patológicas y patrones de BAP1 en relación a la probabilidad de presentar características predictivas de mal pronóstico, se construyeron modelos de regresión logística múltiple. Este tipo de análisis multivariado permite modelar la relación entre una variable respuesta binaria y variables regresoras de interés, analizándolas simultáneamente con variables de confusión o ajuste. A diferencia de los análisis univariados, permite estudiar si existe valor predictivo significativo independiente para cada variable regresora, calculando la razón de productos cruzados (*odd ratio*) y sus respectivos intervalos de confianza del 95%.

Variabilidad interobservador

Para evaluar el grado de concordancia entre dos observadores independientes (médicos patólogos), para las variables continuas índice de proliferación celular y porcentaje de marcación nuclear de BAP1, se aplicó test t para dos muestras, obteniendo valor de $p > 0,05$ (diferencias no significativas). Para las variables categóricas citomorfología y BAP1 citoplasmático se calculó

el estadístico Kappa de Cohen (κ), obteniendo valor de 0,9 (categoría de acuerdo “casi perfecto”).

2.5. Alcances y límites de la investigación

Alcances: En el melanoma, uno de los cánceres de mayor mortalidad, el estudio de nuevos biomarcadores tisulares pronósticos y predictivos es necesario para un manejo guiado del paciente y el desarrollo de nuevas terapias. La proteína BAP1 no tiene un valor pronóstico definido en el melanoma cutáneo esporádico y las evidencias son contradictorias. El presente estudio tiene alcance correlacional, aportando datos de asociación entre patrones de expresión de la proteína BAP1 en el melanoma cutáneo y parámetros predictivos de pronóstico adverso (clínicos, histopatológicos e índice de proliferación celular).

Limitaciones: Las limitaciones encontradas en el proceso de investigación fueron: historias clínicas incompletas o extraviadas, y trámites para obtención de las más antiguas (solicitud y traslado desde un archivo pasivo externo en ciudad de Alta Gracia, Córdoba) temporalmente suspendidos por la situación sanitaria de COVID19.

2.6. Consideraciones éticas

Con respecto a las consideraciones éticas, el presente trabajo de investigación, según lo certifica el Sistema de Evaluación, Registro y Fiscalización de las Investigaciones en Salud (S.E.R.F.I.S) de la provincia de Córdoba al momento de su presentación, se enmarca en el artículo 2° de la Ley provincial 9694, que establece que por no incluir intervenciones sobre la salud humana y no suponer riesgo para los individuos, no requiere evaluación ética y puede ser revisado por el comité académico de la institución en el que se desarrolla (Anexo: consideraciones éticas).

CAPÍTULO III - RESULTADOS

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados encontrados en las siguientes secciones: 3.1-Descripción de la muestra de estudio; 3.2-Análisis de asociación y correlación entre variables; 3.3-Análisis confirmatorio.

3.1.Descripción de la muestra de estudio

Aplicando los criterios de inclusión y exclusión mencionados se consiguió un n muestral de 116 melanomas cutáneos primarios.

1-VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

El 50,86% de los pacientes fueron hombres y el resto mujeres. El promedio de edad fue 59,57 años (D.E 16,46), con una edad mínima de 21 años y una máxima de 90 años. En cuanto a las localizaciones, predominó el tronco con 35%, seguido por miembro inferior (30%), cabeza y cuello (25%) y miembro superior (9%). El diámetro tumoral promedio fue de 1,46 cm (D.E. 0,96; Min 0,20, Máx 6,50). Las variantes clínico-patológicas más frecuentes fueron Extensivo superficial (46%) y nodular (26%) (Figura 12). Los casos se presentaron de forma localizada en 87% y con diseminación regional en 13%. Los melanomas se desarrollaron sobre nevus preexistente en 24% de casos. La distribución de frecuencias de variables clínico-patológicas se resume en la Tabla 2.

Distribución por género: en hombres la media de edad fue de 60 años (21-87), la localización predominante fue tronco (54%) y el diámetro tumoral promedio fue 1,41 cm (0,2-4,50 cm). En mujeres la media de edad fue de 59,12 años (21-90), la localización predominante fue miembro inferior (46%), y el diámetro promedio 1,52 cm (0,4-6,5 cm). En ambos sexos la variante más frecuente fue extensivo superficial (hombres 51% y mujeres 42%) y el daño solar acumulado fue predominantemente bajo (85% y 74%).

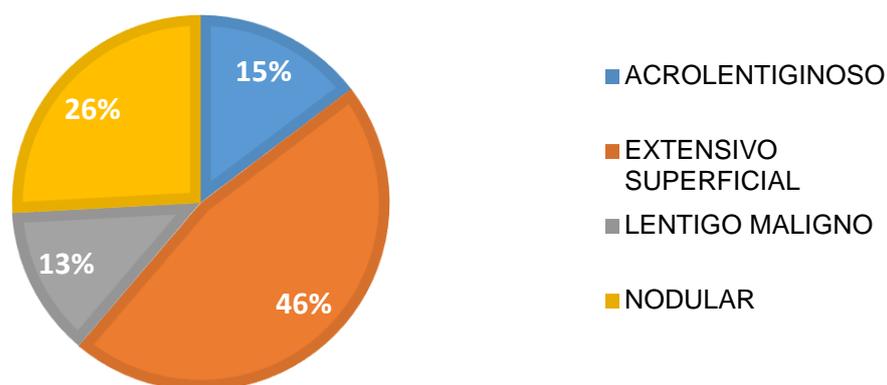


Figura 12: Distribución de frecuencias de variantes clínico-patológicas de melanoma, representada en gráfico circular.

Género, n (%)	
-Varón	59 (50,86%)
-Mujer	57 (49,14%)
Edad	
\bar{X} (DE), Mín-Máx	59,57 (16,46), 21-90
<60 n(%)	55 (47%)
≥60 n(%)	61 (53%)
Diámetro	
\bar{X} (DE), Mín-Máx	1,46 (0,96), 0,20-6,50
Región n (%)	
-Tronco	41 (35,34)
-Cabeza y cuello	29 (25%)
-Miembro inferior	35 (30,17%)
-Miembro superior	11 (9,48%)
Variante clinicopatológica n (%)	
-Extensivo superficial	54 (46,55%)
-Nodular	30 (25,86%)
-Acrolentiginoso	17 (14,66%)
-Lentigo maligno	15 (12,93%)
Estado de diseminación n (%)	
-Localizado	101 (87%)
-Diseminación regional	15 (13%)
Nevus preexistente n (%)	
-Presente	28 (24%)
-Ausente	88 (76%)
Daño solar acumulado n (%)	
-Alto	24 (20,69%)
-Bajo	92 (79,31%)

2-VARIABLES HISTOPATOLÓGICAS

La fase de crecimiento vertical se presentó en 72% de los casos. El espesor de Breslow promedio fue de 2,91 mm (DE 3,08, Mín 0, Máx 15). Treinta y ocho por ciento de casos tuvieron Breslow ≤ 1 mm, 37% $>1-4$ mm y 25% >4 mm. El nivel de Clark predominante fue IV (invasión hasta dermis reticular), en 59% de casos. Se observó ulceración en 37% de casos. El índice mitótico promedio fue de 4,76 mitosis/mm² (DE 5,18, Mín 0, Máx 25). Hubo regresión histológica en 27% de casos. El infiltrado linfocitario tumoral predominante fue *no brisk* (no enérgico) en 76%, y ningún caso tuvo infiltrado linfocitario ausente. La citomorfología fue no epiteloide en 64% de casos. Sólo se observó microsatelitosis e invasión vascular en 3% de casos, e infiltración perineural en 1%. El daño solar acumulado fue predominantemente bajo, en 79% de casos. La distribución de frecuencias de variables histopatológicas se resume en la Tabla 3.

Tabla 3: Variables histopatológicas (n=116)	
Fase de crecimiento n (%)	
-Radial	33 (28,45%)
-Vertical	83 (71,55%)
Espesor de Breslow (mm)	
\bar{X} (DE), Mín-Máx	2,91 (3,07), 0-15
≤ 1 mm, n (%)	44 (37,93%)
1-4 mm, n (%)	43 (37,07%)
>4 mm, n (%)	29 (25%)
Nivel de Clark n (%)	
I	10 (8,62%)
II	16 (13,79%)
III	9 (7,76%)
IV	62 (59,48%)
V	12 (10,34%)
Ulceración n (%)	
-Presente	43 (37,07%)
-Ausente	73 (62,93%)
Índice mitótico (mitosis/mm²)	
\bar{X} (DE), Mín, Máx	4,76 \pm (5,17), 0-25
Citomorfología n (%)	
-Epiteloide	42 (36,21%)

-No epiteloide	74 (63,79%)
Infiltrado linfocitario tumoral n (%)	
-No Brisk	88 (75,86%)
-Brisk	28 (24,14%)
Regresión histológica n (%)	
-Presente	31 (26,72%)
-Ausente	85 (73,28%)
Invasión vascular n (%)	
-Detectada	3 (3%)
-No detectada	113 (97%)
Invasión neural n (%)	
-Detectada	1 (0,86%)
-No detectada	115 (99,14%)

3-VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS

● **Índice de proliferación celular (% Ki-67):** El promedio fue de 20,73% (DE 11,79, Mín 3, Máx 76, Mediana 19), y la distribución según categorías fue la siguiente: Bajo (<20%): 63 (55%), Alto (\geq 20%): 52 (45%) (Tabla 4).

● **BAP1 nuclear (BAP1n):** El promedio fue de 38% (DE 34,28, Mín 0, Máx 100, Mediana 35). El 17% (20 casos) fue BAP1n negativo (porcentaje 0%). En la figura 13 se pueden apreciar dos casos con marcación de BAP1n de categoría “alta” (\geq 33%).

● **BAP1 citoplasmático (BAP1c):** se observó marcación citoplasmática en el 100% de los casos. En 81 casos (70%) se observó patrón “predominantemente difuso” (Figura 14) y 35 (30%) presentaron patrón “predominantemente perinuclear focal (Figura 15).

Tabla 4: Variables inmunohistoquímicas (n=116)	
Índice de proliferación celular (%Ki-67)	
\bar{X} (DE), Mín, Máx	20,73 (11,79), 3-76
<20%, n (%)	64 (55%)
\geq 20%, n (%)	52 (45%)
BAP1 nuclear (BAP1n)	
\bar{X} (DE), Mín, Máx	37,74 (34,28), 0-100
Expresión Baja (<33%) n (%)	55 (47,41%)
Expresión Alta (\geq 33%) n (%)	61 (52,59%)

BAP1n Presente <i>n</i> (%)	96 (82,76%)
BAP1n Ausente <i>n</i> (%)	20 (17,24%)
BAP1 citoplasmático (BAP1c) <i>n</i> (%)	
Patrón difuso	81 (69,83%)
Patrón perinuclear	35 (30,17%)
BAP1c Presente	116 (100%)
BAP1c Ausente	0 (0%)

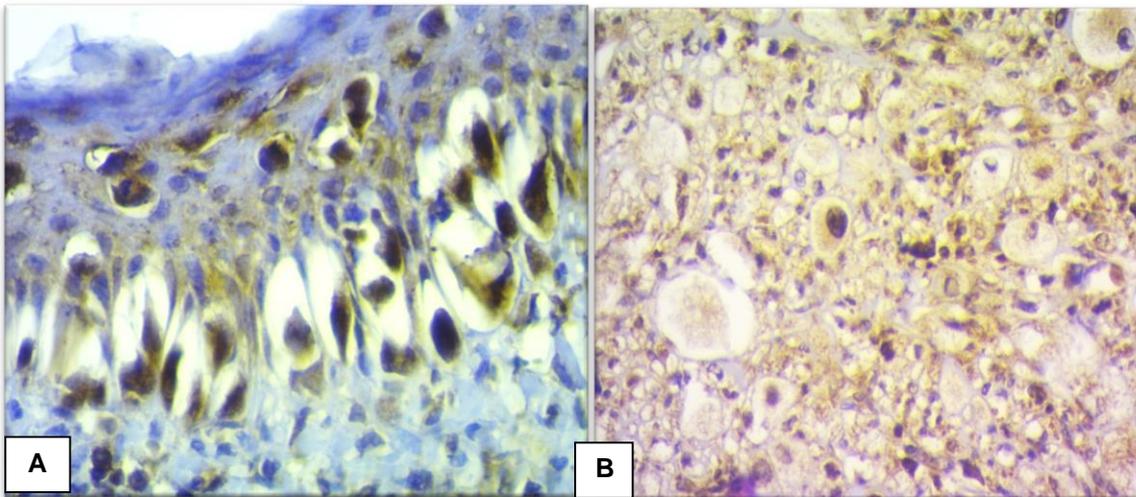


Figura 13: Expresión de BAP1n: alta (>33%): A: Fase radial correspondiente a variante extensiva superficial, observándose melanocitos atípicos in situ, con extensión pagetoide y expresión nuclear alta de BAP1, B: Fase vertical con células neoplásicas de melanoma de morfología globoide, dispuestas en dermis de manera difusa (A: 400X, B: 100X, magnificaciones originales).

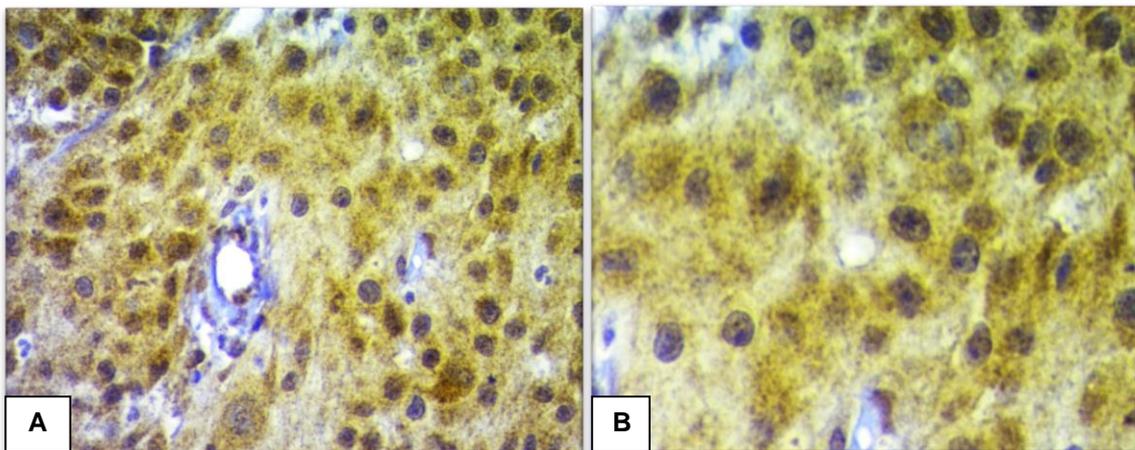


Figura 14: Expresión de BAP1c predominantemente difusa, con tinción de citoplasmas de células tumorales de color marrón claro, tipo fondo (A: 400X, B: 1000X, magnificaciones originales).

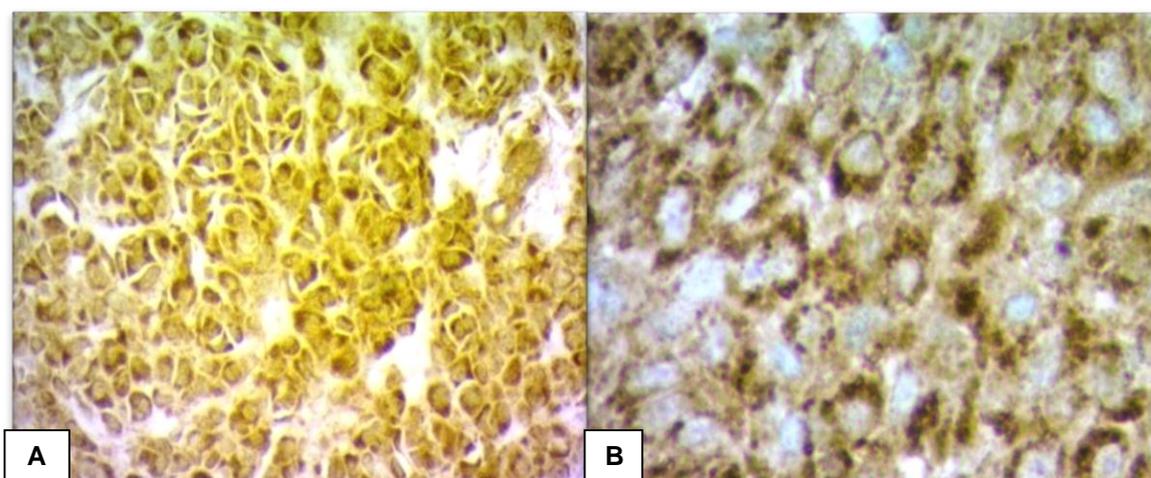


Figura 15: Expresión de BAP1c predominantemente perinuclear focal. Se observa tinción del citoplasma de células tumorales en forma de grumo o capuchón marrón adyacente al núcleo tumoral, que muestra ausencia de tinción (A: 400X, B: 1000X, magnificaciones originales).

3.1.1. Descripción por variantes clínico-patológicas

- **Extensivo superficial:** predominó en sexo masculino, en menores de 60 años, la localización más frecuente en tronco y el daño solar acumulado fue predominantemente bajo. Hubo diseminación regional en 11% y asociación con nevus preexistente en 52%. La mayoría se encontró en fase vertical y los niveles de Clark más frecuentes fueron IV-V. No obstante, la mayoría tuvo un Breslow menor o igual a 1 mm. La ulceración estuvo presente en 26%, hubo regresión en 48% de casos e infiltrado linfocitario *brisk* en 44%. La mayoría presentó Ki-67 bajo (<20%), BAP1 nuclear alto y BAP1 citoplasmático difuso.

- **Nodular:** predominó en sexo masculino, en menores de 60 años, la localización más frecuente en tronco y el daño solar acumulado fue predominantemente bajo. Hubo diseminación regional en el 20%. Los niveles de Clark más frecuentes fueron IV-V y la mayoría de los casos tuvo un Breslow mayor a 4 mm. La ulceración estuvo presente en 67%, sólo hubo regresión en 3% y el infiltrado linfocitario fue predominantemente *no brisk*. La mayoría presentó Ki-67 alto ($\geq 20\%$), BAP1 nuclear bajo y BAP1 citoplasmático perinuclear focal (70%).

- **Lentigo maligno:** predominó en sexo femenino, en mayores de 60 años, y hubo diseminación regional en el 7%. 67% presentó un Breslow menor o igual

a 1 mm y el nivel de Clark más frecuente I-II-III. La ulceración estuvo presente en 13%, hubo regresión e infiltrado linfocitario *brisk* en 7%. La mayoría presentó Ki-67 bajo (<20%), BAP1 nuclear alto y BAP1 citoplasmático difuso.

● Acrolentiginoso: predominó en sexo femenino, en mayores de 60 años, más frecuente en miembro inferior y hubo diseminación regional en el 12%. El 30% presentó un Breslow menor o igual a 1 mm, 35% de 1 a 4 mm y 35% mayor a 4 mm, y el nivel de Clark más frecuente IV-V. La ulceración estuvo presente en 41%, hubo regresión en 18% e infiltrado linfocitario *no brisk* en todos los casos. La mayoría presentó Ki-67 bajo (<20%), BAP1 nuclear alto y BAP1 citoplasmático difuso.

En la Tabla 5 se puede apreciar la distribución de frecuencias de las variables clínico-patológicas según variantes histológicas de melanoma.

VARIABLE	VARIANTE			
	Extensivo superficial n=54	Nodular n=30	Acrolentiginoso n=17	Lentigo maligno n=15
Género, n (%)				
-Mujer	24 (44%)	12 (40%)	12 (71%)	9 (60%)
-Varón	30 (56%)	18 (60%)	5 (29%)	6 (40%)
Edad n (%)				
-<60 años	32 (59%)	17 (57%)	5 (29%)	1 (7%)
-≥60 años	22 (41%)	13 (43%)	12 (71%)	14 (93%)
Región n (%)				
-Tronco	29 (54%)	12 (40%)	0 (0%)	0 (0%)
-Cabeza y cuello	5 (9%)	9 (30%)	0 (0%)	15 (100%)
-Miembro inferior	13 (24%)	6 (20%)	16 (97%)	0 (0%)
-Miembro superior	7 (13%)	3 (10%)	1 (3%)	0 (0%)
Diseminación n (%)				
-Localizado	48 (89%)	24 (80%)	15 (88%)	14 (93%)
-Metástasis regional	6 (11%)	6 (20%)	2 (12%)	1 (7%)
Nevus n (%)				
-Presente	28 (52%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
-Ausente	26 (48%)	30 (100%)	17 (100%)	15 (100%)
Daño solar n (%)				
-Alto	2 (4%)	7 (23%)	0 (0%)	15 (100%)
-Bajo	52 (96%)	23 (77%)	17 (100%)	0 (0%)

En la Tabla 6 se puede apreciar la distribución de frecuencias de las variables histopatológicas según variantes histológicas de melanoma.

Variable	Extensivo superficial n=54	Nodular n=30	Acrolentiginoso n=17	Lentigo maligno n=15
Fase de crecimiento n (%)				
-Radial	18 (33%)	0 (0%)	5 (29%)	10 (67%)
-Vertical	36 (67%)	30 (100%)	12 (71%)	5 (33%)
CAT Breslow n (%)				
≤1 mm	29 (54%)	0 (0%)	5 (30%)	10 (67%)
1-4 mm	22 (41%)	12 (40%)	6 (35%)	3 (20%)
>4 mm	3 (6%)	18 (60%)	6 (35%)	2 (13%)
Nivel de Clark n (%)				
I-II-III	20 (37%)	0 (0%)	5 (29%)	10 (67%)
IV-V	34 (63%)	30 (100%)	12 (71%)	5 (33%)
Ulceración n (%)				
-Presente	14 (26%)	20 (67%)	7 (41%)	2 (13%)
-Ausente	40 (74%)	10 (33%)	10 (59%)	13 (87%)
Citomorfoloía n (%)				
-Epiteloide	13 (24%)	23 (77%)	5 (29%)	1 (7%)
-No epiteloide	41 (76%)	7 (23%)	12 (71%)	14 (93%)
Linfocitos n (%)				
-No Brisk	30 (56%)	27 (90%)	17 (100%)	14 (93%)
-Brisk	24 (44%)	3 (10%)	0 (0%)	1 (7%)
Regresión n (%)				
-Presente	26 (48%)	1 (3%)	3 (18%)	1 (7%)
-Ausente	28 (52%)	29 (97%)	14 (82%)	14 (93%)
Invasión vascular n (%)				
-Detectada	1 (2%)	2 (7%)	0 (0%)	0 (0%)
-No detectada	53 (98%)	28 (93%)	17 (100%)	15 (100%)
Invasión neural n (%)				
-Detectada	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (7%)
-No detectada	54 (100%)	30 (100%)	17 (100%)	14 (93%)

En la Tabla 7 se puede apreciar la distribución de frecuencias de las variables inmunohistoquímicas según variantes histológicas de melanoma.

Variable	Extensivo superficial n=54	Nodular n=30	Acrolentiginoso n=17	Lentigo maligno n=15
BAP1 nuclear n (%)				
- baja (<33%)	22 (41%)	26 (87%)	5 (29%)	2 (13%)
- alta (≥33%)	32 (59%)	4 (13%)	12 (71%)	13 (87%)
BAP1 citoplasmático n (%)				
-Difuso	45 (83%)	9 (30%)	13 (76%)	14 (93%)
-Paranuclear	9 (17%)	21 (70%)	4 (24%)	1 (7%)
Índice de proliferación n (%)				
<20%	31 (57%)	9 (30%)	12 (71%)	12 (80%)
≥20%	23 (43%)	21 (70%)	5 (29%)	3 (20%)

3.2. Análisis de asociación y correlación de variables

3.2.1. Prueba de correlación entre variables continuas

Hubo correlación positiva significativa ($p < 0,001$) entre Ki-67 y mitosis, con un coeficiente de correlación ($r = 0,4718$). El espesor de Breslow también tuvo correlación positiva y significativa con mitosis ($r = 0,5145$) y Ki-67 ($r = 0,3908$). La variable BAP1 nuclear, por otro lado, mostró correlación inversa significativa al 95% ($p < 0,001$) con mitosis ($r = -0,3256$) y Breslow ($r = 0,2724$), en tanto que la correlación de BAP1 nuclear con Ki-67 mostró tendencia a ser significativa para un nivel de significación $\alpha = 0,10$ ($r = -0,1613$, $p = 0,08$) (Figura 16).

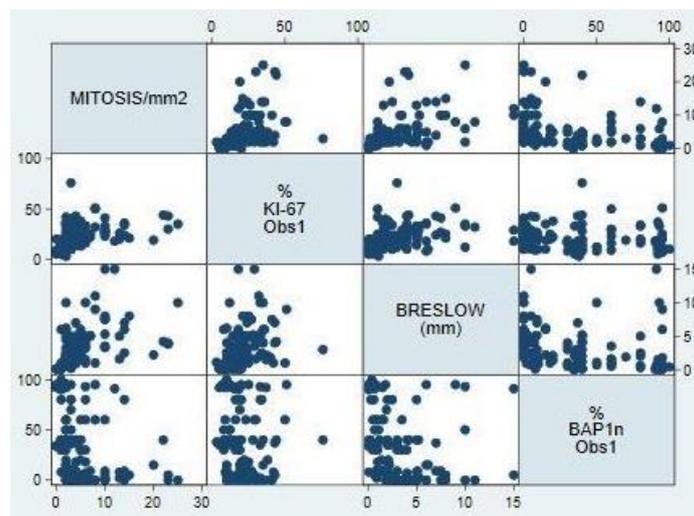


Figura 16: Representación gráfica de una matriz de correlación, que incluye los parámetros Mitosis/mm², % Ki-67, Breslow (mm) y % BAP1 nuclear. En los recuadros de fondo blanco se representan los coeficientes de correlación mediante una nube de puntos azules. Los ejes cartesianos (X, Y) se encuentran invertidos en la esquina superior derecha, con respecto a la inferior izquierda (imagen en espejo).

3.2.2.Comparación entre variantes de melanoma

● **Variables continuas:** Las variables continuas en los distintos tipos de melanoma (Tabla 8), mostraron las siguientes diferencias significativas ($p < 0,05$): la variante nodular tuvo mayor espesor de Breslow, índice mitótico y % de Ki-67, y % BAP1n más bajo en relación a las demás variantes. Lentigo maligno se presentó a mayor edad que extensivo superficial y nodular, y tuvo menor Breslow que acrolentiginoso y nodular. Extensivo superficial tuvo menor Breslow que variante nodular y acrolentiginosa, y mayor Ki-67 que lentigo maligno. La variante acrolentiginosa mostró mayor Breslow que extensivo superficial y lentigo maligno. El diámetro tumoral no presentó diferencias significativas de medias entre las variantes ($p = 0,2927$).

Parámetro	Acrolentiginoso \bar{X} (DE), mín-máx	Ext. superficial \bar{X} (DE), mín-máx	Lentigo maligno \bar{X} (DE); mín-máx	Nodular \bar{X} (DE); mín-máx
EDAD (años)	63,65(16,70); 29-84	55,63(16,63); 21-90	73(9,45); 58-86	57,63(15,36); 26-81
DIÁMETRO (cm)	2,09(1,70); 0,4-6,5	1,40(0,80); 0,4-4,5	1,15(0,74); 0,2-3	1,37(0,54); 0,3-2,5
BRESLOW (mm)	3,98(3,99); 0-15	1,47(1,27); 0-5,3	1,97(4,00); 0-15	5,41(2,49); 2-11
MITOSIS/mm ²	3 (2,32); 1-10	3,72(4,09); 0-22	3,53(4,99); 0-14	8,23(6,58); 2-25
% KI-67	21,35(17,10); 7-76	20,17(10,74); 5-50	13(6,12); 3-24	25,27(10,39); 10-51
% BAP1n	45,41(36,13); 0-95	43,67(32,39); 0-100	54,13(31,64); 8-92	14,53(27,24); 0-95

● **Variables categóricas.** La variante Nodular se asoció significativamente, con respecto a variante No nodular (categorización dicotómica), a ausencia de nevo ($p = 0,0003$), categorías de Breslow superiores a 1 mm ($p < 0,0001$), ulceración ($p < 0,0001$), Clark IV-V ($p < 0,0001$), morfología epiteloide ($p < 0,0001$), infiltrado linfocitario *no brisk* ($p = 0,0356$), ausencia de regresión ($p = 0,0008$) y Ki-67 elevado ($> 20\%$) ($p = 0,0015$).

3.2.3.Asociaciones entre BAP1 nuclear y otras variables

Con respecto a las variables clínico-patológicas, se observó asociación significativa entre expresión baja de BAP1 nuclear y variante nodular ($p < 0,001$), y ausencia de nevus preexistente ($p = 0,0219$), como puede observarse en la Tabla 9.

Tabla 9: Asociación entre BAP1 nuclear y variables clínico-patológicas			
Parámetro	BAP1n bajo (<33%) n=55	BAP1n alto (>33%) n=61	p valor
Género			
-Varón	28	31	0,992
-Mujer	27	30	
Edad			
-<60	28	27	0,474
-≥60	27	34	
Localización			
-Tronco	19	22	0,650
-Cabeza y cuello	12	17	
-Miembros	24	22	
Variante			
-Nodular	26	4	<0,0001*
-No nodular	29	57	
Diseminación			
-Localizado	49	52	0,5377
-Metástasis regional	6	9	
Nevus preexistente			
-Presente	8	20	0,0219*
-Ausente	47	41	
Daño solar			
-Alto	9	15	0,275
-Bajo	46	46	

*: valores de p estadísticamente significativos

En relación con las variables histopatológicas, se observó asociación significativa entre BAP1 nuclear bajo y fase vertical, categorías de Breslow mayores a 1 mm de espesor, niveles de Clark IV-V, ulceración y citomorfología epiteloides ($p < 0,001$), resultados que pueden observarse en la Tabla 10.

Tabla 10: Correlación entre BAP1 nuclear y variables histopatológicas			
Parámetro	BAP1n bajo (<33%) n=55	BAP1n alto (≥33%) n=61	p valor
Fase			
-Radial	2	31	<0,0001*
-Vertical	53	30	
Breslow			
≤1 mm	10	34	<0,0001*
>1-4 mm	26	17	

>4 mm	10	10	
Nivel de Clark			
I-II-III	3	32	<0,0001*
IV-V	52	29	
Ulceración			
-Presente	33	10	<0,0001*
-Ausente	22	51	
Citomorfoloía			
-Epiteloides	39	3	<0,0001*
-No epiteloides	16	58	
Invasión vascular			
-Ausente	52	61	0,104
-Presente	3	0	
Invasión neural			
-Ausente	55	60	0,526
-Presente	0	1	
Microsatelitosis			
-Ausente	54	58	0,349
-Presente	1	3	
Regresión			
-Ausente	40	45	0,899
-Presente	15	16	
Linfocitos			
-Brisk	16	12	0,237
-No brisk	39	49	

*: valores de p estadísticamente significativos

La relación de BAP1 nuclear con variables inmunohistoquímicas se ilustra en la Tabla 11. Se observó asociación significativa entre BAP1 nuclear bajo y Ki-67 alto (igual o mayor a 20%) ($p=0,003$) y patrón de BAP1 citoplasmático perinuclear focal ($p<0,0001$).

Tabla 11: Correlación entre BAP1 nuclear y variables inmunohistoquímicas			
Parámetro	BAP1n bajo (<33%) n=55	BAP1n alto (≥33%) n=61	p valor
% Ki-67			
<20%	26	45	0,003*
≥20%	29	16	
BAP1c			
Difuso	20	61	<0,0001*
Perinuclear focal	35	0	

*: valores de p estadísticamente significativos

3.2.4. Asociaciones de patrones de BAP1 citoplasmático

Al igual que con BAP1 nuclear, también se estudiaron las relaciones entre los patrones de BAP1 citoplasmático (difuso vs perinuclear focal) y las variables categóricas de interés. Se observó asociación significativa entre patrón perinuclear y variante nodular ($p < 0,0001$), ausencia de nevus preexistente ($p = 0,0023$), fase vertical ($p < 0,0001$), categorías de Breslow mayores a 1 mm ($p < 0,0001$) (Figura 17), niveles de Clark IV-V ($p < 0,0001$), presencia de ulceración ($p < 0,0001$), citomorfología epiteloide ($p < 0,0001$) e invasión vascular ($p = 0,0076$). Las asociaciones significativas mencionadas pueden observarse en la Tabla 12.

Tabla 12: Asociación entre BAP1 citoplasmático y parámetros clínico-patológicos, histopatológicos y de inmunohistoquímica			
Parámetro	BAP1c Difuso n=81	BAP1c Paranuclear n=35	p valor
Variante			
-Nodular	9	21	<0,0001*
-No nodular	72	14	
Nevus preexistente			
-Presente	26	2	0,0023*
-Ausente	55	33	
Fase			
-Radial	33	0	<0,0001*
-Vertical	48	35	
Breslow			
≤1 mm	42	2	<0,0001*
>1-4 mm	26	17	
>4 mm	13	16	
Nivel de Clark			
I-II-III	35	0	<0,0001*
IV-V	46	35	
Ulceración			
-Presente	17	26	<0,0001*
-Ausente	64	9	
Citomorfología			
-Epiteloide	7	35	<0,0001*
-No epiteloide	74	0	
Invasión vascular			

-Ausente	81	32	0,0076*
-Presente	0	3	
% Ki-67			0,0007*
<20%	53	11	
≥20%	28	24	

*: valores de p estadísticamente significativos

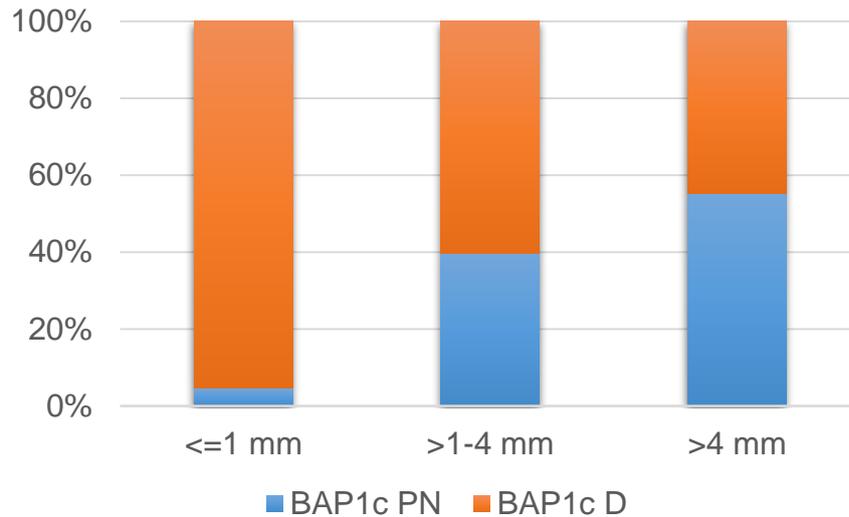


Figura 17: Distribución de patrones de BAP1 citoplasmático (BAP1c), según distintas categorías de espesor de Breslow. PN: paranuclear. D: difuso.

3.2.5. Asociaciones entre categorías de Ki-67 y otras variables

Se encontró asociación estadísticamente significativa entre Ki-67 elevado ($\geq 20\%$) y los siguientes parámetros: fase vertical, categorías de Breslow mayores a 1 mm, ulceración, nivel de Clark IV-V, metástasis regional y morfología epiteloide ($p < 0,0001$).

3.3. Análisis confirmatorio (modelos de regresión logística)

Se confeccionaron modelos de regresión logística múltiple incorporando variables de ajuste y confusión, con el fin de estudiar la relación entre variables clínico-patológicas de interés y patrones de expresión de BAP1, con la probabilidad de presentar los siguientes parámetros adversos: diseminación tumoral al momento del diagnóstico inicial, Ki-67 elevado ($>$ o igual a 20%) y ulceración. Además, se modeló para citomorfología. Se obtuvieron los *Odds Ratio* (OR) y sus respectivos intervalos de confianza (IC) del 95%.

Con respecto al modelo de la relación existente entre variables regresoras de naturaleza clínico-patológica con la probabilidad de presentar diseminación tumoral al momento del diagnóstico inicial, se encontró que la localización en tronco, aumenta en relación a cabeza y cuello 17,69 veces la chance de dicho fenómeno (OR=17,69; IC=1,29-242,28), y por cada unidad de incremento en el espesor de Breslow (mm) se incrementa el riesgo un 30% (OR=1,30; IC=1,03-1,64). La presencia de ulceración se insinúa como una posible predictora significativa para un nivel de significación $\alpha=0,10$ (OR=4,15; IC=0,98-17,65, $p=0,0540$). No observó relación significativa con edad, sexo ni diámetro (cm), variables incluidas en la modelación.

En el modelo logístico de la relación entre variables regresoras de tipo inmunohistoquímica (% Ki-67, % BAP1 nuclear y patrones citoplasmáticos de BAP1), y la probabilidad de presentar diseminación tumoral, ajustado por edad y sexo, se obtuvo que sólo el índice de proliferación celular posee una relación significativa, incrementando 7% el riesgo de diseminación por cada unidad que se incrementa (OR=1,07; IC=1,02-1,12).

Con respecto a la relación de variables clínico-patológicas con la probabilidad de presentar Ki-67 elevado ($\geq 20\%$), incluyendo en la modelación edad, sexo y diámetro, se obtuvo que la presencia de ulceración y localización en tronco (con respecto a cabeza y cuello) elevan 4,25 (OR=4,25; IC=1,52-11,90) y 4,22 veces (OR=4,22; IC=1,18-15,17) la chance respectivamente, y por cada unidad de incremento de Breslow aumenta 25% el riesgo (OR=1,25; IC=1,01-1,54). En modelo logístico de variables inmunohistoquímicas, ajustado por edad y sexo, se encontró que el patrón perinuclear focal de BAP1c aumenta 4,58 veces la chance (OR=4,58; IC=1,38-15,25) de presentar índice de proliferación celular alto ($\geq 20\%$), sin relación significativa con BAP1 nuclear categorizado en baja y alta expresión.

Con respecto a la relación de variables clínico-patológicas con la probabilidad de presentar ulceración, únicamente el espesor de Breslow mostró una relación significativa, aumentando 56% el riesgo de presentarla por cada unidad de incremento en mm (OR=1,56; IC=1,21-2,03), en modelo logístico ajustado por edad, sexo, diámetro, localización (cabeza y cuello, miembros y

tronco) y variante (nodular vs no nodular). En el modelo logístico de variables de inmunohistoquímica, ajustado por edad y sexo, se encontró que el patrón perinuclear focal de BAP1 citoplasmático aumenta 3,96 veces la chance de ulceración (OR=3,96; IC=1,06-14,80), y por cada unidad de incremento de BAP1 nuclear y % Ki-67, disminuye 2% (OR=0,98; IC=0,96-1) y aumenta 10% el riesgo (OR=1,10; IC=1,05-1,16), respectivamente. La edad mostró tendencia a la significación a un nivel $\alpha=0,10$ (OR=1,03; IC=1-1,06, $p=0,0714$).

Por último, en modelo logístico para citomorfología epiteloide, ajustado por edad, sexo y las variables clínico-patológicas anteriormente mencionadas, se encontró relación significativa con ulceración (OR=8,48; IC=2,74-26,25) y variante Nodular (OR=8,61; IC=2,32-31,99). Con respecto a las variables inmunohistoquímicas, se encontró relación estadísticamente significativa con BAP1 nuclear (OR=0,91; IC=0,88-0,94) y Ki-67 (OR=1,05; IC=1,00-1,10). El patrón citoplasmático de BAP1 se excluyó de la modelación debido a que el patrón perinuclear focal no era variable con citomorfología epiteloide (todos los casos con este patrón presentaron dicha morfología).

CAPÍTULO IV - DISCUSIÓN

4.1. Discusión

En relación a la frecuencia de variantes clínico-patológicas de melanoma, en la literatura se describe que la incidencia relativa de cada subtipo varía según edad, género, etnia y geografía, señalándose los siguientes rangos: extensivo superficial (30-60%), nodular (15-35%), lentigo maligno (10-40%), acrolentiginoso (5-10%), siendo otras variantes (ej: desmoplásico) raras (20). El estudio epidemiológico del RAMC (10, 11) encontró mayor frecuencia de la variante extensiva superficial (54%) seguida por la nodular (27%), lentigo maligno (8%) y acrolentiginoso (6%). En nuestro estudio se observó una frecuencia similar a la descrita en la literatura, siendo el tipo extensivo superficial el más común constituyendo casi la mitad de la misma (46%). El segundo más frecuente fue el nodular (26%), seguido por acrolentiginoso (15%) y lentigo maligno (13%). La frecuencia de variante acrolentiginosa fue superior a la descrita, no obstante, esta variante es la más común en la mayoría de países latinoamericanos, probablemente debido a factores raciales, ya que tiene mayor frecuencia en raza negra (70%), población asiática (40%), hispanos (15%) y en último lugar los caucásicos (2 a 8%) (8). El informe de RAMC reportó una edad promedio de presentación de 55,1 años en mujeres y de 58,5 en hombres, y en nuestro estudio también se observó menor edad en mujeres: 59,12 años (21-90), en comparación con hombres, en los cuales la media de edad fue de 60 años (21-87). Además, encontramos una edad menor en las variantes extensiva superficial y nodular (promedio de 56 y 58 años respectivamente), en comparación con las variantes lentigo maligno y acrolentiginosa (promedio de 64 y 73 años respectivamente). Estos hallazgos están en coincidencia con la bibliografía (9, 10, 11, 33, 34). En esta última también se señala mayor frecuencia del melanoma nodular después de los 40 años (31, 32), y en nuestro estudio tuvo un promedio de 57,63 años. Encontramos que 51% de los pacientes fueron hombres y 49% mujeres, similar al estudio de RAMC que reportó en su primer trabajo (10) una distribución de 50,6% de hombres y 49,4% de mujeres y en

su última presentación estas cifras se mantuvieron relativamente constantes, con 51,1% de hombres y 48,9% de mujeres (11).

La distribución anatómica de los melanomas está en gran medida relacionada con el subtipo histológico, y existen diferencias según sexo, generalmente atribuidas a diferencias en los hábitos de exposición solar. La espalda es el sitio más común de localización en hombres y las extremidades inferiores en mujeres (7, 11), y en nuestro estudio la localización más frecuente en los hombres fue el tronco en 54% y en mujeres el miembro inferior en un 46%. La variante extensiva superficial mostró una distribución similar a la descrita, el 100% de lentigo maligno se dio en cabeza y cuello, que es una zona expuesta y propensa a la exposición solar crónica, factor de riesgo para este subtipo, en coincidencia con los distintos estudios epidemiológicos (11, 33, 34). El subtipo acrolentiginoso predominó en miembro inferior (97%), en coincidencia con los resultados del reporte epidemiológico de RAMC (73,2%). En este último trabajo la distribución del melanoma nodular predominó en tronco (34,1%) al igual que en nuestro estudio (40%), en contraposición a otros trabajos que observaron mayor frecuencia en cabeza y cuello (31, 32). No obstante, el nuevo esquema de clasificación de tumores melanocíticos en vías, de WHO 2018, considera que esta variante puede desarrollarse a partir de cualquiera de éstas, por lo que su epidemiología es heterogénea (33). En la literatura se ha señalado influencia del sitio anatómico en el pronóstico (27), con datos desprendidos de análisis multivariados que señalan valor pronóstico negativo independiente de la localización en cabeza/cuello y tronco. En nuestro estudio hemos observado que la localización en tronco incrementa en relación a cabeza y cuello, en modelo logístico ajustado por sexo, edad, diámetro, Breslow y ulceración, 17,69 veces la chance de presentar metástasis regional al momento del diagnóstico inicial y valor predictivo positivo para Ki-67 elevado (mayor o igual a 20%), incrementando 4,22 veces la chance. Este resultado probablemente se deba a la alta frecuencia observada de variante nodular en tronco con respecto a cabeza y cuello, que mostró alta representación de la variante lentigo maligno, como se ha comentado.

El diámetro de los melanomas es un componente de la regla ABCDE (D= diámetro), aumentando la probabilidad de su diagnóstico cuando es mayor a 5 o 6 mm (14). En nuestra serie tuvo un promedio de 1,46 cm, y el 90% midieron más de 0,5 cm. En la literatura se remarca que pueden ocurrir excepciones a esta regla y algunos casos pueden ser mal diagnosticados si se aplica siempre de manera estricta. De hecho, en nuestra casuística hubo casos con diámetro menor (mínimo de 0,2 cm y máximo de 6,5 cm) y la regla no aplica para la variante nodular, que se origina de *novo* (sin nevo precursor) y crece en profundidad, por lo que la medida de su diámetro lateral subestimaría su verdadero tamaño y agresividad (31, 32). En línea con esto, no observamos correlación significativa del diámetro con espesor de Breslow, índice mitótico ni Ki-67, ni mostró diferencia significativa entre los distintos subtipos histológicos. Por otra parte, en los modelos logísticos no se evidenció asociación con metástasis regional. Hipotetizamos que estos resultados pueden deberse a que el diámetro depende de la extensión de la fase de crecimiento radial del melanoma, poco agresiva a diferencia de la vertical, que se extiende en profundidad y tiene potencial metastásico (14, 33).

El rol de la exposición solar en la etiopatogenia del melanoma cutáneo es un factor de riesgo importante para su desarrollo (23, 41, 42, 43). En nuestra serie este parámetro fue alto en el total de lentigos malignos, nulo en todos los acrolentiginosos, y predominantemente bajo en extensivos superficiales (96%) y nodulares (77%), sin diferencia significativa entre ellos, hallazgos que concuerdan con la clasificación WHO 2018, en la cual a su vez se señala que la variante nodular puede pertenecer a una u otra categoría, ya que no es un tipo específico de melanoma (33, 34). Un nevus melanocítico coexistente se encuentra en aproximadamente un cuarto a un tercio de todos los melanomas, siendo la mayoría displásicos (33, 41, 42, 58), y en nuestro estudio, 24% se asoció a nevo residual, de tipo displásico. El total de casos que presentó dicha asociación correspondió al subtipo extensivo superficial y presentó bajo daño solar acumulado, en relación con estudios previos que señalaron que esta es la variante que más se asocia a un origen en nevus displásico, por ganancia de mutaciones somáticas inducidas por radiación UV

que promueven la oncogénesis (23, 41). El reporte de la elastosis solar en el informe anatomopatológico del melanoma cutáneo adquirió mayor importancia con su reconocimiento en la nueva clasificación WHO 2018, y además el daño solar acumulado bajo es un factor predictivo importante de mutación BRAF^{V600E}, cuyo estatus mutacional se solicita en melanomas metastásicos, indicando respuesta a inhibidores de BRAF, como vemurafenib, tratamiento estándar en estos casos (16, 17, 33, 34).

La presencia de metástasis ganglionar tiene significado pronóstico adverso independiente y es el factor predictivo de supervivencia más importante sin tener en cuenta la metástasis a distancia (44, 45), al igual que la enfermedad metastásica regional no ganglionar (satélites, microsátélites y metástasis en tránsito). En nuestro estudio, 87% de melanomas se encontraron en estado localizado y 13% presentaron metástasis regional (ganglionar y no ganglionar). En modelos de regresión logística múltiple, el espesor de Breslow y la localización en tronco fueron las variables clínico-patológicas que mostraron relación estadísticamente significativa e independiente con metástasis regional en la serie estudiada (OR=1,30 y 17,69 respectivamente; IC=95%).

Con respecto a las variables histopatológicas, se estudiaron las recomendadas por los protocolos regularmente actualizados por Colegio Americano de Patólogos (CAP) (46), cuya última versión fue publicada en agosto de 2021. Los parámetros con valor pronóstico independiente más importantes son el espesor de Breslow y ulceración, protagónicos en el nuevo sistema de estadificación patológica TNM (44, 45). En cuanto al espesor de Breslow, el RAMC reportó que en el 56% de las lesiones fue $\leq 1,00$ mm, y los melanomas provenientes del sistema público de atención de salud presentaron espesor mayor que los provenientes del sector privado (10). En nuestra serie, perteneciente a un hospital público, 38% mostraron espesor ≤ 1 mm, 37% 1-4 mm, y 25% mayor de 4 mm, y separando a los melanomas en delgados y gruesos tomando como punto de corte 1 mm, 62% de los tumores fueron gruesos. El espesor fue significativamente superior en la variante nodular con respecto a lentigo maligno y extensivo superficial, mostró

correlación positiva significativa con índice mitótico y Ki-67, y en análisis de regresión logística se asoció significativamente con la probabilidad de presentar metástasis regional al diagnóstico inicial (OR=1,30; IC=1,03-1,64), Ki-67 elevado ($\geq 20\%$) (OR=1,25; IC=1,01-1,54) y ulceración (OR=1,56; IC=1,21-2,03). Por otra parte, el reconocimiento y registro de la fase de crecimiento, si bien ya no forma parte del protocolo actual de CAP, es importante ya que la fase radial es incapaz de producir metástasis a pesar de tener invasión focal de la dermis papilar, mientras que la fase vertical representa un factor pronóstico adverso (20, 33). En nuestra serie predominó la fase vertical, en el 72% de los casos, y la fase radial fue más frecuente en el subtipo lentigo maligno (67%), en coincidencia con el comportamiento menos agresivo de esta variante y la mayor duración de la misma previo al desarrollo de fase vertical (20, 28, 33, 36). El nivel de Clark, definido por barreras anatómicas, ya no es más requerido a los fines de estadificación (44, 45), a pesar de su significado pronóstico obtenido en análisis univariados (20, 57). En nuestro estudio predominaron los niveles de Clark IV-V, con 69,83% frente a al grupo que incluyó I-II-III, con 30,17%. La justificación para esta división es que los niveles I-II-III suelen coincidir con fase de crecimiento radial, con menor potencial metastásico que el grupo IV-V (20, 33, 57). La mayor frecuencia de fase vertical y Clark IV-V en nuestro estudio muestra que la presentación de este tumor no es temprana, similar a las observaciones realizadas en RAMC 2010 (10) en relación a los tumores del sistema público de salud.

La presencia de ulceración es un factor pronóstico independiente significativo. Los melanomas delgados con ulceración son raros, y los pacientes que la presentan tienen alta probabilidad de desarrollar metástasis local, regional y a distancia (44, 45, 48, 49). En nuestro estudio, en modelo logístico multivariado ajustado por edad y sexo, la presencia de ulceración tuvo tendencia significativa independiente del espesor de Breslow, en relación a la probabilidad de presentar metástasis regional, y también resultó ser un factor predictivo positivo independiente para Ki-67 elevado en dichos modelos. El índice mitótico, aunque ya no es contemplado por AJCC como un criterio

para clasificar los melanomas T1, se continúa considerando como un factor pronóstico importante para el seguimiento clínico y se recomienda registrarlo, y según el estudio de Wheless y col (50) es una característica de alto riesgo en melanomas T1, asociada con positividad de ganglio linfático, y peor sobrevida libre de enfermedad. En nuestra serie el índice mitótico promedio fue de 4,76 mitosis/mm² (0-25), fue significativamente mayor en los melanomas nodulares en comparación con el resto de las variantes (promedio 8,23 mitosis/mm², 2-25), y se evidenció correlación positiva significativa con espesor de Breslow.

Con respecto a la infiltración linfocitaria del tumor, en nuestra serie 24% de melanomas presentaron infiltrado *brisk*, con alta frecuencia en variante extensivo superficial (44%) en comparación con las otras, y el infiltrado *no brisk*, con una frecuencia de 76%, presentó asociación significativa con variante nodular ($p=0,0356$), coincidente con lo reportado en la literatura (31-34). El incremento gradual en los linfocitos puede reflejar un aumento en la antigenicidad tumoral y está estrechamente relacionado con el fenómeno de regresión tumoral, una característica de buen pronóstico (55, 56). El Colegio Americano de Patólogos (CAP) recomienda reportarla en el melanoma primario, indicando si está ausente o presente, y en éste último caso, si comprende menos o más del 75% del tumor (46). En nuestra muestra el 27% de los melanomas presentaron regresión, menor al 75% en todos los casos. Al igual que el infiltrado linfocitario *brisk*, tuvo alta frecuencia de presentación en melanoma extensivo superficial (48%), y se asoció significativamente a variantes no nodulares ($p=0,0008$), hallazgos similares a los reportados en la bibliografía (31-34). Aung y col (56) mencionaron que, aunque no es requerida para la estadificación, el valor pronóstico de la regresión podría estudiarse mejor eliminando la falta de consistencia en la evaluación y definición de la misma entre dermatopatólogos. En los casos de nuestra institución también se observó falta de consistencia en los criterios de definición y este parámetro fue reevaluado basándose en las recomendaciones de CAP. El registro de la regresión e infiltración linfocitaria tumoral adquirieron relevancia no sólo debido a la información pronóstica que aportan, sino que pueden representar

factores predictivos de respuesta a nuevas terapias que se suman al arsenal terapéutico existente en melanoma avanzado, como los inhibidores de PD-1, y los pacientes podrían beneficiarse si sus tumores presentan un infiltrado inflamatorio marcado de tipo *brisk*, particularmente si es alta la expresión de PD-L1 (53, 54, 141).

La invasión vascular e infiltración perineural (neurotropismo) son otros parámetros de valor pronóstico, el primero relacionado con la producción de metástasis y el segundo con mayor riesgo de recurrencia local. En nuestra casuística la frecuencia de ambas características fue muy baja (3% y 1%, respectivamente). Una posible explicación es que no se utilizó la inmunomarcación para endotelio, D2-40, como proponen algunos trabajos (52), para resaltar los vasos linfáticos. No obstante, la misma no se aplica de rutina en nuestro medio y la búsqueda de permeaciones linfáticas se realiza en cortes coloreados con H/E. Por otra parte, la escasez de infiltraciones perineurales (neurotropismo) podría deberse a la ausencia de variante desmoplásica en la casuística estudiada, que presenta alta frecuencia de neurotropismo (33, 34).

Con respecto al índice de proliferación celular (Ki-67), si bien se asocia a mayor agresividad tumoral en melanoma (61) se ha notado una falta de correlación estadísticamente significativa con el índice mitótico (62), lo cual no resulta sorprendente ya que el Ki-67 es un marcador de proliferación más sensible que las figuras mitóticas que, por definición, son células solo en la fase M del ciclo celular. En nuestro estudio sí se demostró una correlación estadísticamente significativa y positiva entre el índice de proliferación celular y el índice mitótico, con un valor de $r=0.4718$. No obstante, dicha correlación no resultó perfecta ($r=1$) lo que podría explicarse por motivo previamente expuesto. En relación a las variantes clínico-patológicas, en nuestro estudio la nodular mostró Ki-67 significativamente superior (promedio 25,27%, 10-51) a extensiva superficial y lentigo maligno, pero no a acrolentiginosa. El punto de corte igual o superior a 20% se basó en publicaciones previas, que mostraron correlación entre índice proliferativo superior a esta cifra y parámetros clínico-patológicos adversos, principalmente mayor espesor

tumoral y estadio, aunque no demostró ser un factor pronóstico independiente (62). En nuestro estudio hubo además correlación significativa positiva del % de Ki-67 con espesor de Breslow (mm). En modelos de regresión logística para variable respuesta Ki-67 elevado ($\geq 20\%$) versus bajo ($< 20\%$), ya se ha mencionado que Breslow mostró valor predictivo independiente, encontrándose que por cada unidad que este aumenta, se incrementa el riesgo de tener Ki-67 elevado 25% riesgo (OR=1,25; IC=1,01-1,54). En cambio, estudiada como variable regresora en modelo de regresión logística, se encontró que es factor predictivo independiente aumentando 7% el riesgo de metástasis regional (OR=1,07; IC=1,02-1,12) y 10% el riesgo de ulceración, por cada unidad de incremento (OR=1,10; IC=1,05-1,16).

Varias observaciones apoyan la mayor agresividad de la variante nodular frente a las demás, fundamentando que hay casos de melanomas primarios delgados que han desarrollado metástasis a pesar de la escisión completa, y a pesar de que muchos estudios indican que las variantes histológicas no presentan diferencias en el pronóstico cuando se ajustan por espesor, varios estudios mostraron que el pronóstico para el melanoma nodular delgado es peor comparado con el del melanoma extensivo superficial delgado (31, 32, 39, 40), y que la variante nodular es más probable que presente ulceración y menos probable que tenga regresión y asociación con nevus, que son características de buen pronóstico (56, 58). En nuestro estudio, en comparación con las otras variantes, la nodular tuvo mayor índice mitótico, espesor de Breslow y Ki-67. Para estudios de significación estadística y basándonos en la naturaleza hipotéticamente más agresiva de la variante nodular, se la comparó con el grupo de “no nodulares”. En análisis univariado la variante nodular se asoció significativamente a parámetros histopatológicos de pronóstico adverso: presencia de ulceración ($p < 0,0001$), niveles de Clark IV-V ($p < 0,0001$), ausencia de nevus preexistente ($p = 0,0003$), categorías de Breslow superiores a 1 mm ($p < 0,0001$), infiltrado linfocitario No Brisk ($p = 0,0356$), ausencia de regresión ($p = 0,0008$) y Ki-67 elevado ($\geq 20\%$) ($p = 0,0015$). No obstante, aplicando análisis multivariado con modelos de regresión logística, no mostró valor predictivo significativo independiente para

metástasis regional, ajustado por otros parámetros incluidos en la modelación (edad, sexo, Breslow, diámetro, Ki-67 y ulceración). Tampoco mostró una relación significativa con mayor probabilidad de presentar Ki-67 elevado ($\geq 20\%$) y ulceración, con respecto a las variantes no nodulares. En base a estos resultados podemos decir que, en línea con la mayoría de los trabajos, el espesor de Breslow tiene mayor influencia que la variante histológica en relación a la probabilidad de presentar características predictivas de pronóstico adverso, cuando se analizan simultáneamente. Debido a que en nuestra casuística no hubo variantes nodulares delgadas (espesor menor a 1 o 2 mm), no existió la posibilidad de comparar con otras variantes de dicho espesor para poder estudiar si existen diferencias pronósticas entre ellas.

En cuanto a la citomorfología, en los melanomas se describe gran variabilidad, existiendo formas epiteloideas, fusiformes, nevoides, rabdoides, en anillo de sello, células pequeñas, entre otras. Se ha descrito mayor frecuencia de morfología epiteloide en variante nodular y componentes invasores de melanoma extensivo superficial, a diferencia de melanomas lentigo maligno y acrolentiginoso, con predominio de componente fusado (20, 33). En nuestro estudio se encontró asociación altamente significativa entre morfología epiteloide y variante nodular, tanto en el análisis univariado ($p < 0,0001$) como en análisis logístico multivariado, encontrándose valor predictivo positivo independiente de la variante nodular, aumentando 8,61 veces la chance de presentación de esta morfología celular (OR=8,61; IC=2,32-31,99). En la literatura se señala asociación de la misma con pronóstico adverso en melanoma uveal (33, 103), pero no existe la misma evidencia en el melanoma cutáneo.

La variante nodular también resultó ser un factor predictivo para ulceración, independiente de Breslow, incrementando 8,48 veces la chance de su presencia (OR=8,48; IC=2,74-26,25). Su reconocimiento como una entidad histopatológica de alto riesgo, biológicamente distinta y más agresiva, sería importante en los melanomas delgados, que representan la mayoría de los tumores que llegan actualmente a la consulta, y su identificación debería brindar información valiosa para predecir evolución y ser de ayuda para

seguimiento clínico del paciente (59). El hecho de que existan casos de melanomas primarios delgados que desarrollen metástasis a pesar de la escisión completa, hace que una evaluación en profundidad de la progresión de esta neoplasia sea crítica, y el descubrimiento de biomarcadores moleculares que identifiquen el grupo de melanomas de alto riesgo en su fase temprana es una necesidad.

Uno de estos potenciales biomarcadores es la proteína supresora tumoral BAP1. Con respecto a su expresión nuclear, la inmunohistoquímica para determinarla es una herramienta accesible, confiable y costo-efectiva (70, 115), y se utiliza con fines diagnósticos principalmente en mesotelioma, en donde la negatividad nuclear puede ayudar a distinguirlo de la hiperplasia mesotelial reactiva y metástasis de adenocarcinoma pulmonar. Además, se utiliza para el diagnóstico de MBAITs o BAPomas. La ausencia de expresión nuclear de BAP1 por este método tiene excelente correlación con la inactivación bialélica del gen (115, 132, 133, 134), y se observa en los tumores desarrollados en el síndrome hereditario, en los cuales ocurre una segunda mutación de tipo somático que se suma a la de línea germinal heterocigota existente en el otro alelo (“segundo golpe”) (101, 114). La expresión nuclear se mantiene en células normales (principalmente estromales e inflamatorias) de los individuos portadores de mutaciones de línea germinal, ya que el alelo conservado produce proteína normal y la inmunohistoquímica no es un método cuantitativo (70). En nuestro estudio pudimos observar tinción de células estromales e inflamatorias, con marcación nuclear y citoplasmática, en las muestras tumorales, que sirvieron como controles internos positivos de la inmunomarcación. Carbone y col (70) advirtieron que la interpretación de la inmunohistoquímica de BAP1 puede resultar confusa y en una revisión reciente mencionaron que la misma es nuclear y citoplasmática, reflejando la existencia de proteína en estado salvaje (*wild type*) o conservada (con ausencia de mutación genética). En nuestro estudio, 83% de los melanomas exhibió marcación nuclear positiva asociada a marcación citoplasmática, y por ende proteína BAP1 *wild-type*, al menos parcialmente, ya que no se observaron niveles uniformes de expresión en los tumores. Los otros

escenarios posibles que mencionan estos autores (70) son: marcación citoplasmática con ausencia de expresión nuclear, y ausencia completa de expresión en ambos compartimentos celulares, sin hacer mención a la positividad nuclear aislada. Esto último contrasta con otros trabajos, como el de De Rienzo (166), que lo consideró uno de los patrones de inmunomarcación.

En nuestra serie se encontró negatividad nuclear de BAP1 (expresión de 0%), en 17% de casos (n=20), frecuencia que resultó alta en comparación con trabajos previos, que han estudiado el estado mutacional de BAP1 en melanoma cutáneo esporádico. El primer grupo fue el de Wiesner y col en 2011 (115) que por método de secuenciación genética encontró mutación en 5% de un total de 60 casos, pero no proporcionaron detalles histomorfológicos de los tumores. Posteriormente le siguieron trabajos con inmunohistoquímica: Murali y col (131) que encontraron en su serie de 135 casos negatividad nuclear en 5,6%, Piris y col (116) en 2,5% de 40 casos, y en 4 casos esporádicos reportados recientemente por Aung y col (133), que confirmaron los hallazgos con técnica de FISH. Si bien no hemos realizado estudio de secuenciación de ADN ni FISH para detectar mutaciones del gen Bap1 y alteraciones a escala cromosómica, en la literatura se señala que la inmunohistoquímica es un método sensible y que puede detectar alteraciones y patrones de expresión que no son posibles de evaluar con el análisis de la estructura del ADN (115). Si bien nuestra frecuencia de negatividad nuclear de BAP1 fue considerablemente mayor a la encontrada por estos autores en el melanoma cutáneo esporádico, se encuentra en claro contraste con lo que sucede en el melanoma uveal, que presenta una frecuencia de negatividad de 43-58% (103, 147, 148).

El avance en el conocimiento del fenotipo del síndrome hereditario de predisposición al cáncer BAP1, descrito hace pocos años (101) permitió elaborar las actuales guías de *screening* de posibles casos hereditarios (20). La inmunohistoquímica debido a su alta sensibilidad se valida en este contexto como método de cribado de inactivación bialélica de BAP1 al demostrar negatividad de expresión en neoplasias como BAPomas, que son los

marcadores cutáneos de la enfermedad, sobre todo cuando son múltiples y de presentación temprana (20, 115, 119). También podría sospecharse detectando ausencia completa de expresión de la proteína en los tumores malignos más frecuentes desarrollados en el síndrome, como el melanoma uveal y mesotelioma. En nuestro estudio establecimos inicialmente, como criterio de inclusión de la muestra, a los melanomas esporádicos, condición asignada en base a ausencia de sospecha clínica de síndrome hereditario por parte de los médicos tratantes. El hallazgo posterior de casos de melanomas con negatividad nuclear de BAP1 (17%) puso en consideración su probable naturaleza hereditaria, no obstante, la misma fue desestimada debido a la ausencia de sospecha clínica de síndrome hereditario, y en la búsqueda posterior de datos clínicos ningún paciente presentaba criterios para el mismo, como el antecedente de múltiples MBAITs con presentación a edades tempranas, presencia de otras neoplasias como melanoma uveal, mesotelioma y carcinoma renal, ni antecedentes familiares (20). Además, 53% de pacientes presentó más de 60 años, y en el síndrome hereditario la aparición del primer episodio de melanoma cutáneo suele darse a edades más tempranas y por lo general asociado con melanoma uveal (101). Por otra parte, la presencia de marcación citoplasmática que hemos observado en estos casos, nos induce a hipotetizar que la proteína está presente y por lo tanto no existiría inactivación bialélica del gen, característica que se discutirá más adelante y en la que no se ha profundizado demasiado en la literatura. A pesar de lo expuesto, el estudio de secuenciación de ADN para descartar mutaciones de línea germinal podría considerarse para confirmar esta condición de neoplasias esporádicas, debido a que el síndrome es de descripción reciente y se van sumando nuevas neoplasias a la lista de tumores pertenecientes a su espectro clínico (105, 106, 108), pudiendo generarse cambios en los protocolos de *screening* con la aparición de nuevas y distintas evidencias en el futuro. Además, una característica de este síndrome es la penetrancia incompleta y variable (101, 109), lo que puede dificultar la detección de algunos casos.

La expresión nuclear de BAP1 también puede ser utilizada con fines pronósticos. Su ausencia de expresión, que revela indirectamente mutaciones de línea germinal o de tipo somático, representa un factor de mal pronóstico en algunas neoplasias, tanto esporádicas como familiares, como en el melanoma uveal (103, 148, 163), carcinoma renal (150) y colangiocarcinoma (154). Se ha estudiado en varios trabajos la expresión de BAP1 nuclear en según niveles de expresión, con diferentes puntos de corte, en lugar de valorar este parámetro sólo como presente o ausente. Uno de estos puntos de corte es 33%, que divide a la expresión en alta y baja (149), y otros autores utilizaron las categorías negativo/bajo correspondiendo a menos de 10%, positivo heterogéneo, de 10 a 90%, y positivo difuso cuando es superior a 90% (91). En nuestro estudio hemos categorizado la expresión de BAP1 nuclear en baja y alta, tomando como punto de corte 33%, a diferencia de la mayoría de los autores que sólo reportaron negatividad o positividad de dicha expresión, y estas categorías no se han estudiado previamente en melanomas cutáneos esporádicos (115, 116, 131, 133). La elección de este valor de *cut-off* con respecto a otros estuvo basada en la distribución pareja de los casos de nuestro estudio en dichas categorías, hecho favorable para la realización de pruebas de significación estadística, ya que la mediana de BAP1 nuclear tuvo un valor de 34%. Si bien en la literatura no se ha explicado el motivo de esta categorización, consideramos que la misma es adecuada puesto que en la fase de crecimiento vertical de los melanomas cutáneos suelen existir distintos clones celulares malignos, genéticamente heterogéneos, y el nivel de expresión de la proteína BAP1 puede mostrar variaciones entre ellos. La presencia de este fenómeno de clonalidad o patrón clonal está descrita en el melanoma nodular, haciendo referencia a distintas morfologías celulares (33), y la existencia de algunos clones neoplásicos con mutación de BAP1 y otros no, podrían hacer necesaria la evaluación de la expresión de la proteína según niveles o estratos, en el contexto de un melanoma esporádico, a diferencia de los cánceres del síndrome familiar, que presentan ausencia de expresión en todas las células tumorales.

En nuestra serie, la expresión baja (<33%) de BAP1 nuclear tuvo asociación muy significativa con variante nodular ($p < 0,0001$), en línea con el trabajo de Aung y col (133). El estudio piloto de Murali y col en 2013 (131) fue el primero en relacionar la expresión de BAP1 por inmunohistoquímica en melanomas cutáneos primarios esporádicos con variables clínico-patológicas y determinar su impacto pronóstico, e incluyeron en su estudio, además de las cuatro variantes clínico-patológicas principales de Clark, la variante desmoplásica, encontrando fuerte asociación con esta última (frecuencia de 21,7% en este grupo), la cual no fue incluida en nuestra casuística. Estos autores no encontraron relación significativa con la variante nodular en contraste con nuestro estudio. Esta diferencia podría explicarse al menos en parte, en que dicha variante no corresponde a un subtipo específico de melanoma, según la clasificación WHO 2018 (33, 34), como se ha comentado. Por otra parte, en la literatura se señala relación entre expresión baja de BAP1 nuclear y sexo femenino (140), a diferencia de nuestros hallazgos que no mostraron diferencia significativa entre sexos. Además, se ha señalado asociación entre pérdida de BAP1 y microambiente tumoral de tipo inflamatorio, en carcinoma renal de células claras (181), e infiltrado linfocitario de tipo intenso o *brisk* en MBAITs (33), a diferencia del melanoma uveal en el que se asoció a un microambiente inmunosupresivo (182). En nuestro estudio, no se observó relación significativa entre expresión baja de BAP1 e infiltrado linfocitario *brisk*, como se describió en MBAITs, pero al relacionarse esta expresión significativamente con la variante nodular, que tuvo predominio de infiltrado *no brisk* ($p = 0,0356$), de peor pronóstico (53, 54), indicaría más una relación con este último tipo de infiltrado linfocitario. Estas asociaciones podrían ser valiosas en la identificación de pacientes potencialmente respondedores a terapias bloqueadoras de *checkpoint* inmunes, como agentes anti-PD1 (141).

Las evidencias en cuanto al significado pronóstico de la pérdida de expresión nuclear de BAP1 son contradictorias, y si bien en varios tumores se asocia a pronóstico adverso, como se ha comentado, contrariamente se ha observado que en mesoteliomas familiares la ausencia de BAP1 se asocia

significativamente a mejor pronóstico (137). El estudio de Murali y col (131) encontró asociación significativa independiente entre ausencia de expresión nuclear de BAP1 en el melanoma cutáneo esporádico con peor sobrevida libre de enfermedad y sobrevida específica de melanoma, pero no con sobrevida global, en análisis multivariados, ajustados por estadio tumoral. Si bien estudiaron la evolución clínica de los pacientes, la serie fue pequeña y con tiempo de seguimiento corto, y la mayoría de los melanomas fueron gruesos. Contrariamente, de forma reciente, Liu-Smith y col (158) observaron relación con mejor pronóstico en dicha neoplasia, y encontraron roles opuestos de BAP1 en melanoma cutáneo y uveal, observando que bajos niveles de ARN mensajero se asociaron con mejor sobrevida global en pacientes con melanoma cutáneo, en contraste con el uveal. No obstante, cabe destacar que los niveles de ARN mensajero no equivalen a existencia de proteína normal, y se pueden encontrar anomalías a nivel traduccional o postraduccional que generen proteínas defectuosas con alteración del funcionamiento normal de la misma. Kumar y col (157), por otra parte, observaron que la depleción genética de BAP1 reduce la proliferación, induce apoptosis e inhibe el crecimiento tumoral in vitro, y en líneas celulares y tisulares mostraron que la expresión de BAP1 se mantenía, en vez de perderse, en melanomas primarios en comparación con nevus y piel normal. En línea con las observaciones de Murali y col (131), en nuestro estudio encontramos asociación estadísticamente significativa, en análisis univariados, entre expresión nuclear baja de BAP1 nuclear (<33%) y parámetros asociados con peor pronóstico: fase de crecimiento vertical, mayor espesor de Breslow, niveles de Clark IV-V, ulceración y variante nodular (valores de $p < 0,0001$). No hubo relación significativa con permeaciones vasculares, infiltraciones perineurales ni microsatelitosis, pero dicho hallazgo puede deberse a la baja frecuencia encontrada de dichas características. No obstante, en modelos de regresión logística múltiple ajustados por edad y sexo, estudiado junto con las covariables regresoras Ki-67 y BAP1 citoplasmático, no se encontró relación significativa entre expresión baja de BAP1 nuclear y mayor probabilidad de presentar diseminación tumoral regional al diagnóstico inicial. En cambio, en

un modelo similar sí existió relación significativa independiente con ulceración, disminuyendo 2% el riesgo de presentarla por cada unidad porcentual de incremento en BAP1 nuclear (OR=0,98; p=0,0349). Debido a las evidencias contradictorias existentes en la literatura, al día de hoy la utilidad pronóstica de BAP1 en el melanoma cutáneo no está establecida y su rol en esta neoplasia no es claro. Reconociendo las limitaciones de nuestro estudio y la de los trabajos previos, debemos mencionar que para poder establecer el rol pronóstico independiente de la pérdida de BAP1 se requiere, además de una cohorte representativa de los melanomas de la población general (mayor proporción de tumores delgados), un seguimiento clínico prolongado.

Se ha descrito en la literatura que los efectos celulares de BAP1 son múltiples y variables, debido a la interacción con múltiples proteínas, conformando complejos multiproteicos y ejerciendo influencia sobre el crecimiento, diferenciación y proliferación celular (74-78). Esta última actividad es contraria a su función supresora de tumores, caracterizada por regulación de la proliferación e inducción de apoptosis (66-69, 81, 82), poniendo de manifiesto la complejidad de sus acciones, que son dependientes de la célula y el contexto (157). En nuestro estudio hubo asociación significativa entre categorías de expresión baja de BAP1 nuclear (<33%) y Ki-67 elevado (igual o mayor a 20%) (p<0,0001), y la correlación entre porcentaje de expresión nuclear de BAP1 y de Ki-67 fue inversa y con tendencia a ser significativa (r=-0,1613, p=0,08). En la bibliografía no se han encontrado trabajos que relacionen la expresión inmunohistoquímica de BAP1 nuclear con el índice de proliferación celular. No obstante, la modulación que ejerce esta proteína sobre la proliferación celular en condiciones normales, como se ha descrito, apoyaría nuestro hallazgo de incremento de la cifra de Ki-67 a la par de la disminución en los niveles de expresión de BAP1, característica que como hemos expuesto, se asoció a parámetros tumorales de mayor agresividad. En relación a estos últimos, un trabajo reciente encontró que la inactivación bialélica de BAP1 se asoció a mayor grado tumoral en carcinoma colorrectal y renal (p<0,0001) (140). El grado tumoral en melanoma cutáneo no es una característica contemplada en los protocolos de reporte histopatológico (46),

y no existen criterios definidos para valorarla, quedando su connotación pronóstica solapada por otros parámetros (principalmente espesor de Breslow y ulceración), por lo cual no se incluyó la misma en el presente estudio.

Por otra parte, hemos encontrado asociación significativa entre expresión baja de BAP1 nuclear (<33%) y ausencia de remanentes névicos ($p=0,0219$). Esta última se ha descrito como una característica de mal pronóstico (31, 32, 58). Aung y col (133) encontraron asociación con BAPoma adyacente, y todos los tumores que estudiaron presentaron un componente de células epiteloideas combinado con células más pequeñas. Estas características fenotípicas son compatibles con melanoma asociado a BAP1 inactivado, un subtipo raro, incorporado recientemente en la clasificación WHO 2018 (33, 34) (Tabla 1), cuya lesión precursora es el BAPoma. En nuestra serie se identificó positividad nuclear en todos los remanentes névicos encontrados, que fueron de tipo displásico, no observando BAPoma residual en ningún caso. Este último también se denomina “nevus clonal” debido a la presencia de un clon de células epiteloideas con inactivación de la proteína BAP1, separadas del resto de células que son más pequeñas y positivas. Como se comentó anteriormente, el melanoma nodular no es una variante específica según WHO 2018, y se le atribuye un origen “de novo”, sin nevus melanocítico previo. Sin embargo, en vista de las asociaciones encontradas en nuestra serie y en la literatura, se podría hipotetizar un origen en la dermis a partir de un clon de células epiteloideas, pertenecientes a un BAPoma pequeño y no detectado clínicamente, avanzando rápidamente hacia un estadio intermedio de melanocitoma y posteriormente melanoma. A favor de lo expuesto se puede mencionar que estos tumores con BAP1 inactivado se incluyen en la vía del bajo daño solar acumulado en la clasificación de WHO 2018 (33), junto con la variante extensiva superficial, y la mayoría de melanomas nodulares presentaron nula o escasa elastosis solar en nuestra casuística. El hecho de no haber encontrado remanente de BAPoma en nuestra serie, no descartaría esta asociación hipotética, ya que el crecimiento del clon celular maligno puede reemplazar rápidamente el componente benigno, siendo este crecimiento rápido y agresivo, característico del

melanoma nodular. Por otra parte, el fenómeno de clonalidad descrito en esta variante (33), caracterizado por variabilidad citomorfológica intralesional, podría apoyar un origen e indicar que se encuentra emparentado con el “nevus clonal”, que también presenta esta característica morfológica peculiar a diferencia del resto de los nevos melanocíticos. El origen hipotético propuesto elevaría considerablemente la frecuencia descrita de esta vía de melanomagénesis (23, 33).

En nuestro estudio observamos, además, asociación muy significativa entre expresión baja de BAP1 nuclear y citomorfoloía epiteloide ($p < 0,0001$), y en modelo de regresión logística, considerando a BAP1 nuclear como variable regresora continua, se encontró un efecto protector con valor predictivo independiente para dicha característica celular (OR=0,91; IC=0,88-0,94), apreciándose que por cada unidad de incremento en el porcentaje de BAP1 nuclear, disminuyó 9% la probabilidad de presentar células epiteloides. La relación entre BAP1 y citomorfoloía epiteloide se describió previamente en otros tumores, como melanoma uveal (33, 103, 163) y mesotelioma (123) además del BAPoma (20, 33, 115), y en la literatura revisada sólo el estudio de Aung y col (133) hizo mención a esta característica en el melanoma cutáneo esporádico, con la limitación de que la serie fue pequeña. Estos hallazgos están en línea con el descubrimiento de que la inactivación de BAP1 se asocia a desarrollo de morfoloía celular epiteloide in vitro e in vivo (103).

Por otra parte, nuestra observación de una diferencia altamente significativa de expresión nuclear alta de BAP1 en la fase radial con respecto a la fase vertical ($p < 0,0001$), sumada a la expresión normal de la proteína encontrada en los melanocitos y nevos melanocíticos residuales adyacentes a los melanomas estudiados, nos induce a hipotetizar que existirían mutaciones progresivas en la vía de melanomagénesis, que llevan a disminución de los niveles de BAP1 con el crecimiento y transformación progresiva de las lesiones, sobre todo cuando comienza la fase de crecimiento vertical, a expensas de la selección de clones celulares más agresivos. En línea con ello, el estudio de Kumar y col (157) señaló existencia de mayores niveles de ARN mensajero de BAP1 en melanomas cutáneos delgados (≤ 1

mm) comparado con melanomas gruesos. La incorporación en nuestra casuística de una proporción significativa de melanomas delgados (38%), a diferencia de trabajos previos (131) permitió establecer esta comparación entre las dos fases de crecimiento del melanoma cutáneo.

Si bien en nuestro estudio no se contaron con datos de seguimiento clínico, la falta de relación significativa observada en regresiones logísticas múltiples con metástasis regional, el factor pronóstico más importante sin tener en cuenta metástasis a distancia, podría deberse en parte a que la expresión conservada de BAP1 nuclear no siempre equivale a proteína normal. En este caso pueden existir mutaciones con pérdida del dominio funcional necesario para su actividad supresora tumoral, pero con retención de su capacidad de localización nuclear, como propusieron ciertos autores (136). Por otra parte, a diferencia del estudio de Murali y col (131), que observaron asociación con peor pronóstico, no hemos incluido la variante desmoplásica, que en dicho estudio presentó alta frecuencia de inactivación de BAP1. Estudios adicionales con una cohorte más grande, que incluya la totalidad de variantes histológicas del melanoma cutáneo primario, además del seguimiento clínico de los casos, se necesitarán para validar como factor pronóstico la pérdida de BAP1 nuclear en esta neoplasia maligna.

La pérdida de BAP1 nuclear también se erige como un potencial biomarcador predictivo, que puede indicar mayor sensibilidad de las células de melanoma a distintas terapias emergentes, como inhibidores de HDAC, PARP y gemcitabina (172, 173). Además, estudios en ratones mostraron que los melanomas con inactivación de BAP1 que albergan mutaciones BRAF^{V600E} son más sensibles a la terapia combinada de vemurafenib con cobimetinib, por lo que conocer el *status* mutacional de este gen o la expresión de la proteína, sumado a la determinación de mutaciones del gen BRAF permitirá seleccionar pacientes con mejor respuesta a ese régimen terapéutico que actualmente es *standard of care* en melanoma metastásico (174). En nuestro estudio no hemos incluido melanomas metastásicos, en los cuales la determinación del estado mutacional de BRAF es rutinaria. La realización de inmunohistoquímica de BAP1 en estos casos, debido a su alta sensibilidad y

las demás ventajas que hemos expuesto, podrá ser de gran importancia en la selección de la terapia combinada antes mencionada, además de otras terapias *target*, como principal esquema terapéutico o en el contexto de adyuvancia.

En relación a los hallazgos de la expresión citoplasmática de BAP1, hemos observado marcación en esta localización subcelular en 100% de los casos (n=116). El transporte de BAP1 entre citoplasma y núcleo es un fenómeno conocido, descrito por Mashtalir y col (160), y si bien antes se consideraba que el rol supresor de tumores de BAP1 dependía exclusivamente de su localización nuclear (69), hoy se conoce que desempeña funciones en el citoplasma que son importantes para evitar el desarrollo de neoplasias (81-88). La marcación citoplasmática no representó el foco de atención en la mayoría de los estudios previos que se realizaron explorando la utilidad diagnóstica y pronóstica de BAP1 (20, 33, 115, 116, 131), que se centraron en la marcación nuclear y consideraron a la marcación citoplasmática como un probable error de técnica o *background* (fondo) (115, 162). Los anticuerpos primarios disponibles para inmunohistoquímica anti-BAP1, entre ellos el utilizado en nuestro estudio (Abcam®), recomiendan como tejidos de control preferentemente testículo, ovario y placenta, y mencionan como interpretación de señal positiva, localización “nuclear y citoplasmática, pero principalmente nuclear”, y la marcación en citoplasma normalmente es débil y difusa, tipo fondo (*background*). No es casual que los tejidos recomendados como controles que muestran señal positiva en ambos compartimentos celulares, reflejando el fuerte rol supresor tumoral atribuido a esta deubiquitinasa, sean gónadas, ya que estos tejidos tienen alta necesidad de supresión tumoral debido las numerosas divisiones celulares y gametogénesis.

Como se ha mencionado previamente, en nuestra serie la marcación citoplasmática estuvo presente, además, en los casos con expresión de BAP1 nuclear negativa (17%), lo que nos induce a hipotetizar que la proteína es codificada y se encuentra en la célula, con alteraciones que le impiden trasladarse al núcleo, fenómeno que estudiaron otros autores, que observaron

que en líneas celulares derivadas de pacientes con mesotelioma, la proteína BAP1 mutante se asoció con el secuestro citoplasmático de la misma debido a la pérdida de la señal de localización nuclear (161). La proteína secuestrada en el citoplasma probablemente conserve parte de las funciones supresoras tumorales normalmente atribuidas a esta localización subcelular (81-88), pudiendo explicar el comportamiento menos agresivo de lo esperado a pesar de la negatividad de BAP1 nuclear asociada, como han observado De Rienzo y col (166) que encontraron que la positividad citoplasmática difusa aislada de BAP1 se asocia con mejor pronóstico en mesotelioma, comparada con la marcación negativa de ambos compartimentos. Estos resultados están en línea con nuestros hallazgos (falta de relación significativa entre negatividad/expresión baja de BAP1 nuclear y presencia de metástasis) y contrastan con el peor pronóstico encontrado por Murali y col (131), que no hicieron referencia a la marcación citoplasmática.

Nuestro hallazgo de marcación citoplasmática de BAP1 en la totalidad de los casos está en contraste con el trabajo de Farquhar y col (163) realizado en melanoma uveal, y el mismo contrasta con la descripción de escenarios posibles de inmunomarcación, realizada por Carbone y col (70), en la cual no se menciona la existencia de positividad nuclear de BAP1 de forma aislada. Hemos clasificado la expresión citoplasmática de BAP1 basándonos en la categorización de patrones de expresión propuesta por los primeros autores (163), en patrón predominantemente “focal perinuclear” y “difuso”. El patrón perinuclear focal estuvo presente en 30,17% (n=35) de casos de nuestra serie. El mismo fue descrito inicialmente por Gammon y col (162), que lo denominaron como “perinuclear en grumo” o “*clumped perinuclear pattern*”, con una frecuencia de 53% en BAPomas. Estos autores no encontraron relación significativa entre dicho patrón y peor pronóstico, mientras que Farquhar y col (163) observaron asociación del mismo a características histológicas de “alto riesgo” en melanoma uveal, como citomorfología epiteloide y asas de tejido conectivo PAS positivas, pero no observaron relación significativa con la sobrevida general. Posteriormente, Zhang y col (165) encontraron que la alta expresión citoplasmática de BAP1 en gliomas

se asoció significativamente con peor pronóstico comparado con la baja expresión, aunque no mencionaron una localización subcelular específica, y como se comentó anteriormente, el grupo de De Rienzo y col (166) observó asociación con mejor pronóstico de la positividad citoplasmática aislada de BAP1, sin hacer mención del patrón perinuclear focal. En nuestro estudio, este patrón se asoció de forma significativa a parámetros histopatológicos asociados con pronóstico adverso: variante nodular ($p < 0,0001$), fase vertical ($p < 0,0001$), espesor de Breslow mayor a 1 mm ($p < 0,0001$), niveles de Clark IV y V ($p < 0,0001$), ulceración ($p < 0,0001$), invasión vascular ($p = 0,0076$) y Ki-67 elevado ($p = 0,0007$). Además, se asoció significativamente con ausencia de remanente névico ($p = 0,0023$) y con expresión baja de BAP1 nuclear ($< 33\%$) ($p < 0,0001$). En modelos de regresión logística ajustados por edad y sexo e incluyendo BAP1 nuclear como covariable de interés, se observó que el patrón perinuclear focal representa un factor predictivo positivo para Ki-67 elevado, aumentando 4,58 veces su chance (OR=4,58; IC 1,38-15,25), y para ulceración, con valor predictivo independiente del Ki-67, que fue modelado en conjunto como variable regresora continua (OR=3,96; IC=1,06-14,80).

En nuestro estudio, además, la tinción perinuclear focal se observó exclusivamente en células de melanoma con citomorfología epiteloide ($p < 0,0001$), en línea con los hallazgos de Gammon y col (162) y Farquhar y col (163). En estos dos últimos trabajos dicho patrón también se asoció a tinción nuclear negativa de BAP1, al igual que en nuestra serie, donde se observó negatividad de marcación nuclear en todos los casos con patrón perinuclear focal ($p < 0,0001$). El estudio de Garfield y col (164) también observó la presencia de este patrón citoplasmático en BAPomas, asociándose a morfología celular rabdoide e hipotetizando que la misma puede desarrollarse por un desplazamiento que ejerce la acumulación de proteína BAP1 anómala en el citoplasma, con plegamiento tipo amiloide, sobre el núcleo, desplazándolo hacia uno de los polos de la célula. En nuestra serie no se encontraron melanomas con morfología celular rabdoide, y podemos hipotetizar que el fenotipo celular epiteloide observado se podría deber en parte a este desplazamiento físico ejercido por la proteína acumulada sobre

los componentes intracelulares, lo que modificaría la forma celular. También podría participar el fenómeno de dediferenciación, que generaría un cambio de conformación de las células melanocíticas durante la transformación neoplásica, atribuido a la pérdida de los efectos normales de la proteína BAP1 a nivel nuclear, entre los cuales se encuentra la regulación la diferenciación celular (84). En relación a este último aspecto, BAP1 participa en el desarrollo de la cresta neural, estructura que da origen a los melanocitos, que se dediferencian al padecer mutaciones en esta proteína y viran hacia un fenotipo *stem cell-like* (100). Otros mecanismos posibles de la alteración de la forma celular y desarrollo de morfología epiteloide podrían relacionarse con la disrupción del citoesqueleto generada por las mutaciones de BAP1, que según estudios recientes es de importancia en la regulación y mantenimiento de la estabilidad del mismo (99), y a la inducción del fenómeno de transición epitelio-mesenquimal (TEM), al cual se ha asociado recientemente la pérdida nuclear de BAP1 en mesotelioma pleural (166).

Farquhar y col (163) destacaron que el patrón citoplasmático perinuclear focal es un hallazgo reproducible en tinciones repetidas, y en cuanto a su reconocimiento morfológico, basado en la forma de grumo o capuchón a un lado del núcleo, en nuestro estudio tuvo alta reproducibilidad interobservador, con un acuerdo casi perfecto entre observadores independientes (coeficiente kappa 0,90). No existen actualmente evidencias suficientes de la influencia de este patrón citoplasmático de BAP1 sobre el pronóstico, y la mayoría de estudios que indicaron asociación entre pérdida de BAP1 y peor resultado clínico utilizaron metodologías de secuenciación de ADN y FISH, que no evalúan la expresión de la proteína y por lo tanto no permiten reconocer este patrón, fácilmente detectable por inmunohistoquímica. Por otro lado, en contraste con nuestro estudio, la revisión que realizaron Carbone y col (70) en relación a aspectos conflictivos de esta última técnica, no hizo referencia a la presencia de patrón citoplasmático difuso de BAP1 en casos con ausencia de expresión nuclear, mencionando que en estos casos existe tinción citoplasmática de tipo “amiloidea”. No obstante, el reconocimiento de estos patrones es importante ya que pueden reflejar la existencia de distintos tipos

de mutaciones, con diferentes grados de severidad y efectos fenotípicos, requiriéndose su confirmación con estudios de secuenciación genética. Al respecto, se estudió que el patrón perinuclear focal de BAP1 se relaciona con mutaciones *missense* del dominio catalítico (163, 167), con exposición de residuos hidrófobos de la proteína, que inducen su agregación en el citoplasma, a diferencia del patrón citoplasmático difuso, que no se asoció a ningún tipo de mutación específica (166). Es probable que el patrón de tinción citoplasmático difuso de BAP1 presente realmente mejor pronóstico que el perinuclear, ya que se asemeja al hallazgo obtenido en la inmunomarcación normal, por lo que existiría menor alteración de la proteína y conservación parcial de sus funciones antitumorales (70). Por otra parte, el escenario de ausencia de expresión nuclear de la proteína, con pérdida de gran parte de sus funciones supresoras tumorales, combinada con la presencia de proteína citoplasmática alterada y con plegamiento anómalo, incapaz de cumplir con sus actividades antitumorales en este compartimento celular, nos induce a hipotetizar que la presencia del patrón citoplasmático perinuclear focal tiene un impacto similar a la ausencia completa de proteína BAP1 (inactivación bialélica) en el pronóstico, oscureciendo el mismo como se ha descrito en otras neoplasias (103, 147).

El significado biológico de este patrón aún debe determinarse, y Bhattacharya y col (167) han investigado la hipótesis de que la localización perinuclear puede ser el resultado de mutaciones que determinan inhabilidad para un correcto procesamiento y transporte de la proteína, quedando atrapada en el aparato de Golgi, confirmando esto último y demostrando la ocurrencia de un plegamiento anómalo de la misma, de tipo beta amiloide, que se presume podría intervenir en el mantenimiento y progresión del fenotipo neoplásico maligno, lo cual resulta contrario a la función original supresora de tumores de BAP1 (69). Lo anteriormente expuesto pone en consideración la hipótesis de que el cáncer es una enfermedad relacionada con amiloide y proteínas priónicas, que inducen plegamiento anómalo de proteínas normales (169, 170, 171). No obstante, los mecanismos moleculares exactos que sustentan el patrón citoplasmático de BAP1

perinuclear focal aún permanecen en las sombras y justifican estudios adicionales con otras metodologías, que podrán aportar mayor precisión a estos hallazgos. Lo anteriormente expuesto podría explicar los resultados contradictorios existentes en la literatura, en relación al efecto pronóstico de las mutaciones de BAP1 con ausencia de expresión nuclear en el melanoma cutáneo esporádico, ya que los estudios revisados no han valorado simultáneamente a la ausencia o expresión nuclear baja de BAP1, la presencia del patrón citoplasmático perinuclear focal en células tumorales (131, 140, 157). Se requieren de estudios adicionales más grandes para determinar si el patrón de BAP1 citoplasmático perinuclear focal es de relevancia clínica en esta y otras neoplasias malignas. Por otra parte, hemos utilizado una categorización binaria de los patrones citoplasmáticos de expresión de BAP1 (predominantemente difuso o perinuclear), sin tener en cuenta las marcaciones focales del patrón perinuclear. En el caso de que nuevas evidencias le atribuyeran un valor pronóstico, sería de interés evaluar la expresión focal de dicho patrón en los melanomas delgados (≤ 1 mm), que son los que con mayor frecuencia llegan a la consulta médica (20), y de esta manera podría ayudar a identificar pacientes de riesgo que necesiten de un manejo guiado acorde al mismo, en vista de que algunos pueden desarrollar metástasis de forma impredecible (31, 33, 59).

Por otra parte, la asociación fuertemente encontrada entre el patrón citoplasmático perinuclear focal de BAP1 con variante nodular ($p < 0,0001$), la cual no fue observada en trabajos previos (116, 131, 133), pone en consideración que esta variante podría representar una entidad biológicamente distinta y más agresiva, como señalan algunos trabajos (31, 33) de forma contraria a la nueva clasificación de WHO (33), y en la cual la alta frecuencia de inactivación de BAP1, tanto a nivel nuclear como citoplasmático (proteína con plegamiento anómalo y no funcional, correspondiente al patrón perinuclear focal), podrían relacionarse con este peor comportamiento y mayor velocidad de multiplicación celular, debido a la pérdida de sus funciones supresoras tumorales normales en ambos compartimentos. Además, paradójicamente, la proteína BAP1 con

plegamiento anómalo de tipo beta amiloide podría agravar el fenotipo maligno, al liberarse al espacio extracelular tras la muerte de células neoplásicas e induciendo el plegamiento anómalo de proteínas normales, comportándose de forma similar a un prion, y explicando el comportamiento más agresivo de esta variante de melanoma (170, 171).

Finalmente, cabe destacar que el estudio de las distintas mutaciones de BAP1 y las alteraciones en su expresión, nos ayudarán a comprender la biología tumoral y el desarrollo terapéutico potencial para combatir el cáncer en general. Además, en el melanoma cutáneo esporádico, uno de los cánceres de mayor mortalidad, la investigación en profundidad de la expresión de BAP1, y su validación como biomarcador tisular pronóstico y predictivo, hecho emergente en otras neoplasias, adquiere gran importancia para intentar esclarecer las evidencias contradictorias existentes. Esto permitirá el desarrollo de nuevas guías clínicas para un manejo protocolizado de los pacientes y la planificación de esquemas terapéuticos, que podrán requerir para su indicación en un futuro próximo, el análisis del estado mutacional de BAP1 y la alteración en sus patrones de expresión. Este estudio tendrá como objetivo seleccionar pacientes potencialmente respondedores a nuevas terapias o con mayor sensibilidad a drogas existentes, mediante secuenciación de ADN y *screening* previo con inmunohistoquímica, que es una técnica altamente sensible, confiable, rápida y costo-efectiva, como ocurre con su aplicación en el área diagnóstica.

4.2. Conclusiones

En base a los objetivos propuestos, y a partir de los resultados del presente trabajo surgen las siguientes conclusiones:

- 1) La variante extensiva superficial de melanoma resultó la más frecuente del estudio (46%), seguida por la variante nodular (26%). Con menor frecuencia le siguieron la variante acrolentiginosa (15%) y lentigo maligno (13%). Hubo frecuencia similar en ambos sexos. La localización más frecuente de los melanomas fue en tronco en el sexo masculino, y miembro inferior en sexo femenino.
- 2) La variante nodular se asoció significativamente a parámetros histopatológicos adversos: mayor espesor de Breslow y niveles de Clark IV-V, ulceración, mayor índice mitótico, infiltrado linfocitario *no brisk*, ausencia de regresión y nevus residual. Además, presentó fuerte asociación con citomorfología epiteloide ($p < 0,0001$).
- 3) La variante extensiva superficial predominó en tronco (54%), presentó nevus melanocítico residual (displásico) en 52% y presentó mayor frecuencia de infiltrado linfocitario *brisk* (44%) y regresión tumoral (48%) en relación a las otras variantes. Por otro lado, lentigo maligno se asoció a mayor edad de presentación, fase de crecimiento radial y menor índice mitótico.
- 4) El índice de proliferación celular fue significativamente superior en melanomas nodulares e inferior en lentigo maligno, y mostró correlación positiva significativa con índice mitótico ($r=0,4718$) y espesor de Breslow ($r=3908$). En modelos logísticos multivariados ajustados por edad y sexo, se asoció significativamente de forma independiente con la probabilidad de presentar metástasis regional al momento del diagnóstico inicial (OR 1,07; IC 95%) y ulceración (1,10; IC 95%).

- 5) Con respecto a la expresión nuclear de la proteína BAP1, hubo menor expresión en variante nodular comparada con extensivo superficial y lentigo maligno, sin diferencia significativa con acrolentiginoso. Por otra parte, hubo correlación inversa significativa con índice mitótico ($r=-0,3256$) y espesor de Breslow ($r=-0,2724$), y con índice de proliferación celular la correlación fue inversa y tuvo tendencia a ser significativa.
- 6) Valorando la expresión nuclear de BAP1 según grupos de alta y baja expresión, considerando como punto de corte 33%, se encontró relación estadísticamente significativa entre la expresión baja y variante nodular, ausencia de nevus remanente, fase crecimiento vertical, Breslow mayor a 1 mm, niveles de Clark IV y V, ulceración, morfología epiteloide e índice de proliferación celular $\geq 20\%$.
- 7) Se encontró expresión citoplasmática de BAP1 en el 100% de los casos. Se observaron dos tipos de patrones de expresión: predominantemente difuso y predominantemente perinuclear focal, el primero en 70% de los casos y el segundo en 30%.
- 8) El patrón citoplasmático perinuclear focal de BAP1 se asoció de forma significativa a variante nodular, ausencia de nevus remanente, fase crecimiento vertical, Breslow mayor a 1 mm, niveles de Clark IV y V, ulceración, morfología epiteloide e índice de proliferación celular $\geq 20\%$. También se observó asociación significativa con expresión nuclear baja de BAP1 $< 33\%$ ($p < 0,0001$) e invasión vascular ($p = 0,0076$).
- 9) Utilizando modelos de regresión logística múltiple ajustados por sexo y edad, se encontró que tanto la expresión nuclear baja de BAP1 nuclear ($< 33\%$) como la presencia de patrón citoplasmático de BAP1 perinuclear focal, resultan factores predictivos para presencia de ulceración, y el patrón citoplasmático perinuclear lo es también para Ki-67 alto ($\geq 20\%$). Además, el incremento de BAP1 nuclear tuvo un efecto protector significativo independiente en relación a la probabilidad de

presentar citomorfología epiteloide (OR=0,91; IC 95%), ajustado por sexo, edad y Ki-67.

- 10) El espesor tumoral de Breslow, la localización en tronco (en relación a cabeza y cuello) y la ulceración mostraron valor predictivo positivo independiente en relación a la probabilidad de presentar metástasis regional al momento del diagnóstico inicial en el análisis de regresión logística multivariado. En estos modelos, la variante nodular y los patrones nucleares y citoplasmáticos de BAP1 no tuvieron un efecto significativo independiente.

Como hechos emergentes del presente trabajo, se determinaron relaciones entre parámetros clínicos, histopatológicos e índice de proliferación celular con los patrones de expresión por inmunohistoquímica de la proteína supresora tumoral BAP1 en el melanoma cutáneo esporádico primario, que consideramos son interés del mismo; por lo tanto, mencionamos que:

- En nuestro estudio determinamos que la variante nodular de melanoma se asocia significativamente a características relacionadas con pronóstico adverso, en comparación con el resto de variantes: mayor espesor tumoral, ulceración, niveles de Clark IV-V, mayor número de mitosis, infiltrado *no brisk*, ausencia de regresión y nevus residual, y mayor índice de proliferación celular. No obstante, en análisis logístico multivariado ajustado por Breslow, no mostró valor predictivo significativo independiente para metástasis regional. En cambio, el espesor de Breslow, ulceración, localización en tronco y Ki-67 sí tuvieron una relación significativa independiente con este parámetro.
- La expresión nuclear baja (<33%) y el patrón citoplasmático perinuclear focal de BAP1 se asociaron de manera muy significativa a variante nodular y citomorfología epiteloide ($p < 0,0001$). En modelo de regresión

logística ajustado por edad y sexo, estos patrones aumentaron significativamente la probabilidad de presentar Ki-67 elevado, ulceración y citomorfología epiteloides. Sin embargo, no se observó relación significativa con la probabilidad de presentar metástasis regional al momento del diagnóstico inicial.

- Las asociaciones encontradas en nuestro estudio apoyarían, al menos en un nivel morfológico, el rol supresor tumoral de BAP1 en el melanoma cutáneo primario esporádico, y la alta representación de patrón citoplasmático de BAP1 perinuclear focal en la variante nodular, la apoyaría como entidad biológicamente distinta. No obstante, su valor como biomarcador tisular pronóstico y predictivo independiente, y el significado del patrón perinuclear en esta neoplasia, necesita de estudios adicionales para establecerse.

BIBLIOGRAFÍA

- 1-Carr S, Smith C, Wernberg J. Epidemiology and Risk Factors of Melanoma. *Surg Clin North Am.* 2020 Feb;100(1):1-12.
- 2-Mihajlovic M, Vlajkovic S, Jovanovic P, et al. Primary mucosal melanomas: a comprehensive review. *Int J Clin Exp Pathol* 2012;5(8):739–53.
- 3-Liubinas SV, Maartens N, Drummond KJ. Primary melanocytic neoplasms of the central nervous system. *J Clin Neurosci* 2010;17(10):1227–32.
- 4-Chattopadhyay C, Kim DW, Gombos DS, et al. Uveal melanoma: from diagnosis to treatment and the science in between. *Cancer* 2016;122(15):2299–312.
- 5-Bishop KD, Olszewski AJ. Epidemiology and survival outcomes of ocular and mucosal melanomas: a population-based analysis. *Int J Cancer* 2014;134(12):2961–71.
- 6-Anderson WF, Pfeiffer RM, Tucker MA, et al. Divergent cancer pathways for early-onset and late-onset cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 2009;115(18):4176–85.
- 7-Borges SZ, Bakos L, Cartell A, et al. Distribution of clinical-pathological types of cutaneous melanomas and mortality rate in the region of Passo Fundo, RS, Brazil. *Int J. Dermatol* 2007;46(7):679–86.
- 8-Diaz AT, Nova J, Acosta A, et al. Melanoma lentiginoso acral ¿Qué sabemos de uno de los melanomas más frecuentes en Latinoamérica?. *Revista Colombiana de Cancerología* 2021, 25(3).
- 9-Ishihara K, Saida T, Otsuka F, et al; Prognosis and Statistical Investigation Committee of the Japanese Skin Cancer Society. Statistical profiles of malignant melanoma and other skin cancers in Japan: 2007 update. *Int J Clin Oncol* 2008;13(1):33–41.
- 10-Loria D, González A, Latorre C. Epidemiología del melanoma cutáneo en Argentina: análisis del Registro Argentino de Melanoma Cutáneo 2010. *Dermatología Argentina*, 16(1), 39-45.
- 11-Loria D, Abriata MG, Santoro F, et al; Cutaneous melanoma in Argentina: an analysis of its characteristics and regional differences. *Ecancermedicalsecience* 2020, vol 14.
- 12-Paul J, Sbicca JA, Hirano SA et al. Changing age distribution of melanoma patients: a 22-year, single-site perspective. *South Med J* 2013;106(12):66772.

- 13-Schwartz JL, Wang TS, Hamilton TA, et al. Thin primary cutaneous melanomas: associated detection patterns, lesion characteristics, and patient characteristics. *Cancer* 2002;95(7):1562–8.
- 14-Robinson JK, Turrisi R. Skills training to learn discrimination of ABCDE criteria by those at risk of developing melanoma. *Arch Dermatol* 2006;142(4):447–52.
- 15-Matthews NH, Li WQ, Qureshi AA, et al. Epidemiology of melanoma. In: William H. Ward and Jeffrey M. Farma (Editors). *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Brisbane, Australia; Codon Publications; 2017; p. 3-22.
- 16-Lee C, Collichio F, Ollila D, et al. Historical review of melanoma treatment and outcomes. *Clin Dermatol* 2013;31(2):141–7.
- 17-Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med* 2011;364(26):2507–16
- 18-Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer* 2005;41(1):45–60.
- 19-Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 2005;353(20):2135–47.
- 20-Patterson JW. Lentigines, nevi and melanomas. In: Patterson JW. *Weedon's Skin Pathology*. 5th ed. Charlottesville, VA, USA. Elsevier; 2021; p. 881-951.
- 21-Lu X, Zhang Q, Wang Y, et al. Molecular classification and subtype-specific characterization of skin cutaneous melanoma by aggregating multiple genomic platform data. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018;144(9):1635–47.
- 22-Zaidi MR, Day CP, Merlino G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J Invest Dermatol* 2008;128(10):2381–91.
- 23-Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol*. 2014;9:239–271
- 24-Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, et al. The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. *N Engl J Med*. 2015;373(20):1926–1936.
- 25-Yeh, I. New and evolving concepts of melanocytic nevi and melanocytomas. *Modern Pathology* 2020, 33(1), 1-14.
- 26-Saleh D, Peach AHS. Ultra-late recurrence of malignant melanoma after 40 years of quiescent disease. *J Surg Oncol* 2011;103(3):290–1.

- 27-Bevona C, Goggins W, Quinn T, et al. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol*. 2003;139(12):1620–1624.)
- 28-Clark WHJ. A classification of malignant melanoma in man correlated with histogenesis and biologic behavior. In: Montagna W, Hu F, eds. *Advances in the Biology of the Skin Volume VIII*. New York: Pergamon Press; 1967:621–647.
- 29-McGovern VJ. The classification of melanoma and its relationship with prognosis. *Pathology*. 1970;2:85–98.
- 30-Ting W, Schultz K, Cac NN, et al. Tanning bed exposure increases the risk of malignant melanoma. *Int J Dermatol* 2007;46(12):1253–7.
- 31-Green AC, Viros A, Hughes MCB, et al. Nodular melanoma: a histopathologic entity?. *Acta Derm Venereol* 2018, 98(4), 460-462.
- 32-Green AC, Baade P, Coory M, et al. Population-based 20-year survival among people diagnosed with thin melanomas in Queensland, Australia. *Journal of clinical oncology* 2012, 30(13), 1462-1467.
- 33-Elder DE, Massi D, Scolyer RA, et al. Melanocytic tumours. In: Elder DE. *WHO Classification of Skin Tumors*. World Health Organization of Tumors, 4th ed Volume 11; Lyon France; IARC; 2018; p. 66-150.
- 34-Elder DE, Bastian B, Cree IA, et al. The 2018 World Health Organization classification of cutaneous, mucosal, and uveal melanoma: detailed analysis of 9 distinct subtypes defined by their evolutionary pathway. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2020, 144(4), 500-522.
- 35-Elder DE, Guerry D IV, Epstein MN, et al. Invasive malignant melanomas lacking competence for metastasis. *Am J Dermatopathol*. 1984;6(suppl):55–61.
- 36-Clark WHJ, From L, Bernardino EA, et al. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*. 1969;29:705–727.
- 37-Ackerman AB, David KM. A unifying concept of malignant melanoma: biologic aspects. *Hum Pathol* 1986;17(5):438–40.
- 38-Hurt MA. Types of melanoma? *J Am Acad Dermatol* 2008;58(6):1059–60.
- 39-Dessinioti C, Dimou N, Geller AC, et al. Distinct Clinicopathological and prognostic features of thin nodular primary melanomas: an international study from 17 centers. *J Natl Cancer Inst*. 2019; 111(12):1314–22.

- 40-Demierre MF, Chung C, Miller DR, et al. Early detection of thick melanomas in the United States: beware of the nodular subtype. *Arch Dermatol* 2005;141(6):745-50.
- 41-Whiteman DC, Watt P, Purdie DM, et al. Melanocytic nevi, solar keratoses, and divergent pathways to cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(11):806–812.
- 42-Kvaskoff M, Pandeya N, Green AC, et al. Solar elastosis and cutaneous melanoma: a site-specific analysis. *International journal of cancer* 2015, 136(12), 2900-2911.
- 43-Thomas NE, Krickler A, From L, et al. Associations of cumulative sun exposure and phenotypic characteristics with histologic solar elastosis. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2010, 19(11), 2932-2941.
- 44-Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, et al. Melanoma of the skin, In: Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. eds. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer; 2017; p. 563-588.
- 45-Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67(6):472-92.
- 46-Shon W, Frishberg D, Gershenwald J, et al. *Protocol for the Examination of Excision Specimens From Patients With Melanoma of the Skin, version: 4.3.0.1.* *College of American Pathologists* [en línea]; 2021 August (protocol posting date); [Consultado: 5 de Agosto de 2021]; Disponible en la URL: <https://www.cap.org/protocols-and-guidelines/cancer-reporting-tools/cancer-protocol-templates>
- 47-Gimotty PA, Van Belle P, Elder DE, et al. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2005, 23(31), 8048-8056.
- 48-Namikawa K, Aung PP, Gershenwald JE, et al. Clinical impact of ulceration width, lymphovascular invasion, microscopic satellitosis, perineural invasion, and mitotic rate in patients undergoing sentinel lymph node biopsy for cutaneous melanoma: a retrospective observational study at a comprehensive cancer center. *Cancer Med.* 2018;7(3):583-593.
- 49-Tas F, Erturk K. Primary tumour ulceration in cutaneous melanoma: its role on TNM stages. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 2021, 51(2), 192-198.

- 50-Wheless L, Isom CA, Hooks MA et al. Mitotic rate is associated with positive lymph nodes in patients with thin melanomas. *J Am Acad Dermatol* 2018;78(5):935-941
- 51-Evans JL, Vidri RJ, MacGillivray DC, et al. Tumor mitotic rate is an independent predictor of survival for nonmetastatic melanoma. *Surgery*. 2018 Sep;164(3):589-593.
- 52-Feldmeyer L, Tetzlaff M, Fox P, et al. Prognostic Implication of Lymphovascular Invasion Detected by Double Immunostaining for D2-40 and MITF1 in Primary Cutaneous Melanoma. *Am J Dermatopathol*. 2016;38(7):484-491.
- 53-Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2012;30(21):2678–83.
- 54-Duprat JP, Brechtbühl ER, Costa de Sá B, et al. Absence of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Is a Reproducible Predictive Factor for Sentinel Lymph Node Metastasis: A Multicenter Database Study by the Brazilian Melanoma Group. *PLoS One*. 2016 Feb 9;11(2)
- 55-Ribero S, Gualano MR, Osella-Abe S, et al. Association of Histologic Regression in Primary Melanoma With Sentinel Lymph Node Status: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatol* 2015;151(12):1301-1307.
- 56-Aung PP, Nagarajan P, Prieto VG. Regression in primary cutaneous melanoma: etiopathogenesis and clinical significance. *Laboratory Investigation* 2017, 97(6), 657-668.
- 57-Balch CM, Murad TM, Soong SJ, et al. A multifactorial analysis of melanoma: prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow's staging methods. *Ann Surg* 1978;188(6):732–42.
- 58- Martín-Gorgojo A, Nagore E. Melanoma Arising in a Melanocytic Nevus. *Actas Dermosifiliogr (Engl Ed)*. 2018 Mar;109(2):123-132.
- 59- Coroiu A, Moran C, Davine JA, et al. Patient-identified early clinical warning signs of nodular melanoma: a qualitative study. *BMC Cancer*. 2021 Apr 7;21(1):371.
- 60-Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluation in human malignancies. *Semin Cancer Biol* 1990;1:199-206.

- 61-Liu Q, Peng Z, Shen L, et al. Prognostic and Clinicopathological Value of Ki-67 in Melanoma: A Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2021 Sep 8;11:737760.
- 62-Hazan C, Melzer K, Panageas KS, et al. Evaluation of the proliferation marker MIB-1 in the prognosis of cutaneous malignant melanoma. *Cancer*. 2002 Aug 1;95(3):634-40.
- 63-Moretti S, Spallanzani A, Chiarugi A. Correlation of Ki-67 expression in cutaneous primary melanoma with prognosis in a prospective study: different correlation according to thickness. *J Am Acad Dermatol*. 2001 Feb;44(2):188-92.
- 64- Di Nunno V, Frega G, Santoni M, et al. BAP1 in solid tumors. *Future Oncol*. 2019 Jun;15(18):2151-2162.
- 65-Jensen DE, Proctor M, Marquis ST, et al. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene* 1998;16: 1097–1112.
- 66-Yu H, Mashtalir N, Daou S, et al. The ubiquitin carboxyl hydrolase BAP1 forms a ternary complex with YY1 and HCF-1 and is a critical regulator of gene expression. *Mol Cell Biol* 2010; 30: 5071–5085.
- 67-Nishikawa H, Wu W, Koike A, et al. BRCA1-associated protein1 interferes with BRCA1/BARD1 RING heterodimer activity. *Cancer Res* 2009; 69: 111–119.
- 68-Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, et al. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature*. 2010 May 13;465(7295):243-7.
- 69-Ventii KH, Devi NS, Friedrich KL, et al. BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization. *Cancer Res* 2008; 68: 6953.
- 70-Carbone M, Harbour JW, Brugarolas J, et al. Biological Mechanisms and Clinical Significance of *BAP1* Mutations in Human Cancer. *Cancer Discov*. 2020 Aug;10(8):1103-1120.
- 71-Peng J, Ma J, Li W, et al. Stabilization of MCRS1 by BAP1 prevents chromosome instability in renal cell carcinoma. *Cancer Lett* 2015; 369: 167–174.
- 72-Lee HS, Lee SA, Hur SK, et al. Stabilization and targeting of INO80 to replication forks by BAP1 during normal DNA synthesis. *Nat Commun* 2014;5:5128.

- 73-Lee HS, Seo HR, Lee SA, et al. BAP1 promotes stalled fork restart and cell survival via INO80 in response to replication stress. *Biochem J* 2019;476:3053–66
- 74-Eletr ZM, Wilkinson KD. An emerging model for BAP1's role in regulating cell cycle progression. *Cell Biochem Biophys* 2011; 60: 3–11.
- 75-Machida YJ, Machida Y, Vashisht AA, et al. The deubiquitinating enzyme BAP1 regulates cell growth via interaction with HCF-1. *J Biol Chem* 2009; 284: 34179–34188
- 76- Misaghi S, Ottosen S, Izrael-Tomasevic A, et al. Association of C-terminal ubiquitin hydrolase BRCA1-associated protein 1 with cell cycle regulator host cell factor 1. *Mol Cell Biol.* 2009 Apr;29(8):2181-92.
- 77-Julien E, Herr W. Proteolytic processing is necessary to separate and ensure proper cell growth and cytokinesis functions of HCF-1. *EMBO J* 2003; 22: 2360.
- 78- Sahtoe DD, van Dijk WJ, Ekkebus R, et al. BAP1/ASXL1 recruitment and activation for H2A deubiquitination. *Nat Commun.* 2016 Jan 7;7:10292.
- 79-Ismail IH, Davidson R, Gagne JP, et al. Germline mutations in BAP1 impair its function in DNA doublestrand break repair. *Cancer Res* 2014;74:4282–94
- 80-Eletr ZM, Yin L, Wilkinson KD. BAP1 is phosphorylated at serine 592 in S-phase following DNA damage. *FEBS Lett.* 2013 Dec 11;587(24):3906-11.
- 81-Bononi A, Giorgi C, Patergnani S, et al. BAP1 regulates IP3R3-mediated Ca²⁺ flux to mitochondria suppressing cell transformation. *Nature* 2017; 546: 549–553.
- 82-Zhang Y, Shi J, Liu X, et al. BAP1 links metabolic regulation of ferroptosis to tumour suppression. *Nat Cell Biol* 2018;20:1181–92
- 83-Koppula P, Zhang Y, Zhuang L, et al. Amino acid transporter SLC7A11/xCT at the crossroads of regulating redox homeostasis and nutrient dependency of cancer. *Cancer Commun* 2018;38:12
- 84-He M, Chaurushiya MS, Webster JD, et al. Intrinsic apoptosis shapes the tumor spectrum linked to inactivation of the deubiquitinase BAP1. *Science* 2019;364:283–5
- 85-Dai F, Lee H, Zhang Y, et al. BAP1 inhibits the ER stress gene regulatory network and modulates metabolic stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:3192–7

- 86-Ruan HB, Han X, Li MD, et al. O-GlcNAc transferase/host cell factor C1 complex regulates gluconeogenesis by modulating PGC-1alpha stability. *Cell Metab* 2012;16:226–37
- 87- Bononi A, Yang H, Giorgi C, et al. Germline BAP1 mutations induce a Warburg effect. *Cell Death Differ*. 2017 Oct;24(10):1694-1704.
- 88-Baughman JM, Rose CM, Kolumam G, et al. NeuCode proteomics reveals Bap1 regulation of metabolism. *Cell Rep* 2016; 16: 583–595.
- 89- Bott M, Brevet M, Taylor BS, et al. The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat Genet*. 2011 Jun 5;43(7):668-72.
- 90-de la Fouchardière A, Cabaret O, Savin L, et al. Germline BAP1 mutations predispose also to multiple basal cell carcinomas. *Clin Genet*. 2015 Sep;88(3):273-7.
- 91-Shah AA, Bourne TD, Murali R. BAP1 protein loss by immunohistochemistry: a potentially useful tool for prognostic prediction in patients with uveal melanoma. *Pathology*. 2013 Dec;45(7):651-6.
- 92-van de Nes JAP, Nelles J, Kreis S, et al. Comparing the prognostic value of BAP1 mutation pattern, chromosome 3 status, and BAP1 immunohistochemistry in uveal melanoma. *Am J Surg Pathol* 2016; 40: 796–805.
- 93-Yu H, Pak H, Hammond-Martel I, et al. Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jan 7;111(1):285-90.
- 94-Okino Y, Machida Y, Frankland-Searby S, et al. BRCA1-associated protein 1 (BAP1) deubiquitinase antagonizes the ubiquitin-mediated activation of FoxK2 target genes. *J. Biol. Chem* 2015. 290, 1580–1591.
- 95-Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–674.
- 96-Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 85–95
- 97-Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 325–337.
- 98-DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv*. 2016 May 27;2(5).

- 99- Artegiani B, van Voorthuijsen L, Lindeboom RGH, et al. Probing the Tumor Suppressor Function of BAP1 in CRISPR-Engineered Human Liver Organoids. *Cell Stem Cell*. 2019 Jun 6;24(6):927-943.
- 100- Kuznetsov JN, Agüero TH, Owens DA, et al. BAP1 regulates epigenetic switch from pluripotency to differentiation in developmental lineages giving rise to BAP1-mutant cancers. *Sci Adv*. 2019 Sep 18;5(9).
- 101-Carbone M, Ferris LK, Baumann F, et al. BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MBAITs. *J Transl Med* 2012;10:179
- 102-Yoshikawa Y, Emi M, Nakano T, et al. Mesothelioma developing in carriers of inherited genetic mutations. *Transl Lung Cancer Res* 2020;9:S67–S76.
- 103-Harbour 2010. Harbour JW, Onken MD, et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science*. 2010;330(6009):1410-1413.
- 104-Njauw CN, Kim I, Piris A, et al. Germline BAP1 inactivation is preferentially associated with metastatic ocular melanoma and cutaneous-ocular melanoma families. *PLoS One*. 2012;7(4).
- 105-Walpole S, Pritchard AL, Cebulla CM, et al. Comprehensive study of the clinical phenotype of germline BAP1 variant-carrying families worldwide. *J Natl Cancer Inst* 2018;110:1328–41.
- 106-Lin M, Zhang L, Hildebrandt MAT, et al. Common, germline genetic variations in the novel tumor suppressor BAP1 and risk of developing different types of cancer. *Oncotarget* 2017;8:74936–46
- 107-Shankar GM, Abedalthagaf M, Vaubel RA, et al. Germline and somatic BAP1 mutations in high-grade rhabdoid meningiomas. *Neuro Oncol* 2017;19:535–45.
- 108-Pilarski R, Cebulla CM, Massengill JB, et al. Expanding the clinical phenotype of hereditary BAP1 cancer predisposition syndrome, reporting three new cases. *Genes Chromosomes Cancer* 2014; 53: 177–182.
- 109-Rai K, Pilarski R, Cebulla CM, et al. Comprehensive review of BAP1 tumor predisposition syndrome with report of two new cases. *Clin Genet* 2016; 89: 285–294.
- 110-Carbone M, Emri S, Dogan AU, et al. A mesothelioma epidemic in Cappadocia: scientific developments and unexpected social outcomes. *Nat Rev Cancer* 2007;7:147–54.

- 111-Carbone M, Baris YI, Bertino P, et al. Erionite exposure in North Dakota and Turkish villages with mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:13618–23
- 112-Emri SA. The Cappadocia mesothelioma epidemic: its influence in Turkey and abroad. *Ann Transl Med* 2017;5:239.
- 113-Testa JR, Cheung M, Pei J, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet* 2011; 43: 1022.
- 114- Carbone M, Yang H, Pass HI, et al. BAP1 and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013 Mar;13(3):153-9.
- 115-Wiesner T, Obenaus AC, Murali R, et al. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet*. 2011;43(10):1018-1021).
- 116-Piris A, Mihm MC Jr, Hoang MP. BAP1 and BRAFV600E expression in benign and malignant melanocytic proliferations. *Hum Pathol*. 2015 Feb;46(2):239-45.
- 117-Haugh AM, Njauw CN, Bublej JA, et al. Genotypic and phenotypic features of BAP1 cancer syndrome: a report of 8 new families and review of cases in the literature. *JAMA Dermatol* 2017;153:999–1006.
- 118-Abdel-Rahman MH, Pilarski R, Cebulla CM, et al. Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers. *J Med Genet* 2011; 48: 856
- 119-Busam KJ, Wanna M, Wiesner T. Multiple epithelioid Spitz nevi or tumors with loss of BAP1 expression: a clue to a hereditary tumor syndrome. *JAMA Dermatol*. 2013 Mar;149(3):335-9.
- 120-Wiesner T, Murali R, Fried I, et al. A distinct subset of atypical Spitz tumors is characterized by BRAF mutation and loss of BAP1 expression. *Am J Surg Pathol*. 2012 Jun;36(6):818-30.
- 121-Marušić Z, Buljan M, Busam KJ. Histomorphologic spectrum of BAP1 negative melanocytic neoplasms in a family with BAP1-associated cancer susceptibility syndrome. *J Cutan Pathol*. 2015 Jun;42(6):406-12.
- 122-Wiesner T, Fried I, Ulz P, et al. Toward an improved definition of the tumor spectrum associated with BAP1 germline mutations. *J Clin Oncol* 2012;30(32)
- 123-Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, et al. Frequent inactivation of the BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma. *Cancer Sci* 2012; 103: 868.
- 124-Yeh I, Mully TW, Wiesner T, et al. Ambiguous melanocytic tumors with loss of 3p21. *Am J Surg Pathol* 2014; 38: 1088

- 125-Nasu M, Emi M, Pastorino S, et al. High Incidence of Somatic BAP1 alterations in sporadic malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2015 Apr;10(4):565-76.
- 126-Peña-Llopis S, Vega-Rubín-de-Celis S, Liao A, et al. BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat Genet.* 2012 Jun 10;44(7):751-9.
- 127-Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature* 2013; 499: 43–49
- 128-Wang Y, Thomas A, Lau C, et al. Mutations of epigenetic regulatory genes are common in thymic carcinomas. *Sci Rep.* 2014 Dec 8;4:7336.
- 129-White AE, Harper JW. Cancer. Emerging anatomy of the BAP1 tumor suppressor system. *Science.* 2012 Sep 21;337(6101):1463-4.
- 130-Farshidfar F, Zheng S, Gingras MC, et al. Integrative Genomic Analysis of Cholangiocarcinoma Identifies Distinct IDH-Mutant Molecular Profiles. *Cell Rep.* 2017 Mar 14;18(11):2780-2794.
- 131-Murali R, Wilmott JS, Jakrot V, et al. BAP1 expression in cutaneous melanoma: a pilot study. *Pathology* 2013;45(6):606–9.
- 132-Murali R, Wiesner T, Scolyer RA. Tumours associated with BAP1 mutations. *Pathology.* 2013 Feb;45(2):116-26.
- 133-Aung PP, Nagarajan P, Tetzlaff MT, et al. Melanoma With Loss of BAP1 Expression in Patients With No Family History of BAP1-Associated Cancer Susceptibility Syndrome: A Case Series. *Am J Dermatopathol.* 2019 Mar;41(3):167-179.
- 134-Chapel DB, Schulte JJ, Husain AN, et al. Application of immunohistochemistry in diagnosis and management of malignant mesothelioma. *Transl Lung Cancer Res* 2020;9:S3–S27
- 135-Carbone M, Adusumilli PS, Alexander HR Jr, et al. Mesothelioma: scientific clues for prevention, diagnosis, and therapy. *CA Cancer J Clin* 2019;69:402–29
- 136-Linos K, Atkinson AE, Yan S. A case of molecularly confirmed BAP1 inactivated melanocytic tumor with retention of immunohistochemical expression: A confounding factor. *J Cutan Pathol.* 2020 May;47(5):485-489.
- 137- Baumann F, Flores E, Napolitano A, et al. Mesothelioma patients with germline BAP1 mutations have 7-fold improved long-term survival. *Carcinogenesis.* 2015 Jan;36(1):76-81.

- 138-Gupta MP, Lane AM, DeAngelis MM, et al. Clinical characteristics of uveal melanoma in patients with germline BAP1 mutations. *JAMA Ophthalmol* 2015;133:881–7
- 139-Farzin M, Toon CW, Clarkson A, et al. Loss of expression of BAP1 predicts longer survival in mesothelioma. *Pathology* 2015; 47:302–307.
- 140-Luchini C, Veronese N, Yachida S, et al. Different prognostic roles of tumor suppressor gene BAP1 in cancer: a systematic review with meta-analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 2016;55:741–9.
- 141-Forest F, Patoir A, Dal Col P, et al. Nuclear grading, BAP1, mesothelin and PD-L1 expression in malignant pleural mesothelioma: prognostic implications. *Pathology* 2018;50:635–41
- 142-Righi L, Duregon E, Vatrano S, et al. BRCA1-associated protein 1 (BAP1) immunohistochemical expression as a diagnostic tool in malignant pleural mesothelioma classification: a large retrospective study. *J Thorac Oncol* 2016; 11: 2006–2017
- 143-Singhi AD, Krasinskas AM, Choudry HA, et al. The prognostic significance of BAP1, NF2, and CDKN2A in malignant peritoneal mesothelioma. *Mod Pathol* 2016;29:14–24
- 144-Arzt L, Quehenberger F, Halbwedl I, et al. BAP1 protein is a progression factor in malignant pleural mesothelioma. *Pathol Oncol Res* 2014; 20:145–151.
- 145-Damato B, Eleuteri A, Taktak AFG, et al. Estimating prognosis for survival after treatment of choroidal melanoma. *Prog Retin Eye Res* 2011; 30: 285–295.
- 146-van Essen TH, van Pelt SI, Versluis M, et al. Prognostic parameters in uveal melanoma and their association with BAP1 expression. *Br J Ophthalmol* 2014; 98: 1738–1743.
- 147-Koopmans AE, Verdijk RM, Brouwer RWW, et al. Clinical significance of immunohistochemistry for detection of BAP1 mutations in uveal melanoma. *Mod Pathol* 2014; 27: 1321–1330
- 148-Kalirai H, Dodson A, Faqir S, et al. Lack of BAP1 protein expression in uveal melanoma is associated with increased metastatic risk and has utility in routine prognostic testing. *Br J Cancer* 2014; 111: 1373–1380.
- 149-See TR, Stålhammar G, Phillips S, et al. BAP1 Immunoreactivity Correlates with Gene Expression Class in Uveal Melanoma. *Ocul Oncol Pathol*. 2020 Mar;6(2):129-137.

150-Joseph RW, Kapur P, Serie DJ, et al. Loss of BAP1 protein expression is an independent marker of poor prognosis in patients with low-risk clear cell renal cell carcinoma. *Cancer*. 2014 Apr 1;120(7):1059-67.

151-Miura Y, Inoshita N, Ikeda M, et al. Loss of BAP1 protein expression in the first metastatic site predicts prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 2017;35:386–91.

152-Chen P, Wang H, Zhang W, et al. Loss of BAP1 Results in Growth Inhibition and Enhances Mesenchymal-Epithelial Transition in Kidney Tumor Cells. *Mol Cell Proteomics* 2019; 18: 1320-1329.

153-Al-Shamsi HO, Anand D, Shroff RT, et al. BRCA-associated protein 1 mutant cholangiocarcinoma: an aggressive disease subtype. *J Gastrointest Oncol* 2016; 7: 556–561

154-Churi CR, Shroff R, Wang Y, et al. Mutation profiling in cholangiocarcinoma: prognostic and therapeutic implications. *PLoS One*. 2014 Dec 23;9(12).

155-Andrici J, Goeppert B, Sioson L, et al. Loss of BAP1 Expression Occurs Frequently in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Jan;95(2).

156-Misumi K, Hayashi A, Shibahara J, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma frequently shows loss of BAP1 and PBRM1 expression, and demonstrates specific clinicopathological and genetic characteristics with BAP1 loss. *Histopathology*. 2017 Apr;70(5):766-774.

157-Kumar R, Taylor M, Miao B, et al. BAP1 has a survival role in cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*. 2015 Apr;135(4):1089-1097.

158-Liu-Smith F, Lu Y. Opposite Roles of BAP1 in Overall Survival of Uveal Melanoma and Cutaneous Melanoma. *J Clin Med*. 2020 Feb 3;9(2):411.

159-Qin J, Zhou Z, Chen W, et al. BAP1 promotes breast cancer cell proliferation and metastasis by deubiquitinating KLF5. *Nat Commun*. 2015 Sep 30;6:8471.

160-Mashtalir N, Daou S, Barbour H, et al. Autodeubiquitination protects the tumor suppressor BAP1 from cytoplasmic sequestration mediated by the atypical ubiquitin ligase UBE2O. *Mol Cell* 2014; 54: 392–406

161-Hakiri S, Osada H, Ishiguro F, et al. Functional differences between wild-type and mutant-type BRCA1-associated protein 1 tumor suppressor against malignant mesothelioma cells. *Cancer Sci* 2015; 106: 990–999.

- 162-Gammon B, Traczyk TN, Gerami P. Clumped perinuclear BAP1 expression is a frequent finding in sporadic epithelioid Spitz tumors. *J Cutan Pathol*. 2013 Jun;40(6):538-42.
- 163-Farquhar N, Thornton S, Coupland SE, et al. Patterns of BAP1 protein expression provide insights into prognostic significance and the biology of uveal melanoma. *J Pathol Clin Res*. 2017 Nov 13;4(1):26-38.
- 164-Garfield EM, Walton KE, Quan VL, et al. Histomorphologic spectrum of germline-related and sporadic BAP1-inactivated melanocytic tumors. *J Am Acad Dermatol*. 2018 Sep;79(3):525-534.
- 165-Zhang X-K, Xi S-Y, Sai KE, et al. Cytoplasmic expression of BAP1 as an independent prognostic biomarker for patients with gliomas. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 5035–5043.
- 166-De Rienzo A, Chirieac LR, Hung YP, et al. Large-scale analysis of BAP1 expression reveals novel associations with clinical and molecular features of malignant pleural mesothelioma. *J Pathol*. 2021 Jan;253(1):68-79.
- 167-Bhattacharya S, Hanpude P, Maiti TK. Cancer associated missense mutations in BAP1 catalytic domain induce amyloidogenic aggregation: a new insight in enzymatic inactivation. *Sci Rep* 2016; 5: 18462.
- 168-Xu J, Reumers J, Couceiro JR, et al. Gain of function of mutant p53 by coaggregation with multiple tumor suppressors. *Nat Chem Biol*. 2011 May;7(5):285-95.
- 169-Olzscha H, Schermann SM, Woerner AC, et al. Amyloid-like aggregates sequester numerous metastable proteins with essential cellular functions. *Cell*. 2011 Jan 7;144(1):67-78.
- 170-Gong H, Yang X, Zhao Y, et al. Amyloidogenicity of p53: a hidden link between protein misfolding and cancer. *Curr Protein Pept Sci*. 2015;16(2):135-46.
- 171-Lee SY, Jeong EK, Jeon HM, et al. Implication of necrosis-linked p53 aggregation in acquired apoptotic resistance to 5-FU in MCF-7 multicellular tumour spheroids. *Oncol Rep*. 2010 Jul;24(1):73-9.
- 172-Okonska A, Buhler S, Rao V, et al. Functional genomic screen in mesothelioma reveals that loss of function of BRCA1-associated protein 1 induces chemoresistance to ribonucleotide reductase inhibition. *Mol Cancer Ther* 2020;19:552–63

- 173-Guazzelli A, Meysami P, Bakker E, et al. *BAP1* Status Determines the Sensitivity of Malignant Mesothelioma Cells to Gemcitabine Treatment. *Int J Mol Sci.* 2019 Jan 19;20(2):429.
- 174-Webster JD, Pham TH, Wu X, et al. The tumor suppressor BAP1 cooperates with BRAFV600E to promote tumor formation in cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2019;32:269–79.
- 175-Nassar AH, Hamieh L, Gray KP, et al. Mutations and response to rapalogs in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Mol Cancer Ther* 2020;19:690–6.
- 176-Carlo MI, Hakimi AA, Stewart GD, et al. Familial kidney cancer: implications of new syndromes and molecular insights. *Eur Urol* 2019;76:754–64
- 177-Pinton G, Manente AG, Murer B, et al. PARP1 inhibition affects pleural mesothelioma cell viability and uncouples AKT/mTOR axis via SIRT1. *J Cell Mol Med* 2013;17: 233–41.
- 178-Srinivasan G, Sidhu GS, Williamson EA, et al. Synthetic lethality in malignant pleural mesothelioma with PARP1 inhibition. *Cancer Chemother Pharmacol* 2017;80:861–7.
- 179-Sacco JJ, Kenyani J, Butt Z, et al. Loss of the deubiquitylase BAP1 alters class I histone deacetylase expression and sensitivity of mesothelioma cells to HDAC inhibitors. *Oncotarget* 2015;6:13757–71
- 180-Landreville S, Agapova OA, Matatall KA, et al. Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and differentiation in uveal melanoma. *Clin Cancer Res* 2012;18: 408–16.
- 181-Wang T, Lu R, Kapur P, et al. An Empirical Approach Leveraging Tumorgrafts to Dissect the Tumor Microenvironment in Renal Cell Carcinoma Identifies Missing Link to Prognostic Inflammatory Factors. *Cancer Discov.* 2018 Sep;8(9):1142-1155.
- 182-Figueiredo CR, Kalirai H, Sacco JJ, et al. Loss of BAP1 expression is associated with an immunosuppressive microenvironment in uveal melanoma, with implications for immunotherapy development. *J Pathol.* 2020 Apr;250(4):420-439.
- 183-Wang T, Lu R, Kapur P, et al. An empirical approach leveraging tumorgrafts to dissect the tumor microenvironment in renal cell carcinoma identifies missing link to prognostic inflammatory factors. *Cancer Discov* 2018;8:1142–55.

- 184-Tanguturi P, Kim KS, Ramakrishna S. The role of deubiquitinating enzymes in cancer drug resistance. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2020 Apr;85(4):627-639.
- 185-Lim KH, Baek KH. Deubiquitinating enzymes as therapeutic targets in cancer. *Curr Pharm Des.* 2013;19(22):4039-52.
- 186-Soysouvanh F, Giuliano S, Habel N, et al. An Update on the Role of Ubiquitination in Melanoma Development and Therapies. *J Clin Med.* 2021 Mar 8;10(5):1133.
- 187-Bubendorf L, Nocito A, Moch H, et al. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol.* 2001 Sep;195(1):72-9.
- 188-Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* 1998 Jul;4(7):844-7.
- 189-Taylor CR, Shi SR. Techniques of Immunohistochemistry: Principles, pitfalls and standardization. In Dabbs DJ (ed.), *Comprehensive Diagnostic Immunohistochemistry*; Fourth edition; New York; Elsevier; 2013; pp. 1-40.
- 190-Liu CH, Lin CH, Tsai MJ, et al. Melanin bleaching with dilute hydrogen peroxide: a simple and rapid method. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2013 May;21(3):275-9.
- 191-Jordan T, Williams D, Criswell S, et al. Comparison of bleaching protocols utilizing hematoxylin and eosin stain and immunohistochemical proliferation marker MCM3 in pigmented melanomas. *J Histotechnol.* 2019 Dec;42(4):177-182.
- 192-Deroulers C, Ameisen D, Badoual M, Gerin C, Granier A, Lartaud M. Analyzing huge pathology images with open source software. *Diagn Pathol.* 2013 Jun 6;8:92.

ANEXO

Aspectos éticos

Ministerio de
SALUD

ENTRE
TODOS



VAMOS
MÁS ALTO

SISTEMA DE EVALUACION REGISTRO Y FISCALIZACION DE LAS INVESTIGACIONES EN SALUD

La Ley 9694, establece en su artículo 2º, que se aplica a toda investigación en la que participen seres humanos, tanto en condiciones de enfermedad como voluntarios sanos, de carácter experimental u observacional, que implique o no nuevos métodos de prevención, diagnóstico, tratamiento o rehabilitación, así como la recolección, almacenamiento y diseminación de información relacionada a los individuos o muestras biológicas obtenidas directa o indirectamente de los mismos, en el ámbito de la Provincia de Córdoba. **Quedan excluidas de esta Ley aquellas investigaciones que no incluyan intervenciones sobre la salud humana y no supongan riesgo para los individuos. En este caso podrán ser revisadas por un comité académico, por una comisión conformada a tal fin o por el comité de capacitación y docencia de la institución involucrada.**

Se deja constancia mediante la presente nota que la investigación: “Estudio inmunohistoquímico de la expresión de la proteína supresora tumoral BAP1 en una serie de casos de melanoma cutáneo (¿ esporádico?) y su relación con parámetros clínicos, histopatológicos e índice de proliferación celular”, cuyo investigador principal es: Marco Mario Mazzotta (D.N.I: 34.334.534) se enmarca dentro del artículo 2º y está contemplada en la Disposición Nº 32 del CoEIS, de fecha 08 de septiembre de 2016, por lo tanto dicha investigación no requiere evaluación ética y puede ser revisada por un comité académico, debiendo respetar la Ley 25326 de Protección de los Datos Personales.

Firma Investigador
Fecha

MARCO M. MAZZOTTA
MEDICO
M.P. 37.498

Dr. HUGO OSCAR VILARRODONA
COORDINADOR CERFIS
MIEMBRO CoEIS

Firma
Fecha

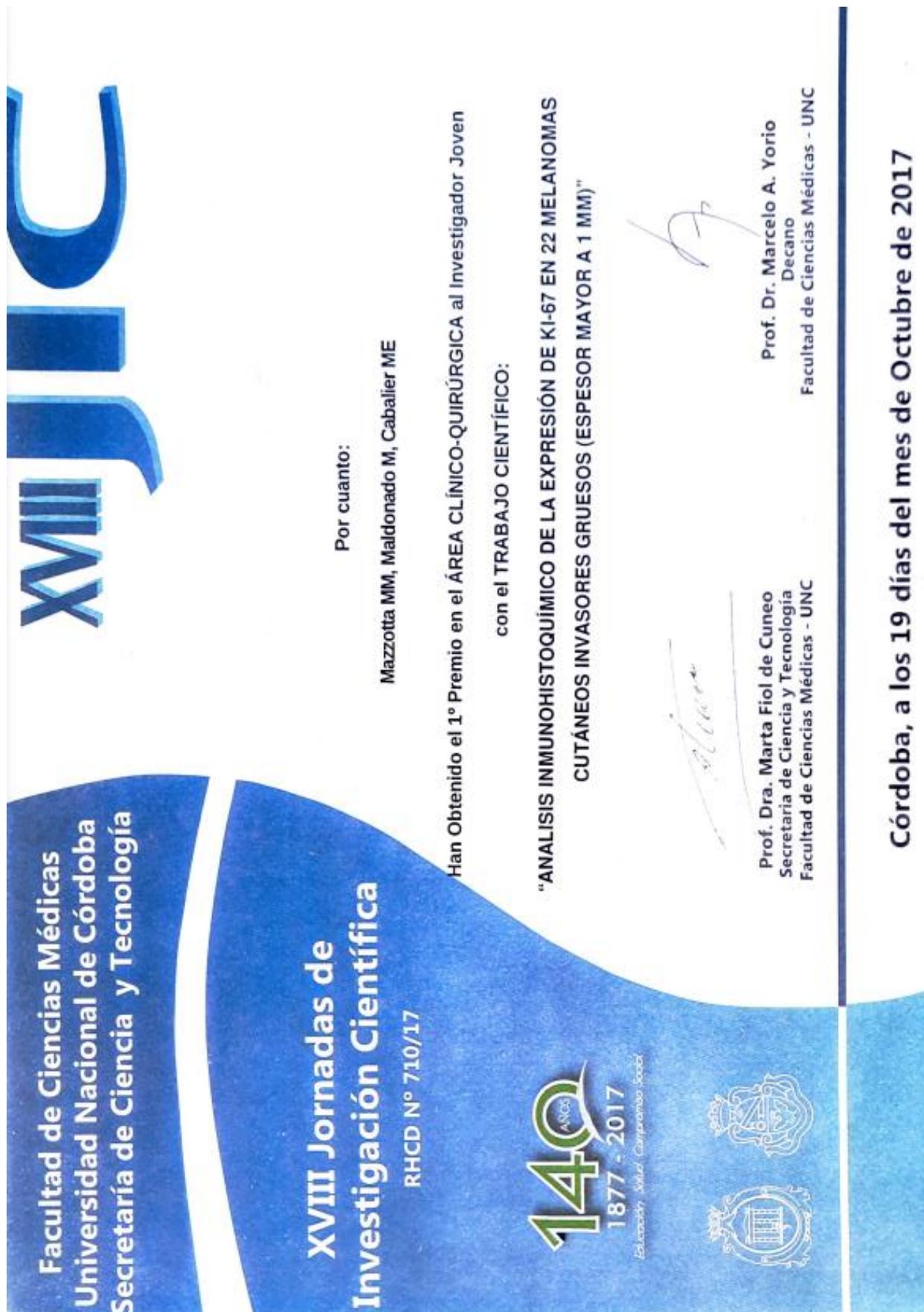
23-02-2017

Firma Comité Académico
Fecha

Prof. Dr. Bernardo José Gandini
Coordinador
Comité Capacitación y Docencia
Hospital Nacional de Clínicas

ANEXO

Trabajos científicos presentados/disertaciones



Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba
Secretaría de Ciencia y Tecnología

XVIII

**XVIII Jornadas de
Investigación Científica**
RHCD N° 710/17

140
AÑOS
1877 - 2017
Educación - Salud - Compromiso Social

Por cuanto:
Mazzotta MM, Maldonado M, Caballer ME

Han Obtenido el 1° Premio en el ÁREA CLÍNICO-QUIRÚRGICA al Investigador Joven
con el TRABAJO CIENTÍFICO:
"ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA EXPRESIÓN DE KI-67 EN 22 MELANOMAS
CUTÁNEOS INVASORES GRUESOS (ESPESOR MAYOR A 1 MM)"

Marta Fiol

Prof. Dra. Marta Fiol de Cuneo
Secretaría de Ciencia y Tecnología
Facultad de Ciencias Médicas - UNC

Marcelo A. Yorio

Prof. Dr. Marcelo A. Yorio
Decano
Facultad de Ciencias Médicas - UNC

Córdoba, a los 19 días del mes de Octubre de 2017

JORNADA INVERNAL S.A.P. 2017

10 de junio de 2017 - Buenos Aires - Argentina

Se deja constancia que el trabajo

MELANOMA CUTÁNEO INVASOR: ASPECTOS CLÍNICOS Y PATOLÓGICOS EN UNA SERIE DE CASOS DE 20 AÑOS BASADOS EN NORMAS DEL COLEGIO AMERICANO DE PATÓLOGOS 2016

Dionisio de Cabalier María, Mazzotta Marco, Kaplan Reina,
Meza Vetanzo Zacarías, Reinoso Nancy
Servicio de Patología, Hospital Nacional de Clínicas, Córdoba

ha sido presentado durante la Jornada Invernal S.A.P. 2017

en la modalidad de "Póster"

Buenos Aires, 10 de junio de 2017

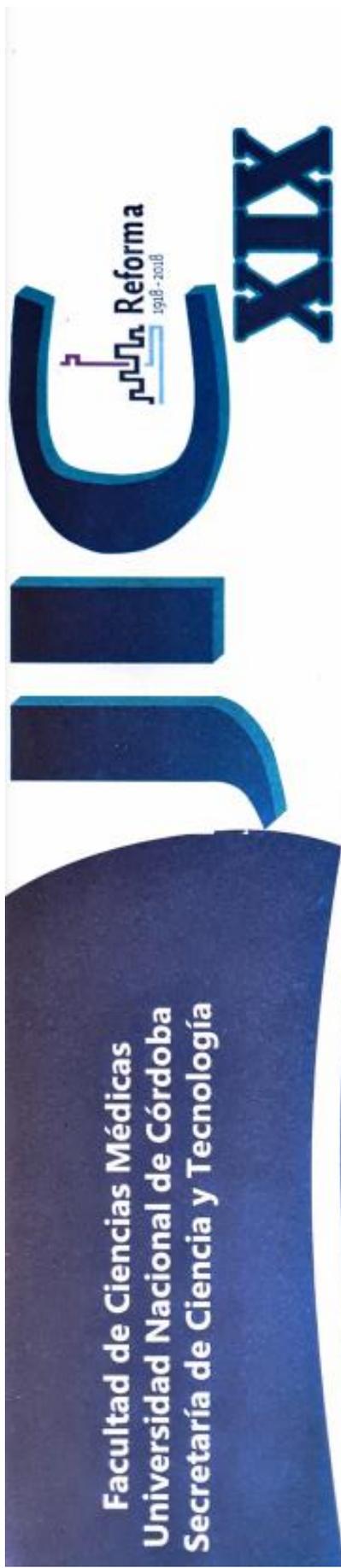


Dra. María Fernanda Metrebián
Secretaria



Dra. Marina Narbaitz
Presidente

Acredita 5 puntos



**XIX Jornada de
Investigación Científica**
RHCD N° 636/18

Por cuanto:

Mazzotta MM, Osiecki N, Cabalier MED

Han presentado el **TRABAJO CIENTIFICO:**

Determinación inmunohistoquímica de galectina-1 y ki-67 en melanoma con estudio de parámetros clinicopatológicos

Prof. Dra. Marina Ponzio
Secretaría de Ciencia y Tecnología
Facultad de Ciencias Médicas - UNC

Prof. Dr. Rogelio Pizzi
Decano
Facultad de Ciencias Médicas - UNC

Córdoba, a los 3 días del mes de Octubre de 2018

XXXVIII Jornadas Científicas y Culturales de Patólogos y Citopatólogos de la Provincia de Córdoba

Córdoba, República Argentina, los días 12 y 13 de Octubre de 2018,
Centro de Convenciones del Dinosaurio Mall Alto Verde

Sociedad de Anatomía Patológica y
Citopatológica de Córdoba
Filial del Círculo Médico de Córdoba
Asociación Civil
Personería Jurídica 338 "A"/09



Certifico que el/la Dr./a.

MARCO MAZZOTTA

ha participado en carácter de
DISERTANTE

**Tema: "MELANOMA: PROCESAMIENTO, REPORTE Y
TÉCNICAS COMPLEMENTARIAS PARA SU ESTUDIO"**

Dr. Alejandro Zaya
Secretario Gral. SAPHYCC

Dra. Catalina Firley
Secretaría Cient. SAPHYCC

Dra. Liliana Gelman
Presidente SAPHYCC

Córdoba 13 de Octubre de 2018



FCM
Facultad de
Ciencias Médicas



UNC

Universidad
Nacional
de Córdoba

JIC XX

XX Jornada de Investigación Científica

RD N° 474/19

Por cuanto los autores **MAZZOTTA MM, RODRIGUEZ N, OSIECKI N, MALDONADO M, KAPLAN R, CABALIER MED** han presentado el trabajo científico **FRECUENCIA DE FOTODAÑO HISTOLÓGICO CRÓNICO, VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS E ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN MELANOMA CUTÁNEO NO LENTIGO MALIGNO**

Se extiende el presente CERTIFICADO.

Dra. Marina Pomizio
Secretaria de Ciencia y Tecnología
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba

Prof. Dra. Marta Fiol de Cuneo
Vicedecana
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba

Prof. Dr. Rogelio Pizzi
Decano
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, a los 9 días del mes de Octubre de 2019