



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE MEDICINA

HOSPITAL CENTRAL "DR. IGNACIO MORONES PRIETO"

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA
ESPECIALIDAD DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

**ASOCIACIÓN DE LA INMUNOEXPRESIÓN DE RECEPTOR DE VITAMINA D
CON EL NIVEL DE BRESLOW Y ASOCIACIÓN DE LA INMUNOEXPRESIÓN DE
PDL-1 CON EL NIVEL DE BRESLOW EN PACIENTES CON MELANOMA
CUTÁNEO**

DRA. HORTENCIA ELIZABETH MENDOZA LARA

ASESOR:

M. C NADIA JUDITH GÓMEZ HERNÁNDEZ

ASESOR METODOLÓGICO

M. C JUAN FRANCISCO HERNÁNDEZ SIERRA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIDAD EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

TÍTULO DE TESIS
**ASOCIACIÓN DE LA INMUNOEXPRESIÓN DE RECEPTOR DE VITAMINA D
CON EL NIVEL DE BRESLOW Y ASOCIACIÓN DE LA INMUNOEXPRESIÓN DE
PDL-1 CON EL NIVEL DE BRESLOW EN PACIENTES CON MELANOMA
CUTÁNEO**

PRESENTA
DRA. HORTENCIA ELIZABETH MENDOZA LARA

ASESORES	FIRMAS
M.C. NADIA JUDITH GÓMEZ HERNÁNDEZ. ASESOR DE TESIS.	
DR. FRANCISCO HERNANDEZ SIERRA. ASESOR METODOLÓGICO.	
SINODALES	
DR. CUAUHTEMOC OROS OVALLE. PRESIDENTE.	
DRA. MARY CARMEN GUTIÉRREZ GIL.	
DR. DAVID MARTÍNEZ GALLA.	
M. EN C. MA. DEL PILAR FONSECA LEAL JEFE DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO CLÍNICO DE LA FACULTAD DE MEDICINA	M. EN C. NADIA JUDITH GÓMEZ HERNÁNDEZ COORDINADOR DE LA ESPECIALIDAD EN ANATOMÍA PATOLÓGICA



RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La incidencia de melanoma a nivel mundial es de 2.8 a 3.1 por 100,000 habitantes. En México la incidencia es de 1.8 por 100000 habitantes, con una prevalencia mayor en mujeres 57.1%, en el último reporte emitido por la clínica de melanoma en México (INCan), se hace referencia a un aumento del 500% durante el periodo de 1980 a 2002. El melanoma es la neoplasia maligna con diferenciación melanocítica, en su evaluación histopatológica la profundidad del tumor en milímetros (Breslow) es una medida reproducible que predice la conducta posterior del melanoma y es el factor pronóstico más importante. El calcitriol (forma activa de vitamina D), se une a su ligando específico VDR, dicha unión regula negativamente la proliferación de queratinocitos, fibroblastos y melanocitos. Se ha demostrado que existe una asociación inversa entre la inmunoexpresión del VDR y melanoma; así como asociación negativa con la profundidad en milímetros del tumor. Los linfocitos B, T y macrófagos expresan en su superficie la proteína de muerte celular programada (PD-1), se ha evidenciado que su ligando (PD-L1) se expresa en carcinomas de pulmón, ovario, colon y melanoma. La interacción del eje PD-1/PD-L1, en las células inflamatorias disminuye la producción de citocinas así como su activación. En las células neoplasias tiene un efecto antiapoptótico y proliferativo. Estudios han demostrado la asociación positiva de la inmunoexpresión de PD-L1 con la longitud de Breslow en el melanoma. **OBJETIVO:** Determinar si existe asociación independiente entre la inmunoexpresión de VDR y PDL-1 con el nivel de Breslow. **MATERIAL Y MÉTODOS:** En un periodo de 14 años se analizaron 57 casos con diagnóstico melanoma cutáneo, se le realizó marcaje por inmunohistoquímica para Receptor de Vitamina D (VDR) y Ligando de Proteína de Muerte Celular (PD-L1). **RESULTADOS** Se evaluaron 57 casos de melanoma cutáneo escisionales, de estos casos 33 fueron mujeres, el rango de edad de los casos fue de 1 a 99 años con media de edad de 55.49 años (DE=23.09 años). Se demostró una asociación positiva entre la inmunoexpresión de PD-L1 y Breslow ($p=0.0008$). En los casos positivos para PD-L1, la probabilidad de tener un Breslow mayor a 1mm fue de



96.7% (VPP). En los casos negativos para PD-L1, la probabilidad de tener un Breslow menor a 4 mm fue de 95% (VPN). En el análisis multivariable se demostró que la inmunexpresión VDR tiene una asociación significativa e independiente con el nivel de Breslow cuando se incluye la edad ($p=0.025$),

CONCLUSIONES: Este estudio demostró que en nuestra población existe una asociación directa entre la expresión de PD-L1 y la longitud de Breslow, La inmunexpresión de PD-L1 nos habla por tanto de un comportamiento más agresivo del melanoma. La asociación negativa de VDR y Breslow es significativa solo si se asocia con la edad y se observa como los niveles menores existe una tendencia al aumento de su inmunexpresión. Con este estudio se da perspectiva de la asociación del eje PD-1/PD-L1 y se abre paso a nuevas líneas de investigación.



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Medicina
Tesis para obtener el Diploma de la Especialidad en Anatomía Patológica

DEDICATORIAS

A mi familia



AGRADECIMIENTOS

A todos mis maestros estos años de residencia, mi asesora de tesis la Dra. Nadia Gómez, El Dr. Cuauhtémoc Oros, la Dra. Mary Carmen Gutiérrez, la Dra. Claudia Peña, y el Dr. David M. Galla, gracias por todas sus enseñanzas, su calidez, por su guía, su paciencia y dedicación.

Al personal del área técnica que formaron parte de esta tesis tanto del área quirúrgica como de inmunohistoquímica.

A mis compañeras Isabel, Olga, Paty, Jennifer y Selene que en más de una forma me han apoyado.

Al departamento de Dermatología por proporcionar apoyo con el anticuerpo VDR

Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	I
AGRADECIMIENTOS	IV
ANTECEDENTES	1
JUSTIFICACIÓN	6
HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS	8
SUJETOS Y MÉTODOS	9
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	12
ÉTICA	13
RESULTADOS	14
DISCUSIÓN	22
LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN	24
CONCLUSIONES	25
BIBLIOGRAFÍA	26
ANEXOS	32

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Breslow supervivencia, bordes y ganglios.....	3
TABLA 2. Variables.....	11
TABLA 3. Asociación de VDR con Breslow y las variables, de edad, sexo y úlcera.....	16
TABLA 4. Asociación de PD-L1 con Breslow y las variables, de edad, sexo y úlcera.....	17
TABLA 5. Casos con un nivel de Breslow >1 mm cuando PD-L1 es positivo.....	18
TABLA 6. Casos con un nivel de Breslow >4 mm cuando PD-L1 es positivo.....	19
TABLA 7. Asociación entre VDR PD-L1 y Breslow.....	21

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Porcentaje de casos según el tipo de melanoma	14
Gráfica 2. Porcentaje de casos por Breslow.....	15
Gráfica 3. Inmunoexpresión de VDR en intensidad por Breslow.....	15
Gráfica 4. Porcentaje de casos PD-L1 positivos por Breslow.....	16
Gráfica 5. Porcentaje de casos PD-L1 negativos por nivel de Breslow.....	17
Gráfica 6. PD-L1 positivo en los casos con Breslow de 1 mm y >1 mm.....	18
Gráfica 7. PD-L1 negativo en los casos con Breslow de 1 mm y >1 mm.....	19
Gráfica 8. PD-L1 positivo en los casos con Breslow de 4 mm y >4 mm.....	20
Gráfica 9. PD-L1 negativo en los casos con Breslow de 4 mm y >4 mm.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

1,25(OH)₂D₃: Calcitriol (1-alpha,25-dihidroxicolecalciferol)

CPK C: Proteína quinasa c

CYP27A1: Esterol 27-hidroxilasa

CYP27B1: 1 α -hidroxilasa

CYP2R1: Vitamina D 25-hydroxlasa

IHQ: Inmunohistoquímica

MITF: Factor de transcripción asociado a microftalmia

MMP-1 (metalproteinasa matriz-1)

PD1: Proteína de Muerte Programada

PD-L1: Ligando de Proteína de Muerte Programada.

Proteína RB: proteína de retinoblastoma

UVB Rayos ultravioleta B

VDR: Receptor de Vitamina D

WHO: World Health Organization

PAR-1: receptor activado por proteasa 1

RAF Serina/Treonina protein quinasa proto oncogén

RAS Oncogen de sarcoma de ratas

RAF Serina/Treonina protein quinasa proto oncogén

RAS Oncogén de sarcoma de ratas

ANTECEDENTES.

EPIDEMIOLOGÍA

A nivel mundial el melanoma cutáneo ocupa el 15º y 16º lugar de neoplasias malignas en hombres y mujeres respectivamente,⁽¹⁾ la edad promedio de diagnóstico es a los 57 años ⁽²⁾, con incidencia de 2.8–3.1 por 100,000 habitantes (2, 3, 4, 5)

En México GLOBOCAN 2012 reportó una incidencia de melanoma de 1.8 por 100,000 habitantes y una mortalidad de 0.4 por 100 000 habitantes.^(6, 7, 61) En el último reporte emitido por la clínica de Melanoma en México (INCan) se observó la prevalencia mayor en mujeres con un 57.1% y edad de presentación a los 54.3 años. De igual manera se hace referencia a un aumento del 500% durante el periodo de 1980 al 2002^(6, 8, 9)

Ruiz Maldonado *et al* analizaron las características del melanoma en hospitales mexicanos, el tipo más frecuente encontrado fue el melanoma lentiginoso acral que se asocia a áreas no expuestas y la localización más frecuente fue en extremidades inferiores.^(9, 10)

FISIOPATOLOGÍA

La piel se divide en dos capas principales dermis y epidermis, la epidermis que se dividen en cinco estratos basal, granuloso, espinoso, lúcido y corneo; está constituida además por cuatro tipos celulares, queratinocitos, células de Langerhans, de Merkel y melanocitos de los cuales se origina el melanoma. La relación de melanocito- queratinocito es 1:10. Los melanocitos son células derivadas de la cresta neural, su localización es en la unión dermo-epidérmica así como en las unidades pilosebáceas, a diferencia de los queratinocitos los melanocitos no poseen tonofilamentos o desmosomas. Al momento del contacto con los rayos UV y asociado al factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) se inicia producción y secreción de melanina por medio de melanosomas.⁽¹¹⁾⁽¹²⁾⁽¹⁾ Esta exposición a rayos UV desencadena las vías moleculares de proliferación MAPK (proteína quinasa activadora por mitógeno) y PTEN/AKT

(homólogo de fosfatasa y tensina); en los melanomas estas vías se activan por medio mutaciones somáticas en RAF y RAS; ^(21,22,23,25)

De acuerdo a sus características clínicas e histopatológicas el melanoma se divide en cuatro subtipos: lentigo maligno, extensión superficial, nodular y lentiginoso acral.⁽¹⁾ El tipo lentigo maligno se origina frecuentemente en cabeza y cuello, se asocia a pacientes de la tercera edad y generalmente tiene un pronóstico favorable. El melanoma extensión superficial se caracteriza por un patrón de crecimiento radial previo a la invasión vertical, se presenta en jóvenes y es el más frecuente en población caucásica. El tipo nodular se presenta como un nódulo de crecimiento rápido, ulcerado y pigmentado, siendo el subtipo más agresivo. Los melanomas originados en las palmas, plantas, o bajo la región ungueal pertenecen al tipo de lentiginoso acral, se presenta tardíamente, en pieles de mayor pigmento y es el más frecuente en nuestro país. Existen diversos factores histopatológicos considerados pronóstico en los melanomas, el más importante para esta neoplasia es la profundidad del tumor. ^(15, 16)

En 1970 se realizó por primera vez la medición de la profundidad del tumor objetivamente con micrómetro. Permitiendo establecer la reproducibilidad en la medida, se demostró además que los melanomas con profundidad menor a 0.76mm, estaban libres de metástasis ganglionares, esta es una medida reproducible que predice la conducta posterior del melanoma y es el índice pronóstico más estudiado; dicha medida se realiza tomando como base la capa granulosa hasta la máxima profundidad de las células neoplásicas, cuando el tumor es ulcerado la medida se realiza desde la base la úlcera.⁽¹⁶⁾ Esta medida también es útil para indicación de escisión de ganglio centinela y ampliación de bordes quirúrgicos (Tabla 1).

TABLA 1 Breslow supervivencia, bordes y ganglios

NIVEL BRESLOW mm	SOBREVIDA A 5 AÑOS	MANEJO BORDES	GANGLIO CENTINELA
<1	92%	1 cm	
1.1-2	80%	2 cm	+
2.1-4	79%	2 cm	+
>4	67%	2-3cm	+

Balch CM1, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. J Clin Oncol. 2009 Dec 20;27(36):6199-20

Mannick JA, et al. Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented. Holzheimer. Munich: Zuckschwerdt; 2001

Novotná K, et al. Surgical treatment of melanoma. Acta Chir Plast. 2018 Spring;59(3-4):149-155.

Úlcera en melanoma, se define como la ausencia de una epidermis intacta sobre la mayor parte de un tumor primario, desde 1980 se describió la disminución de sobrevida de 80 a 55% en los pacientes con melanomas ulcerados y su presencia incrementa el riesgo de metástasis. (18,19, 20)

EL PAPEL DEL RECEPTOR DE VITAMINA D

Bajo la acción de los rayos UVB existe una conversión en la epidermis de 7 dehidrocolesterol a vitamina D, los queratinocitos a su vez metabolizan ésta por la acción de las hidroxilasas, transformándola en su forma activa, calcitriol. El receptor de vitamina D se encuentra en el núcleo y citoplasma de queratinocitos, fibroblastos y melanocitos, el calcitriol se une a dicho receptor y esta interacción regula la proliferación de las células del estrato basal así como la diferenciación secuencial de queratinocitos, regula además negativamente la proliferación melanocítica. (33, 34, 35,36)(37-40)

El efecto de la vitamina D y su receptor en melanoma fue estudiado desde 1981, en cultivo de células de melanoma se identificó una afinidad aumentada por calcitriol mediada por un receptor específico, el receptor de vitamina d VDR. La inclusión de calcitriol en el medio de cultivo de melanoma demostró posteriormente una disminución de la proliferación neoplásica dosis dependiente,⁽⁴¹⁾ además se demostró que los niveles séricos de calcitriol bajos se asociaban con un aumento en la profundidad de tumor y una reducción en la sobrevida. (42, 43, 44) Estudios subsecuentes se basaban en el papel de la vitamina D sérica, Lucia Spath *et al.* demostraron que los niveles séricos de vitamina D fueron inversamente proporcionales al a proliferación neoplásica en melanoma. (50)

Por su parte Wyatt *et al.* encontraron que la deficiencia de vitamina D en el momento del diagnóstico de melanoma se asoció con una mayor longitud de Breslow. ⁽⁵²⁾

Posterior a estos estudios se inició la evaluación de la interacción calcitriol-VDR, basándose en el análisis del receptor, Anna A. Brożyna *et al.*, del Departamento de patología tumoral y patomorfología de Polonia establecieron la relación entre la expresión del VDR a través de inmunohistoquímica y la progresión de la enfermedad en pacientes con melanoma, en dos estudios.^(47,48) Encontraron una disminución en la inmunoexpresión de VDR en melanomas en fase de crecimiento vertical y un aumento proporcional de la inmunoexpresión de VDR con el periodo libre de la enfermedad. ^(47, 48, 49)

Del Puerto *et al.* en un estudio comparativo entre la inmunoexpresión del VDR, nevos displásicos y melanoma encontraron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) con positividad en el citoplasma del 59% de los casos de nevo displásico y 16% de los casos de melanoma. A su vez la inmunoexpresión citoplásmica de VDR en los melanomas se asoció inversamente a la profundidad del tumor ($p = 0.004$).⁽⁵³⁾

EL PAPEL DEL LIGANDO DE PROTEÍNA DE MUERTE PROGRAMADA PD-L1

EL ligando de proteína de muerte programada 1 (PD-L1), es un miembro de la familia de moléculas co-estimuladoras B7, el cual regula la actividad inmune por medio de la unión a su receptor PD-1 (Proteína de muerte programada 1). ⁽⁵⁵⁾ el receptor de superficie PD-1 fue descubierto en 1992, se localiza en linfocitos T, B y macrófagos; ésta es una molécula de co estimulación que actúa como regulador negativo de la activación de linfocitos T. El eje PD-1 - PD-L1 regula la respuesta inmune y se ha identificado su expresión en carcinomas pulmonares, de ovario, colon y en melanoma cutáneo Esta interacción promueve la señalización intracelular mediante CD 28 e IL 2, con disminución en la producción de IL2, INF γ y TNF α , inhibe además las señales de activación de linfocitos y su diferenciación. En las células neoplásicas tiene un efecto antiapoptótico y promueven la supervivencia celular. ^(55, 56)

Tabue *et al.* encontraron que la inmunexpresión de PD-L1 tumoral se asoció a linfocitos perilesionales en el 98% de los casos. Este estudio planteó que la vía de activación PD-L1/PD-1 funciona como un mecanismo de resistencia inmune adaptativa. ⁽⁵⁷⁾ Por su parte Alessi *et al* encontraron un aumento significativo de PD-L1 en los ganglios linfáticos metastásicos de melanoma. ⁽⁶⁰⁾ También Kleffel S. *et al* analizaron esta vía y demostraron en el 2015 que la interacción del eje PD-L1/PD-1 promueve el crecimiento tumoral en melanomas. ⁽⁵⁹⁾

Hino *et al*, evaluaron la expresión PD-L1 en melanomas, por medio de inmunohistoquímica, en su estudio estudiaron 59 casos de melanoma de los cuales el 78% se presentaron en extremidades y el tipo más frecuente fue lentiginoso acral. En dicho estudio se observó una asociación lineal estadísticamente significativa ($p=0.001$) entre la inmunexpresión de PD-L1 y Breslow. ⁽⁶³⁾ por otro lado Oba *et al* estudiaron la inmunexpresión de PD-L1, en nevo melanocítico, melanoma primario y metastásico, al comparar la inmunexpresión de PDL-1 entre nevo melanocítico y melanoma se encontró una asociación negativa para los nevos melanocíticos y positiva para melanomas siendo estadísticamente significativa ($p=0.01$); también demostraron una asociación significativa entre la inmunexpresión de PD-L1 y nivel de Breslow mayor a 2 mm ($p=0.003$). ⁽⁶⁴⁾



JUSTIFICACIÓN.

En México no existe un estudio que compare directamente el nivel de Breslow con PD-L1 o con VDR, siendo esta una asociación de relevancia por el impacto en el pronóstico de esta neoplasia.

Existen líneas de investigación en relación al VDR y PD-L1 en melanoma, sin embargo en México existe escasa evidencia de estudios encaminados a estas líneas.

Existe aumento en la incidencia y mortalidad del melanoma, en México, los diagnósticos adecuados y el estudio de factores pronósticos impacta en el manejo ulterior del paciente.

Debido a los diferentes factores etiológicos que nuestra población presenta en el desarrollo de esta neoplasia; este estudio permite ampliar el conocimiento en cuanto al valor pronóstico de estos marcadores por inmunohistoquímica, así como abrir paso a su estudio para uso terapéutico



HIPÓTESIS.

- 1.- Existe una asociación negativa entre la inmunoexpresión del receptor de Vitamina D y el nivel de Breslow del melanoma cutáneo.
- 2.- Existe una asociación positiva del PDL-1 y el nivel de Breslow del melanoma cutáneo.



OBJETIVOS.

Objetivo general

- Determinar la asociación independiente entre la inmunoexpresión de VDR, PDL-1 con el nivel de Breslow.

Objetivos específicos:

- Determinar la inmunoexpresión tumoral de VDR y comparar con el nivel de Breslow.
- Determinar la inmunoexpresión tumoral de PDL-1 con el nivel Breslow.

Objetivos secundarios:

- Describir las características epidemiológicas de los pacientes con diagnóstico de melanoma cutáneo del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”.



SUJETOS Y MÉTODOS.

LUGAR DE REALIZACIÓN: Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Central Dr. Ignacio Morones Prieto, en San Luis Potosí, San Luis Potosí.

UNIVERSO

Pacientes con diagnóstico de melanoma cutáneo el servicio de Anatomía Patológica en el periodo de tiempo comprendido entre el 01 de enero del año 2004 al 01 de enero del año 2018.

MUESTREO

Por conveniencia.

DISEÑO DEL ESTUDIO:

Transversal, analítico, retrospectivo

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

- Inclusión:
 - Diagnóstico histopatológico de melanoma cutáneo en especímenes de biopsia escisional.
 - Disponibilidad de bloques de parafina en el archivo.
- Exclusión:
 - Especímenes de biopsias incisionales.
 - Neoplasia melanocíticas benigna al evaluar el cas.
 - Casos en los cuales no se cuente con el material de la totalidad del espécimen escisional.



VARIABLES EN EL ESTUDIO

- Variable Dependiente: Nivel de Breslow
- Variables independientes:
 - Inmunoexpresión de VDR
 - Úlcera
 - Edad
 - Sexo

- Variable Dependiente: Nivel de Breslow
- Variables independientes:
 - Inmunoexpresión de PD-L1
 - Úlcera
 - Edad
 - Sexo

TABLA 2. Variables

Dependiente				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Nivel de Breslow	Longitud desde la capa granulosa hasta el área más profunda de tumor	≤1 1.1-2 2.1-4 >4	mm	Continua
Independiente				
Variable	Definición operacional	Valores posibles	Unidades	Tipo de variable
Inmunoexpresión de VDR	Presencia de inmunexpresion de VDR	0 = negativo 1 = positivo		Categórica
Inmunoexpresión de PD-L1	Presencia de inmunexpresión de PD-L1>5%	0 = negativo 1 = positivo		Categórica
Úlcera	Solución de continuidad epidérmica	1=presencia 0=ausencia		Categórica
Variables de confusión / sociodemográficas				
Edad	Años cumplidos al diagnóstico	0-∞	Años	Continua
Sexo	Sexo biológico del paciente	Masculino Femenino	M F	Nominal

NOTA: En los casos ulcerados se tomara la medida de Breslow desde la base de la úlcera perpendicular hasta el área más profunda del tumor. Para la evaluación de la Inmunoexpresión de VDR y PD-L1 ver Anexo 9.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

CÁLCULO DEL TAMAÑO DE LA MUESTRA:

Regresión logística múltiple

El cálculo del tamaño de la muestra se realizó con base en el análisis estadístico propuesto (regresión logística con 5 grados de libertad). La probabilidad del evento según estudios previos es de 0.2 por lo que

$$N = (4 \times 10) / (\text{Probabilidad del evento} - 1)$$

$$N = (4 \times 10) / (0.2 - 1)$$

$$N = 50$$

Se calculan medidas de tendencia y dispersión para cada una de las variables según escala y dispersión para determinar si existe asociación.

Se realizara una regresión logística múltiple según el siguiente modelo:

$$\mathbf{BRESLOW = VDR + ÚLCERA + EDAD + SEXO}$$

$$\mathbf{BRESLOW = PD-L1 + ÚLCERA + EDAD + SEXO}$$



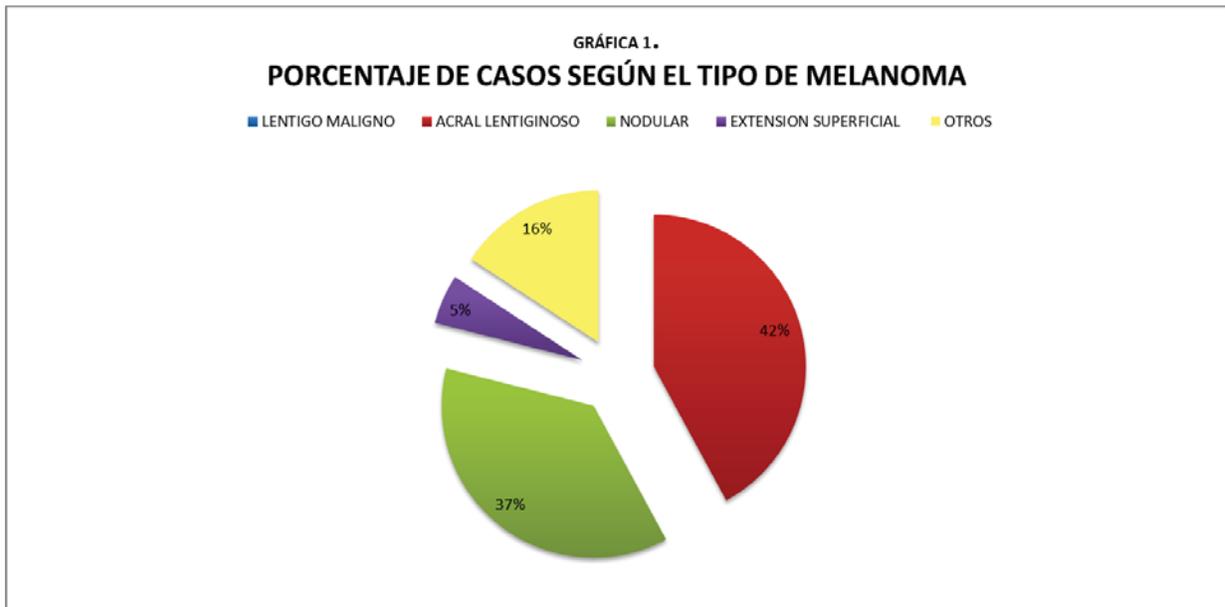
ÉTICA.

Investigación sin riesgo. En el presente estudio, no fue necesario hacer partícipe a los pacientes de manera directa, ya que solo se basó en los informes histopatológicos y los bloques de parafina disponibles en archivo. La manera de identificación de cada caso, fue sólo con el número de quirúrgico asignado, y los datos de cada uno de ellos se manejarán con estricta confidencialidad. Por lo tanto, no fue necesario obtener el consentimiento informado. Posterior a revisar la declaración de Helsinki, la ley general de salud y la Norma Oficial Mexicana del expediente clínico, se concluyó que no existe riesgo alguno para los pacientes. Cuenta con autorización del comité de ética e investigación No. 14-18 y registro: CONBIOETICA-24-CEI-001-20160427 (ver anexos 6 y 7).

RESULTADOS.

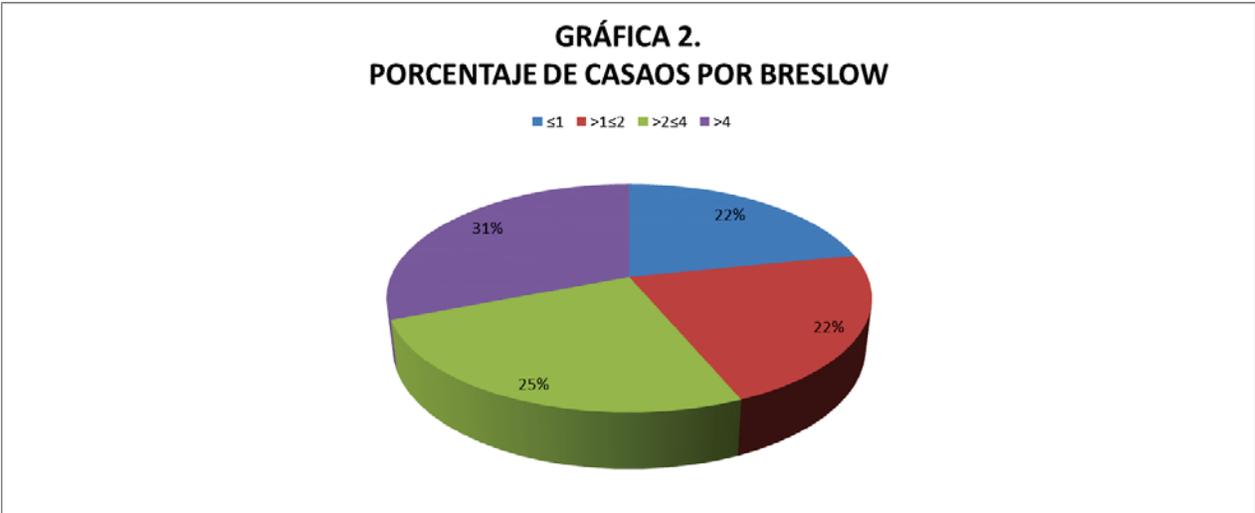
Características de la población de estudio

En un periodo de 14 años (enero de 2004 a enero del 2018), se recolectaron en el Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto” un total de 222 casos con diagnóstico histopatológico de melanoma, de los cuales 162 fueron cutáneos, 60 casos fueron melanomas no cutáneos. De los melanomas identificados 63 especímenes fueron escicionales y se trabajó sobre los 57 casos con material disponible en el departamento; 33 fueron mujeres con un rango de edad de 1 año a 99 años y una media de edad de 55.49 años (DE=23.09 años). El tipo más frecuente fue lentiginoso acral con un 42% seguido de nodular con un 37% (ver gráfica 1.).

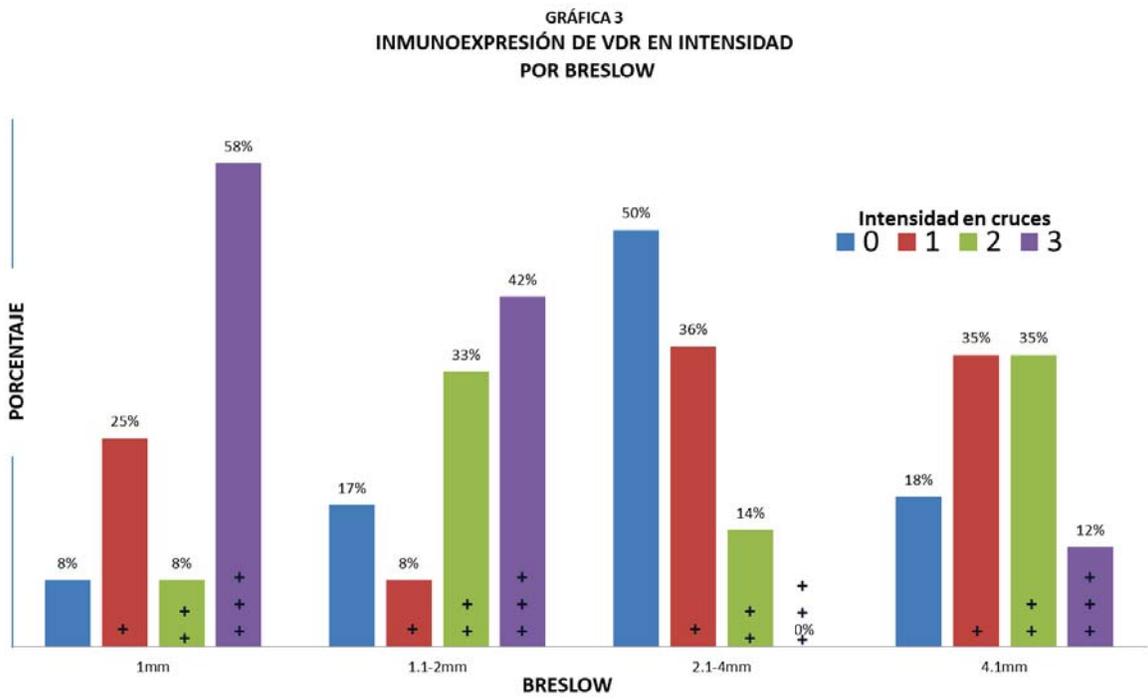


Dentro de estos casos el nivel de Breslow fue 21% de ≤ 1 mm, 21% en el rango de 1.1- 2 mm, 27% 2.1- 4 mm y 31% > 4 mm, con una media de Breslow de 4.61mm (DE=4mm).

En la gráfica 2 se muestra la distribución del nivel del Breslow del total de la muestra.



Como se puede observar la mayor cantidad de casos corresponden al nivel de Breslow mayor a 4 mm seguido de los casos con Breslow de 2.1 a 4 mm. En cuanto al análisis descriptivo de la inmunopresión de VDR, en los casos con niveles de Breslow de 1mm y 1.1-2mm la intensidad +++ de inmunopresión de VDR fue de 58% y 42% respectivamente, en los casos con Breslow de 2.1-4mm y 4.1 mm fue de 0% y 12%. En la gráfica 3 se muestra la Inmunopresión de VDR en los diferentes niveles de Breslow.

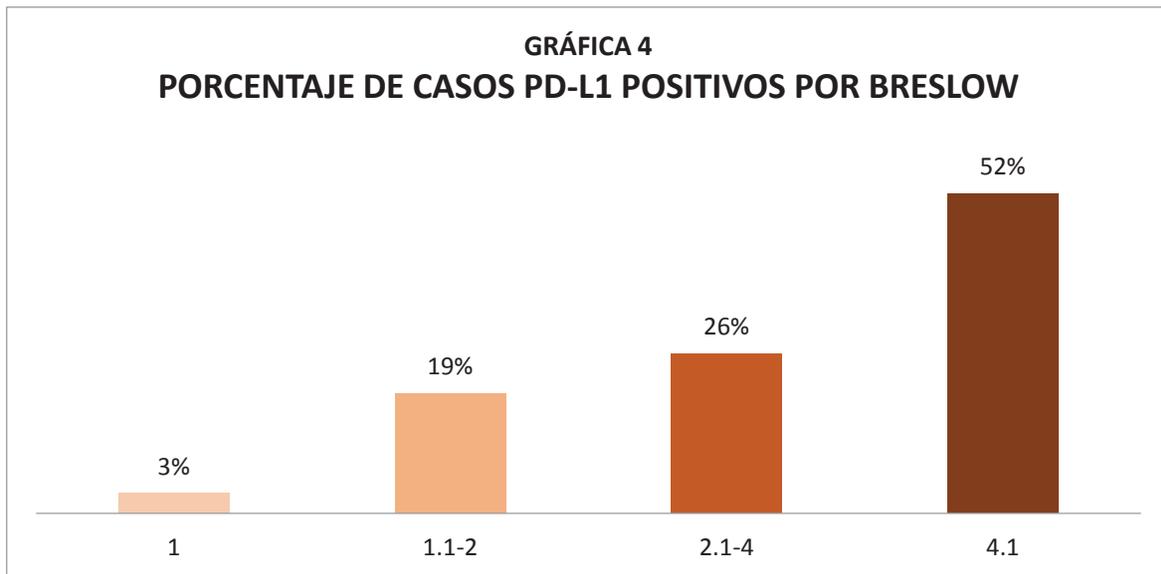


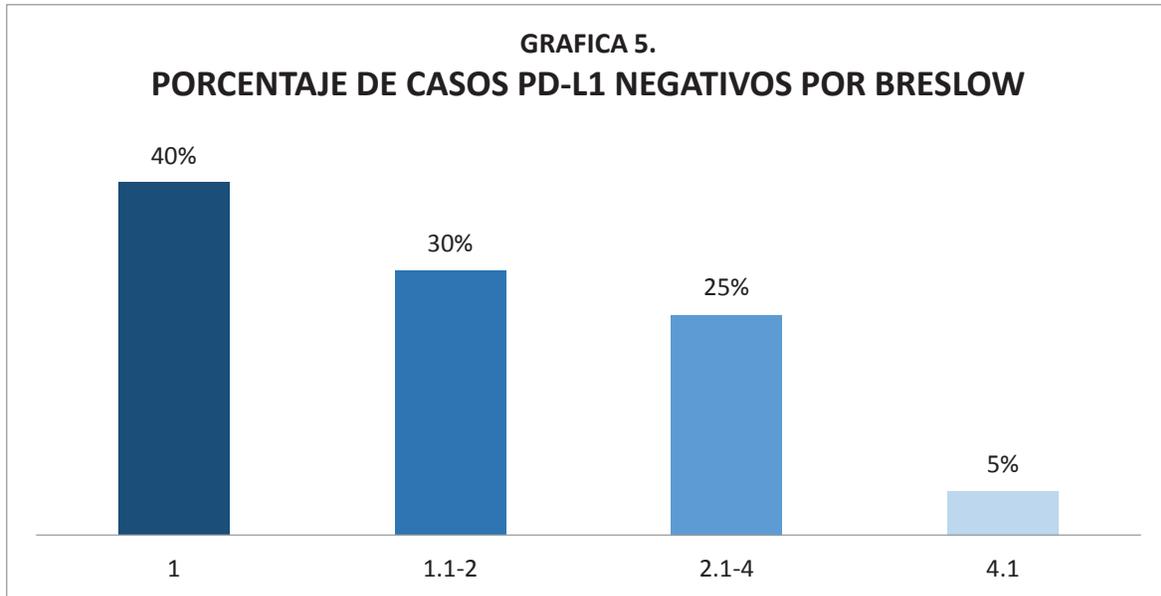
En cuanto al análisis de varianza de los niveles de Breslow en cada una de las 3 categorías de VDR 1 (+), 2(+) y 3(+), el resultado fue no significativo $p=0.46$ (ANOVA de una vía), sin embargo el análisis multivariable demostró que VDR tiene una asociación significativa e independiente con el nivel de Breslow cuando se incluye edad en la ecuación $p=0.025$ (ver tabla 3).

TABLA 3 Asociación de VDR con Breslow y las variables, de edad, sexo y úlcera

BRESLOW	Coef	Std. Err	z	P> z	[95% Conf. Interval]	
VDR	5253828	.2337594	-2.25	0.025	-0.9835427	-0.0672229
EDAD	.0271475	.0128023	2.12	0.034	0.0020555	0.0522395
FEOMA1	1149004	0.4993196	-0.23	0.0818	-1.093549	0.8637479
ÚLCERA	.9227298	0.489397	1.89	0.059	-0.0364708	1.88193

En cuanto al análisis de la inmunexpresión de PD-L1, En las gráficas 4 a 5 se muestran de igual forma la distribución de los niveles de Breslow en los casos PD-L1 positivos y PD-L1 negativos.





En los casos positivos a PD-L1 se observó una media de Breslow de 6.4 con una desviación estándar de 0.9, en los casos negativos una media de 2.1 con una desviación estándar de 0.63. El análisis de regresión logística múltiple muestra una que la Inmunoexpresión de PD-L1 se asocia significativamente al nivel de Breslow, independientemente de la edad, sexo o ulceración con una $p=0.0008$. (Tabla 4)

TABLA 4 Asociación de PD-L1 con Breslow y las variables, de edad, sexo y úlcera

BRESLOW	Coef	Std. Err	z	P> z	[95% Conf. Interval]
PDL1	2.784658	0.6779654	4.11	0.0008	1.45587 4.113445
EDAD	0.137996	0.0148156	0.93	0.352	-0.015238 4 0.0428377
FEOMA1	0.3965647	0.5049624	0.79	0.432	-0.531434 1.386273
ÚLCERA	0.060987	0.5545637	-0.11	0.912	-1.147912 1.02593

A continuación se analizaron los casos según la frecuencia de casos con un nivel de Breslow >1 cuando PD-L1 es positivo (Tabla 5). La sensibilidad y especificidad calculada fueron de 78.9% y 92.3% y los valores predictivos positivo y negativo fueron de 96.7% y 60% respectivamente

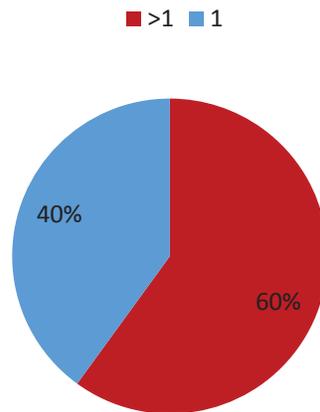
Estos resultados también se muestran en la gráfica 6 y 7.

TABLA 5 Casos con un nivel de Breslow >1 mm cuando PD-L1 es positivo

BRESLOW		
	>1 mm	≤1 mm
PD-L1 +	30	1
PD-L1-	8	12



GRÁFICA 7.
PD-L1 NEGATIVO
Casos con Breslow de 1 mm y mayores de 1 mm



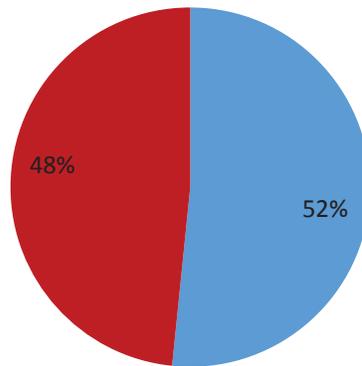
Además cuando se considera un nivel de Breslow >4 mm (Tabla 6) la sensibilidad y especificidad calculada fueron 94.1% y 55.8% y los valores predictivos positivo y negativo fueron 51.6% y 95% respectivamente se muestran estos en la gráficas 8. y 9.

TABLA 6 Casos con un nivel de Breslow >4 mm cuando PD-L1 es positivo

	BRESLOW	
	>4 mm	≤ 4 mm
PD-L1 +	16	15
PD-L1-	1	19

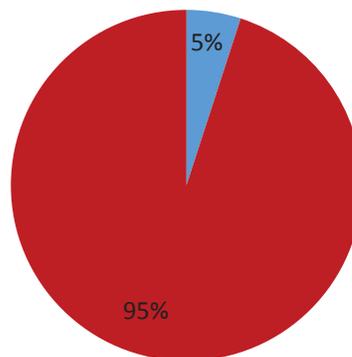
GRÁFICA 8.
PD-L1 POSITIVO
Casos con Breslow de 4 mm y mayores de 4 mm

■ >4 mm ■ 4 mm



GRÁFICA 9.
PD-L1 NEGATIVO
Casos con Breslow de 4 mm y mayores de 4 mm

■ >4 mm ■ 4 mm



Al momento de evaluar la asociación de la inmunoexpresión de VDR y PD-L1 no se encontró significancia, como se observa en la tabla 8.

TABLA 7 .Asociación entre VDR PD-L1 y Breslow

Breslow	Odds Ratio	Suff.	2*Pr(Suff)	[95% Conf. Interval]	
VDR	1.090378	61	0.9367	-0.4235891	2.872713
EDAD	0.9788947	2552	0.4913	-0.9180458	1.039082
PD-L1	18.0453	30	0.0072	2.03028	Inf

DISCUSIÓN.

En el departamento de Anatomía Patológica Se identificaron 162 casos con diagnóstico de melanoma de cuales se analizaron 57 para este estudio 33 fueron mujeres y 23 hombres, el tipo más frecuente fue lentiginoso acral y la longitud de Breslow que más se presentó fue mayor a 4 mm, estos datos concuerdan con la literatura sobre melanoma en población mexicana. En este estudio de tipo transversal evaluamos la asociación entre el nivel de Breslow y la inmunorreacción tumoral de VDR y PD-L1.

Encontramos que existe una asociación positiva entre el nivel de Breslow y la inmunoexpresión de PD-L1 ($p=0.008$), similar a lo descrito en la literatura, también demostramos que esta asociación fue independiente de las demás variables, edad, sexo y ulceración..

En los casos positivos para PD-L1, la probabilidad de tener un Breslow mayor a 1mm fue de 96.7% (VPP). Contrario a esto en los casos negativos para PD-L1, la probabilidad de tener un Breslow menor a 4 mm fue de 95% (VPN).

Dentro del análisis comparando con estudios previos, Taube *et al*, no refieren si su estudio fue en especímenes escisionales, el estudio de melanoma se realizó en población caucásica por tanto los subtipos más frecuentes difieren de los de nuestra población, en su estudio se observó de igual manera la asociación positiva significativa con la profundidad.

Hino *et al*. Estudiaron una población similar a la nuestra con el tipo más frecuente fue lentiginoso acral (66.1%) se observó en su estudio una asociación lineal entre la expresión de PD-L1 y Breslow con una $P=0.001$, al igual que en nuestro protocolo.⁽⁶²⁾ Por su parte Oba *et al*, estudiaron melanomas en la cuales 64.9% de los casos correspondieron a melanoma acral lentiginoso y el 76.6% se encontraron en extremidades, lo cual es similar a la población de nuestro estudio, así mismo presentan una asociación positiva significativa entre la longitud de Breslow y PD-L1 ($p=0.003$).

Respecto a la inmunoexpresión de VDR y longitud Breslow, el análisis estadístico no fue significativo $p=0.46$ (ANOVA de una vía); empero se observó una asociación significativa cuando se incluyó la edad. ($p=0.025$). Así mismo se identificó una tendencia negativa entre la intensidad de la inmunoexpresión de VDR y la longitud de Breslow. A diferencia del estudio de Del Puerto *et al*, ellos encontraron una asociación estadísticamente significativa entre la profundidad del melanoma y la inmunoexpresión de VDR ($p=0.004$), su estudio fue de casos y controles y además del estudio de melanomas también evaluaron nevos melanocíticos, la inmunoexpresión de VDR también fue asociada al estadio y pTNM, al ser el nivel de Breslow el parámetro pronóstico más importante, nuestro objetivo fue solo la comparación con esta medida. ⁽⁵³⁾ Comparado con el estudio de Brożyna *et al*, ellos realizaron la evaluación de lesiones melanocíticas, dentro de estas melanomas, los tipos de melanomas que estudiaron fueron similares a los de nuestro estudio predominando el tipo lentiginoso acral, ellos presentan una muestra mayor y demostraron una asociación significativa e independiente entre la longitud de Breslow y la inmunoexpresión de VDR ($p=0.0005$), también analizaron la inmunoexpresión nuclear y citoplasmica de dicho marcador y en nuestros casos no se evidencio expresión nuclear en los melanomas pero si en los controles.



LIMITACIONES Y/O NUEVAS PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN.

Siendo un estudio transversal el seguimiento y evolución del paciente es limitado. En la revisión de la bibliografía la inmunoexpresión del VDR se reportó en el citoplasma y núcleo, en nuestro estudio solo se observó inmunorreacción citoplásmica.

Comparado con el resto de la bibliografía nuestro universo de estudio correspondió a la muestra mínima calculada.

Con este estudio se da perspectiva de la asociación del eje PD-1/PD-L1 con nuevas líneas de investigación como el estudio de respuesta linfocitaria y/o el desarrollo de metástasis, etc. esto muestra una oportunidad de estudio que ampliaría el conocimiento y valor del estudio de PD-L1 de rutina en los casos de melanoma.

CONCLUSIONES.

Este estudio demostró que en nuestra población existe una asociación directa entre la expresión de PD-L1 y la longitud de Breslow, La inmunoexpresión de PD-L1 nos habla por tanto de un comportamiento más agresivo del melanoma.

En los casos positivos para PD-L1, la probabilidad de tener un Breslow mayor a 1mm fue de 96.7% (VPP). Contrario a esto en los casos negativos para PD-L1, la probabilidad de tener un Breslow menor a 4 mm fue de 95% (VPN)

La asociación negativa de VDR y Breslow es significativa solo si se asocia con la edad y se observa como los niveles menores existe una tendencia al aumento de su inmunoexpresión.

Con este estudio se da perspectiva de la asociación del eje PD-1/PD-L1 y se abre paso a nuevas líneas de investigación

Es de importancia en futuros estudios realizar una búsqueda intencionada de la asociación de los ejes Calcitriol/VDR y PD1/PDL-1 con factores epidemiológicos, pronóstico y tratamiento



BIBLIOGRAFÍA.

- (1) Elder D., Massi D., et al. WHO Classification of Skin Tumours. Fourth Edition. WHO. 2017.
- (2) Ali Z., Yousaf N. y Larkin J. Melanoma epidemiology, biology and prognosis EJC Suppl. 2013 Sep; 11(2): 81–91.
- (3) Rastrelli M., Tropea S., Rossi CR. y Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. In Vivo. 2014 Nov-Dec;28(6):1005-11.
- (4) Torres-Cabala C. y Curry J. Genetics of Melanoma. 1ST edition. Houston, USA: Springer; 2016.
- (5) Martínez SH. El primer Consenso Nacional de Expertos en Melanoma. Gac Mex Oncol 2005;4(2):11-13.
- (6) Lino-Silva M. Melanoma in Mexico: Clinicopathologic Features in a Population with Predominance of Acral Lentiginous Subtype. Ann Surg Oncol. 2016 Dec;23(13):4189-4194. Epub 2016 Jul 11.
- (7) Compendio del Registro Histopatológico de las Neoplasias Malignas en México. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología, 2003.
- (8) Erdei E. y Torres S. A new understanding in the epidemiology of melanoma Expert Rev Anticancer Ther. 2010 Nov; 10(11): 1811–1823.
- (9) Martínez SH. El primer Consenso Nacional de Expertos en Melanoma. Gac Mex Oncol 2005;4(2):11-13.
- (10) Schmerlingl R., et al. Cutaneous melanoma in Latin America: the need for more data. Rev Panam Salud Publica. 2011 Nov;30(5):431-8.
- (11) Kaus B. Dermatopathology. Foundations in Diagnostic. 2nd Edition: Elsevier; 2016.
- (12) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. Int J Cancer. 2001;94(2):153–156.
- (13) Bizhan Bandarchi, Linglei Ma, Roya Navab, Arun Seth, and Golnar Rasty, From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma,, Hindawi Publishing Corporation Dermatology Research and Practice Volume 2010, Chapter 6, p 105-115



- (14) Gershenwal J., et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017 Nov;67(6):472-492.
- (15) Balch CM1, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009 Dec 20;27(36):6199-206
- (16) McKee P. McKee's Pathology of the Skin. 4th Edition. Boston, MA, USA: Elsevier; 2011.
- (17) LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasin A. Pathology and Genetics of Skin Tumours, WHO/IARC Classification of Tumours, 3rd Edition, Volume 6, IARC Press: Lyon 2004, 49-118
- (18) Balch CM, Wilkerson JA, Murad TM, Soong SJ, Ingalls AL, Maddox WA. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma. *Cancer.* 1980 Jun 15;45(12):3012-7.
- (19) Bønnelykke-Behrndtz ML., et al. Prognostic stratification of ulcerated melanoma: not only the extent matters. *Am J Clin Pathol.* 2014 Dec;142(6):845-56
- (20) McKee Phillip H., et al, McKee's Pathology of the Skin, 4^a edición. Boston, MA: Elsevier Saunders; 2012, p1232-1235
- (21) Torres-Cabala & Curry Eds, Genetics of Melanoma, 2016
- (22) Bizhan Bandarchi,¹ Linglei Ma,² Roya Navab,¹ Arun Seth,³ and Golnar Rasty⁴, From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma,, Hindawi Publishing Corporation Dermatology Research and Practice Volume 2010, p 119-183
- (23) presentación isa
- (24) Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma Carmen Tellez Menashe Bar-Eli
- (25) Hearing, Vincent J., Leong, Stanley P. L. From Melanocytes to Melanoma The Progression to Malignancy. Volumen 1. 1er edición. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc;2006
- (26) Holick MF. Vitamin D: a millenium perspective. *J Cell Biochem* 2003;88:296–307.

- (27) Plum LA, DeLuca HF. Vitamin D, disease and therapeutic opportunities. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:941–955.
- (28) Miller WL. Genetic disorders of Vitamin D biosynthesis and degradation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016;165:101–108.
- (29) Uhmann A, Niemann H, Lammering B, et al. Calcitriol inhibits hedgehog signaling and induces vitamin d receptor signaling and differentiation in the patched mouse model
- (30) Axanova LS, Chen YQ, McCoy T, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) and PI3K/AKT inhibitors synergistically inhibit growth and induce senescence in prostate cancer cells. *Prostate* 2010;70:1658–1671.
- (31) Uhmann A, Niemann H, Lammering B, et al. Antitumoral effects of calcitriol in basal cell carcinomas involve inhibition of hedgehog signaling and induction of vitamin D receptor signaling and differentiation. *Mol Cancer Ther* 2011;10:2179–2188.
- (32) Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007;7: 684–700.
- (33) Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, et al. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J* 2012;441:61–76.
- (34) Feldman D, Krishnan AV, Swami S, et al. The role of vitamin D in reducing cancer risk and progression. *Nat Rev Cancer* 2014;14:342–357.
- (35) Fleet JC. What have genomic and proteomic approaches told us about vitamin D and cancer? *Nutr Rev* 2007;65:S127–S130.
- (36) Brożyna AA, Jóźwicki W, Skobowiat C, et al. ROR α and ROR γ expression inversely correlates with human melanoma progression. *Oncotarget* 2016;7:63261–63282.
- (37) Garland CF, Garland FC. Do sunlight and vitamin D reduce the likelihood of colon cancer? *Int J Epidemiol* 1980; 9: 227–231.
- (38) Moukayed M, Grant WB. Molecular link between vitamin D and cancer prevention. *Nutrients* 2013; 5: 3993–4021.
- (39) Zinser GM, Sundberg JP, Welsh J. Vitamin D(3) receptor ablation sensitizes skin to chemically induced tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2002; 23: 2103–2109.



- (40) Garland CF1, Garland FC, Gorham ED. Calcium and vitamin D. Their potential roles in colon and breast cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;889:107-19
- (41) Colston K, Colston MJ, Feldman D. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and malignant melanoma: the presence of receptors and inhibition of cell growth in culture. *Endocrinology* 1981;108:1083–1086
- (42) Slominski AT, Brożyna AA., et al. Vitamin D signaling and melanoma: role of vitamin D and its receptors in melanomaprogression and management. *Lab Invest.* 2017 Jun;97(6):706-724
- (43) Orlow I, Reiner AS, Thomas NE, et al. Vitamin D receptor polymorphisms and survival in patients with cutaneous melanoma: a population-based study. *Carcinogenesis* 2016;37:30–38.
- (44) Orlow I, Roy P, Reiner AS, et al. Vitamin D receptor polymorphisms in patients with cutaneous melanoma. *Int J Cancer* 2012;130:405–418.
- (45) Li C, Liu Z, Wang LE, et al. Haplotype and genotypes of the VDR gene and cutaneous melanoma risk in non-Hispanic whites in Texas: a case-control study. *Int J Cancer* 2008;122:2077–2084.
- (46) Li C, Liu Z, Zhang Z, et al. Genetic variants of the vitamin D receptor gene alter risk of cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2007;127: 276–280.
- (47) Brożyna AA, Jozwicki W, Janjetovic Z, et al. Expression of vitamin D receptor decreases during progression of pigmented skin lesions. *Hum Pathol* 2011;42:618–631.
- (48) Brożyna AA, Jozwicki W, Slominski AT. Decreased VDR expression in cutaneous melanomas as marker of tumor progression: new data and analyses. *Anticancer Res* 2014;34:2735–2743.
- (49) Bertone-Johnson ER1, Chen WY, Holick MF, Hollis BW, Colditz GA, Willett WC, Hankinson SE. Plasma 25-hydroxyvitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005 Aug;14(8):1991-7

- (50) Spath L., Olivieri A., et al. Antiproliferative Effects of 1α -OH-vitD3 in Malignant Melanoma: Potential Therapeutic Implications. *Sci Rep.* 2017 Jan 11;7:40370
- (51) Orlow, et al. The interaction between vitamin D receptor polymorphisms and sun exposure around time of diagnosis influences melanoma survival. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2017 Oct 9
- (52) Wyatt C, Lucas RM, Hurst C, Kimlin MG. Vitamin D deficiency at melanoma diagnosis is associated with higher Breslow thickness. *PLoS One.* 2015 May 13;10(5)
- (53) Del Puerto C, Navarrete-Dechent C, Molgó M, Camargo CA Jr, Borzutzky A, González S. Immunohistochemical expression of vitamin D receptor in melanocytic nevi and cutaneous melanoma. A case-control study. *Br J Dermatol.* 2017 Nov 6. doi: 10.1111/bjd.16103
- (54) John P. et al. *Principles of Bone Biology.* Second Edition, Nueva York USA: Academic press; 2002
- (55) Dong H et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002 Aug;8(8):793-800. Epub 2002 Jun 24.
- (56) Vargas-Rojas M. et al. PD-1 y sus ligandos como reguladores de la respuesta inmune. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2008; 21
- (57) Taube JM et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med.* 2012 Mar 28;4(127):127ra37
- (58) Tsai KK, Zarzoso I, Daud AI. PD-1 and PD-L1 antibodies for melanoma. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(11):3111-6. doi: 10.4161/21645515.2014.983409.
- (59) Kleffel S et al. Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell.* 2015 Sep 10;162(6):1242-56. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.052.



- (60) Alessi C et al. PD-1/PD-L1 and VEGF-A/VEGF-C expression in lymph node microenvironment and association with melanoma metastasis and survival. *Melanoma Res.* 2017 Dec;27(6):565-572.
- (61) Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet].
- (62) Giovanni P et al. Vitamin D receptor immunohistochemistry variability in sun-exposed and non-sun-exposed melanomas. *Melanoma Res.* 2017 Feb;27(1):17-23.
- (63) Hino R et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. *Cancer.* 2010 Apr 1;116(7):1757-66.
- (64) Oba J et al. Expression of programmed death receptor ligand 1 in melanoma may indicate tumor progression and poor patient survival. *J Am Acad Dermatol.* 2014 May;70(5):954-6