



INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA

**SERVICIOS DE DERMATOLOGIA Y
PATOLOGIA PEDIATRICAS**



**MELANOMA MALIGNO EN EDAD PEDIATRICA Y NEVOS
MELANOCITICOS CONGENITOS**

**UN ANALISIS DEL CONTENIDO DE DNA Y CICLO CELULAR
CON CITOMETRIA DE FLUJO.**

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA ESPECIALIDAD DE:

DERMATOLOGIA PEDIATRICA

P R E S E N T A :

DRA. NORMA C. JUAREZ HERRERA

ASESORES DE TESIS:

DR. ANTONIO ALVAREZ MENDOZA

DR. RAMON RUIZ MALDONADO

DR. EDUARDO LOPEZ CORELLA

2001

CS @ Marzo 16, 2001

***MELANOMA MALIGNO EN
EDAD PEDIATRICA Y NEVOS
MELANOCITICOS CONGENITOS***

UN ANALISIS DEL CONTENIDO DE DNA Y CICLO CELULAR CON CITOMETRIA DE FLUJO.

Servicios de Dermatología/Patología
Instituto Nacional de Pediatría.

Dra Norma Juárez Herrera.
Dr. Antonio Alvarez Mendoza.

INDICE



MELANOMA MALIGNO EN EDAD PEDIATRICA Y NEVOS MELANOCITICOS CONGENITOS ...	página 1
RESUMENpágina 2
INTRODUCCION. I.Nevos Congenitospágina 4
II.MELANOMApágina 9
III.MATERIAL Y METODO.página 13
IV.RESULTADOSpágina 16
V.DISCUSIONpágina 19
TABLA 1 y TABLA 2.página 22
FIGURA 1.página 23
FIGURA 2.página 24
FIGURA 3.página 25
FIGURA 4.página 26
FIGURA 5.página 27
FOTO 1.página 28
FOTO 2.página 29
FOTO 3. página 30
REFERENCIAS.página 31

RESUMEN

El Melanoma Maligno (MM), aunque es una neoplasia rara en la edad pediátrica, puede presentarse en un nevo congénico melanocítico pre-existente (NMC), Los factores de riesgo potenciales en este fenómeno no son bien conocidos, pero el DNA aneuploide y la anomalía en el ciclo celular de lesiones precursoras puede estar entre estos factores de riesgo como es el incremento en la fase S y G2+M en el ciclo celular.

En el presente trabajo hemos analizado retrospectivamente el contenido del DNA Aneuploide y el ciclo celular por medio de citometría de flujo (CF) en dos grupos De pacientes pediátricos . Se analizaron 28 pacientes con Nevos Melanocíticos Congénitos (NMC) que no desarrollaron MM y 6 pacientes quienes lamentablemente Desarrollaron MM y un segundo grupo de 3 pacientes de los cuales se tomaron cuatro biopsias antes de la presencia del MM y dos biopsias de dos de estos pacientes fueron tomadas después de la aparición de MM.

El resto de NMC no asociados a MM y que exhibieron solo diploidía celular , la fase S fue 11.5% (+/-3.8); y la fase G2 + M fue 2.5% (+/- 2.2). Entre los pacientes que desarrollaron MM, 3/6 tuvieron fase S > 15.5 y G2 + M > 2.3 previo a la presencia de dos de los 6 pacientes tuvieron DNA tetraploide cuando desarrollaron Melanoma

Maligno y murieron con MM diseminado. Ellos presentaron una fase S > 15.5 y

Una fase G2 + M > 2 . 5.

Dos de estos seis pacientes tuvieron un DNA tetraploide con una actividad altamente proliferativa (AP) los cuales estan vivos. Una AP aberrante se encontró en NMC antes de la presencia del MM, lo cual es alto al compararlo con los NMC que no se asociaron a MM.

En este estudio proponemos la evaluación del contenido del DNA y el ciclo celular por CF como un método útil para completar los hallazgos de la biopsia en pacientes con lesiones en riesgo de desarrollo de MM.

Los Nevos Melanocíticos Congénitos (NMC) estan presentes al nacimiento en aproximadamente de 1-2% de los recién nacidos, algunos de estos nevos se hacen aparentes posteriormente en la infancia, el crecimiento en proporción con el cuerpo cambia gradualmente durante la vida del paciente (1,2,3). En edad pediátrica el MM es una neoplasia rara, que ocurre en el 1-3% de todos los tumores malignos (4). Un tercio de los melanomas ocurren en nevos preexistentes, sobre un NMC con un riesgo de 2-42%, el rango de transformación maligna se ha reportado en un 6.3-14% durante la vida (5,4). Los NMC pequeños tienen el 1.1-58% de potencial maligno con un 2.6-4.9% de riesgo de transformación maligna durante la vida, pero el riesgo de malignización parece ser tardío en adultos (7,8). El factor de riesgo potencial para la presencia de MM en un NMC no está bien estudiada, pero el DNA aneuploide y las anomalías del ciclo celular pueden ser uno de los factores de riesgo que necesitan ser profundamente investigados (9,10,11). En este estudio hemos analizado el contenido de DNA y el ciclo celular por medio de la citometría de flujo (CF) en 5 / 6 biopsias en parafina con diagnóstico de

MM en 28 biopsias de pacientes pediátricos con NMC que desarrollaron MM , en cuatro biopsias tomadas de 3 pacientes fueron analizadas antes de la aparición de MM y dos biopsias de dos pacientes fueron hechas después de la aparición del MM.

I N T R O D U C C I O N

Nevos Congenitos

Los nevos melanoacíticos en la piel se presentan del 1% al 2 % de los recién nacidos (5) Casi todos estos nevos congénitos son pequeños. La frecuencia de nevos congénitos gigantes varía de uno en 1 1604 en una serie que comprendió 4641 recién nacidos en Estados Unidos a uno en 20 500 de una serie de 532 831 recién nacidos sudamericanos (17). Aunque hay acuerdo general en que los individuos con nevos congénitos gigantes tienen riesgo aumentado de melanoma (25,26,50,) han persistido las controversias en cuanto al riesgo relacionado con nevos pequeños y medianos (3,25,32,53), Los estudios importantes han encontrado problemas metodológicos, entre ellos estándares diferentes para clasificar nevos utilizados para definir a los nevos como gigantes. (25,26,50).

Los criterios para clasificar a un nevo como gigante han variado entre los estudios. Las definiciones de nevo melanocítico congénito gigante NCMG incluyen lesiones cuyo tamaño basta para que no se puedan extirpar y cerrar de manera primaria en un procedimiento único , (5) aquellas con diámetro de más de 20 cm (45) y las que tienen

diámetro mayor que la palma del individuo si la lesión está en la cabeza o el cuello, o dos veces el tamaño si está en otro sitio del cuerpo (29).

Los NCMG se caracterizan en clínica por color café medio a oscuro, superficie verrugosa o globulada y crecimiento de pelo terminal grueso. (20,33). Los NCMG suelen mostrar nevos satélites periféricos. Conforme crece el niño, a menudo aparecen oscurecimientos de la lesión y aumento de la irregularidad de la superficie.(5). Las más grandes de estas lesiones suelen describirse como parecidas a vestimenta en su distribución anatómica. Las lesiones pueden tener impacto psicológico sustancial sobre el afectado (44). Los NCMG en la piel cabelluda y el cuello pueden relacionarse con melanosis leptomenígea, que en ocasiones da por resultado aparición de hidrocefalia, crisis convulsivas y rara vez, melanoma leptomenígeo. (4,12). A pesar de la rareza relativa del NCMG, casi todas las grandes series de informes de niños con melanoma incluyen pacientes en quienes la enfermedad maligna apareció en una lesión de ese tipo,(6,36.) En 1974 Kaplan informó siete casos de melanoma que surgieron en nevos congénitos grandes y proporcionó una revisión de la literatura que demostró riesgo colectivo promedio de 14%. En 1987, Kaplan y Nickoloff notaron que muchas revisiones clínicas, incluso sus propias investigaciones más tempranas, adolecieron de sesgo de selección para lesiones más grandes y aquellas en las cuales ya había aparecido melanoma, porque es más probable que los enfermos con estas lesiones sean enviados a hospitales especializados. En una revisión de 151 pacientes Daneses con NCMG , Loretzen y col (55), calcularon un riesgo durante toda la vida de 4.7% de melanoma. La edad tardía de inclusión en esta serie, con edad media de ocho años, quizá condujo a subestimación del riesgo al excluir a los individuos en quienes

aparecieron melanoma letal en etapas tempranas de la niñez. En la revisión de la literatura efectuada por Kaplan en 1974 (40), 60% de los melanomas que aparecieron en sujetos con NCMG ocurrió durante el primer decenio de vida. Rhodes y col, (7) utilizaron los datos de Lorentzen y col, recalcularon un riesgo de melanoma de 6.3% durante toda la vida en personas con NCMG (12). Con base en una serie de 39 pacientes vigilados una media de 8.a 64 años. Quaba y Wallace (40) calcularon un riesgo de melanoma de 8.52 % durante los primeros 15 años de vida. Un estudio prospectivo basado en el registro de enfermos con nevos congénitos de más de 20 cm, que empezó en 1979, esclarecerá la magnitud del riesgo de melanoma en estos individuos.

Debido al alto riesgo de degeneración maligna en el transcurso de la niñez, se recomienda la excisión temprana del NCMG. En 1981, Rhodes y col (28) estimaron que el riesgo de muerte causada por anestesia general durante el primer año de vida es mucho menor que el de aparición de melanoma en el transcurso del mismo periodo. Kaplan y Nickolff también recomendaron extirpar el NCMG en etapas tempranas de la lactancia. Por lo general, inician la resección quirúrgica a los tres a seis meses de edad, con intervalos de seis a nueve meses entre los procedimientos si se requieren múltiples operaciones. (45) Debido a la aparición del melanoma dentro del NCMG puede ser no epidérmico (56), se prefiere excisión hasta el nivel del tejido subcutáneo (47), Este objetivo puede quedar comprometido por necesidad en áreas donde la excisión originó función disminuida (49). Se ha informado aparición de melanoma por debajo de un injerto cutáneo en un sitio en el cual se había extirpado un nevo congénito gigante hasta la cara superficial del tejido celular subcutáneo (11). Las decisiones respecto a excisión del NCMG son complejas; exigen valorar las

consideraciones estéticas, psicosociales y funcionales, así como el riesgo de degeneración maligna (35).

Los nevos melanocíticos congénitos pequeños (NMCP) se observan mucho más a menudo que los gigantes,(4) y tienen , en consecuencia, considerablemente mayor importancia epidemiológica si representan precursores de melanoma. Sin embargo , aún hay controversia en cuanto el riesgo vinculado con los NCMP. Rhodes y col (8,9) encontraron que había datos histológicos de nevos congénitos en 8.1% de 234 biopsias de melanoma. Rhodes y Melski (9) calcularon el riesgo relativo relacionado con NMCG al comparar la frecuencia de este último en el sitio del melanoma diagnosticado posteriormente con la aparición estadística de nevos melanocíticos, confirmados mediante estudio histológico, en recién nacidos,. En sujetos con NCMP se estimó de 21 veces el riesgo de melanoma cuando se estableció por medio de los antecedentes del enfermo la presencia de nevo congénito en el sitio del melanoma. El NCMP se relacionó con aumento de tres a 10 veces el riesgo de melanoma cuando se determinó histológicamente la presencia de NCMP en el sitio de aparición de un melanoma(14). La interpretación de esos datos se complican por la falta de criterios histológicos específicos para la identificación de NCMP y falta de confiabilidad del interrogatorio respecto a la naturaleza congénita de las lesiones (25) No se ha abordado de modo exhaustivo el riesgo de melanoma vinculado con nevos melanocíticos de tamaño mediano .

Algunos investigadores recomiendan extirpar todos los nevos congénitos, al citar el riesgo de degeneración maligna y el riesgo bajo relacionado con la excisión de lesiones pequeñas bajo anestesia local, (3,13,36) Otros han estado en contra de la extirpación sistemática del NMCP, al notar datos insuficientes de aumento del riesgo de melanoma (25,29) y lo poco práctico dedicar miles de horas al año en extirpar lesiones frecuentes. En una conferencia de consenso efectuada en 1994 se concluyó que no había datos suficientes para recomendar excisión sistemática a todos los nevos congénitos. Elder (11) sugirió que la observación es una alternativa razonable para la excisión y que es posible ofrecer esta opción a los pacientes. Pero, notó que la vigilancia de por vida de los NCMP es más costosa que la extirpación durante la primera visita.

Entre los autores que recomiendan excisión profiláctica del NCMP, en general, se acepta que o es necesario efectuar intervención quirúrgica en etapas tempranas de la niñez (33;14). Illig y col (30) notaron que en contraste con el NCMG, el riesgo de melanoma vinculado con el NCMP ocurre de manera primaria luego de la pubertad. Rhodes y Melski (28) afirman que si la vigilancia es adecuada y la lesión no muestra datos sospechosos de aparición de melanoma o datos que podrían dificultar la detección de este último, la excisión puede retrasarse hasta que el niño tenga edad suficiente para cooperar con una intervención efectuada bajo anestesia local.

Si bien la aparición de melanoma en el NCMP por lo general es de origen epidérmico y por ende relativamente fácil de detectar en el examen, se ha informado melanoma maligno que aparece a partir del componente dérmico de un NCMP en ausencia de cambio detectable de pigmentación de la superficie. (30).

MELANOMA.

El melanoma es más frecuente en adultos, pero también ocurre en niños, al rededor de 2% de los melanomas aparecen en sujetos de menos de 20 años de edad (6). La incidencia de esta alteración muestra aumento uniforme con la edad y ocurre siete veces más a menudo en el transcurso del segundo decenio de vida que en el primero (6,7). En un estudio efectuado en Estados Unidos, se estimó que la incidencia anual de melanoma era de 0.8 casos por millón durante el primer decenio de vida y de 6.3 casos por millón en el transcurso del segundo. En un estudio reciente se notó incidencia de 0.6 melanomas por 100 000 niños alemanes de menos de 15 años de edad entre 1981 y 1983.

Aunque es posible que el melanoma ocurra en niños existen enfermedades predisponentes conocidas, (9) se puede identificar a los que están bajo mayor riesgo (24). Como se comentó, entre estos niños se incluyen aquellos con nevos congénitos gigantes y síndrome de nevo displásico. El xeroderma pigmentoso, trastorno hereditario raro caracterizado por defectos en la reparación de daño al DNA inducido por luz ultravioleta (24,46), también se relaciona con aparición de melanoma durante la niñez. (7). Los rasgos pigmentarios como piel clara y tendencia a quemaduras por luz solar son factores de riesgo para melanoma en adultos (35,41), si bien se desconoce su contribución a la aparición de melanoma durante la niñez.

La exposición a la luz solar ha quedado comprendida como factor causal de melanoma (31,47). Se ha demostrado que en particular la exposición en la niñez y el segundo decenio de vida, se relacionan con la aparición de melanoma en adultos. Aunque se desconoce la contribución de esta exposición a la aparición de melanoma en el curso

de la niñez, el fuerte vínculo entre exposición de luz solar durante la juventud con melanoma en adultos subraya la necesidad de inicio temprano de la evitación de la exposición al sol.

Los niños con inmunodeficiencia también tienen riesgo aumentado de melanoma. La prueba de la participación prominente del sistema inmunitario en los aspectos biológicos del melanoma incluyen regresión espontánea ocasional de melanoma metastásico, periodos prolongados entre la excisión de un melanoma primario y la aparición de metástasis y la eficacia de la inmunoterapia en algunos pacientes. (15), se informó aumento del riesgo de melanoma en adultos con enfermedad de Hodgkin, (46) en receptores de trasplante renal y en niños con síndromes de inmunodeficiencia genética. En un niño de 12 años de edad después de trasplante renal y tratamiento inmunosupresor (9), así como ante infección por virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y tanto se informó aparición eruptiva repentina de abundantes nevos displásicos (30). En un niño de 10 años de edad se señaló un vínculo entre infección por HIV y tanto nevos displásicos eruptivos como cambios en el nevo congénito grande (30).

Sí bien es raro, el melanoma puede presentarse en el momento del nacimiento (7,55,29,41,42).

En varios enfermos el melanoma apareció durante el periodo prenatal en un nevo melanocítico gigante (29,51,52). Se han informado metástasis prenatales extensas, (57) incluso melanoma fetal hacia la placenta (29). Aun cuando este fenómeno es muy raro, también se han señalado metástasis transplacentarias de melanoma de madre a feto

(14,18,29,59). En otros casos, han ocurrido metástasis de melanoma materno hacia la placenta sin afección manifiesta del feto. (37,2,11).

Al igual que en adultos, el pronóstico del melanoma en niños depende del nivel y la profundidad de invasión de la neoplasia. (57,8). Skov-Jensen y colaboradores revisaron la literatura sobre melanoma en niños y calcularon que la supervivencia a tres años en niños con metástasis hacia ganglios linfáticos regionales se acercó a la supervivencia a cinco años esperada en adultos. Propusieron que el pronóstico más ominoso dependió del retraso del diagnóstico de melanoma en niños. (31) Otros informaron supervivencia a cinco años de 33 a 34% en niños con melanoma metastásico. (81,44) En serie de 25 enfermos de menos de 20 años de edad, en 60% hubo retraso del diagnóstico, que varió de algunos meses a cinco años, más a menudo como resultado del fracaso del médico para reconocer la naturaleza maligna de la lesión.

Los datos clínicos e histopatológicos del melanoma en niños son similares a los que ocurren en adultos. Al igual que en adultos, cualquier cambio dentro de una lesión pigmentada es motivo de preocupación. Los datos clínicos sugestivos de melanoma incluyen aumento del tamaño de un nevo melanocítico, color jaspeado, asimetría y superficie irregular. Los melanomas avanzados a veces muestran ulceración, hemorragia y lesiones satélites. (57). En orden de frecuencia decreciente, las molestias iniciales observadas en niños de menos de 12 años de edad con melanoma son aumento del tamaño, hemorragia o cambio de color de un nevo, masa subcutánea, prurito de la lesión afectada y linfadenopatía. (12). En adolescentes, se encontró que los signos y síntomas de presentación que suelen observarse incluyen cambio de tamaño 55% o de color 23% de un nevo, así como hemorragia 35% o prurito 15% de la lesión. Otras manifestaciones en el momento de la presentación incluyeron linfadenopatía en 7% de los afectados, masa subcutánea en 6% y dolor en 4%. En caso de melanomas

leptomeningeos, los datos de presentación frecuentes son síntomas del sistema nervioso central como cefalea y ataxia (12).

El tratamiento del melanoma en niños se basa en la experiencia con la enfermedad en adultos y es principalmente quirúrgico. A menos que esté contraindicado por el tamaño de la lesión o su localización, debe practicarse biopsia excisional con márgenes estrechos. El área puede recindirse después del diagnóstico de melanoma: lo amplio del margen se basará en el espesor de la lesión (58). Salvo que haya enfermedad metastásica extensa, es indispensable reseca los ganglios linfáticos regionales sospechosos en clínica.(59). Aun hay controversia respecto a la disección electiva de ganglios linfáticos regionales en ausencia de afección clínica de los mismos, pero es más probable que resulte benéfica en melanomas de 1.5 a 4.0 mm de espesor. (57).

Actualmente se está usando la técnica de mapeo ganglionar o del ganglio centinela para hacer una selección de el ganglio o los ganglios que se deban extirpar quirúrgicamente. El quimioterapéutico único más eficaz para empleo en melanoma metastásico es la DTIC (dimetil triazeno imidazol carboxamida). Sin embargo, las tasas de respuesta son más bien bajas y las reacciones por lo general son parciales y de corta duración (58).

Al igual que en adultos, la quimioterapia se relaciona en su mayor parte con respuesta inadecuada en niños (9). Se informó supervivencia prolongada tras quimioterapia con ciclofosfamida, vincristina y dactinomicina en niños con enfermedad metastásica. (57).

En adultos con melanoma, no se ha demostrado que sea eficaz la quimioterapia coadyuvante para evitar diseminación cuando no hay metástasis conocidas. (58).

Tampoco se ha demostrado que la inmunoterapia con bacilo de Calmette-Guerin sea eficaz en sujetos con melanoma extenso. (15,58). Están bajo investigación varias otras formas de inmunoterapia, entre ellas el uso de interferones, y de estos la terapia recombinante con interferon alfa fracción 2B (38,20), vacunas contra melanoma (15), anticuerpos monoclonales (29) y linfocitos infiltrantes de neoplasias.

Los nevos melanocíticos congénitos, gigantes y pequeños indican riesgo aumentado del melanoma maligno. Con todo esto en algunos enfermos es posible identificar riesgo aumentado de melanoma durante la niñez. El pronóstico ominoso vinculado con melanoma avanzado y la curabilidad de lesiones tempranas subrayan la importancia de la identificación expedita de melanoma cuando ocurre en niños, los médicos que atendemos niños estamos en una posición clave para disminuir el riesgo de melanoma durante todo el lapso de vida, debido a que los factores potenciales de riesgo para melanoma y nevos congénitos melanocíticos no son bien conocidos, pero la aneuploidia del DNA y la anormalidad del ciclo celular pueden ser factores importantes que deben ser bien dilucidados (9,10,11). En el presente estudio hemos estudiado el contenido del DNA y el ciclo celular por medio de citometría de flujo (CF) en 4-5 casos de melanoma en niños, mismo análisis que se efectuó en 4 nevos extraídos quirúrgicamente de tres pacientes previamente a la transformación a melanoma maligno de 2 casos. Estos fueron comparados con otros casos de nevos congénitos melanocíticos que no presentaron asociación a melanoma maligno.

MATERIAL Y METODO:

Se analizaron los expedientes del Servicio de Dermatología del Instituto Nacional de Pediatría, en la ciudad de México de 1971 a 1999, con los diagnósticos de Melanoma Maligno. El material estudiado se conservó en parafina y fueron 34 pacientes. Se formaron 2 grupos, el primero compuesto por 28 casos con diagnóstico de NMC (16 gigantes, 8 medianos y 4 pequeños). Con seguimiento negativo para MM, los grupos se formaron por 12 hombres y 16 mujeres con un rango de edades entre 6 meses y 13 años de edad (Tabla 1). El segundo grupo se formó por 6 casos con diagnóstico de NMC / MM 5/6

obtuvieron las biopsias de 5/6 de ellos cuyas biopsias fueron fijadas en formaldehido y se conservan en bloques de parafina. Las laminillas de estos casos fueron revisados por el Dr Antonio Alvarez (tutor de ésta tesis) y la Dra. Norma Juárez H (autora de la tesis), y tres casos se consultaron con el Dr. Martin C. Mihn Jr. (Dermatopathology Massachusetts General Hospital, Boston MA): pacientes (1,2,3) . los cuales tenían diagnóstico de NMC gigante antes de la aparición del MM. (Tabla 2).

Los pacientes 1 y 2 desarrollaron un MM diseminado y que rápidamente lo llevó a la muerte. El paciente 3 presentaba una imagen sugestiva de MM y hasta el momento vive. El paciente 4 tenía una lesión pigmentada sobre la nariz con el diagnóstico inicial de NMC con MM superficial. El paciente 5 se presentó a consulta posterior a la resección de MM en la región parotídea derecha. El análisis de la exsición de los margenes fue realizada en nuestro Hospital. El paciente 6 presentó una lesión oscura uniforme con posterior decoloración progresiva de la uña del primer orjejo derecho. Con el diagnóstico de MM acral lentiginoso in situ se efectuo amputación.

Como controles se obtuvieron 30 biopsias con el diagnóstico de NMC, (17 grandes, 9 medianos y 4 pequeños), obtenido de los archivos del Servicio de Patología del mismo hospital. Estos pacientes tuvieron un seguimiento y sin que se presentara MM.

Todos los cortes fueron revisados por dos de los autores (AAM y NJH) y se seleccionó un corte representativo con el correspondiente bloque de parafina seleccionado en cada caso. El contenido de DNA y el análisis del ciclo celular: La extracción nuclear fue obtenida del tejido fijado en parafina de acuerdo a la técnica modificada de Hedley (12,13). Se cortaron de 3 a 50 secciones de los bloques de parafina en el microtomo, dichos cortes fueron desparafinados en 3 baños de xylene por 10 minutos cada uno. Posteriormente fueron rehidratados en baños de alcohol al 100% dos veces, y uno al 95%, 70%, 50% repectivamente.

Enjuagados en agua corriente por 10 minutos después de cada baño y dejados en agua deionizada toda la noche. Los fragmentos fueron disgregados con agujas hipodérmicas y hojas de bisturí, fueron incubados en 1 ml. de 0.5% de pepsina (sigma Chemical Co. St Louis . MO, activity 3470 unidades /mg proteína) en 0.9% de Na Cl a un pH 1.5 por 30 minutos a 37°C previamente se pasó la muestra por el vortex. La suspensión del tejido fue filtrado a través de telas de nylon de 44 micrones. Se agregó 2ml de solución PBS y la suspensión se centrifugó a 400g por 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y el botón nuclear se tiñó con la técnica de Mendez Herrera et al. (14). Posteriormente el botón nuclear fue incubado con trypsin (30 ug/ml) por 10 minutos a temperatura ambiente. Inmediatamente después se agregó un inhibidor de la trypsin de soya (227 ug/ml) y ribonucleasa (55 ug/ml) e incubados por 10 minutos más a temperatura ambiente. Finalmente se agregó Ioduro de propidio (150 ug/ml) a la preparación nuclear e incubado a 4°C por 45 minutos en la oscuridad. Se analizaron por lo menos 20 000 eventos del material nuclear; esto le llevó a cabo en un citómetro de flujo FAC sort ajustado con un laser de argón que emite una luz de 488 nm. Se obtuvieron histogramas con áreas por debajo de la curva de F12 (F12-A). Los datos obtenidos fueron analizados en software usando un modelo matemático polinomial o RFIT (Becton-Dickinson). Como controles externos estándares se usaron núcleos de eritrocitos de pollo y de timo de carnero. Como un control se usaron las muestras de tejido de los NMC. Como control diploide se usaron muestras de piel normal. La actividad de proliferación (PA) fue calculada como fracción fase -S + fracción fase G2/m. El estatus de la ploidía del tumor se basó en la cantidad de DNA relativa a la normal. El índice de DNA (I D) es un valor dado para expresar la cantidad de DNA contenida relativamente en una muestra normal.

Canal No. de DNA aneuploide , pico G0G1

DI=-----

Canal No. de DNA NMC , pico G0G1

Un tumor con DNA tetraploide es definido como $DI > 1.90 < 2.10$ y por lo menos 15-20% del total de evento colectados en NMC pico G0G1. La estadística obtenida entre los resultados de la Ciatometría de Flujo fueron analizados por medio de la prueba de “ T” de Student’s

RESULTADOS.

La tabla 1 muestra el análisis del contenido del DNA y el análisis del ciclo celular en 28 casos con NMC con un seguimiento negativo para MM. Es evidente que hay un rango amplio de valores en fase S (15.5 a 20.9) , y también en la fase G2 + M (0.2 a 11.5). Cinco pacientes tuvieron fase S > 15.5 (medio –s.d.) .sin embargo la fase S fue menor que 15.5. Tres pacientes presentaron dos gráficas fase S y G2 + M mayor a la media . Es importante notar que todos los pacientes incluidos en este grupo tenían un DNA diploide.

La tabla 2 muestra el análisis clínico e histopatológico. El resultado del DNA y sus variaciones en el ciclo celular de pacientes con diagnóstico de MM asociado a NCM se muestra también. Paciente no 1 presentó un NMC (17x17cm) localizado en el tronco y muslos , cuando la paciente tenía 12 días de nacida, el diagnóstico histológico fue benigno (figura 1a). El análisis del DNA y el ciclo celular reveló un DNA con patrón diploide con una fase S alta que fue detectada en la primer biopsia (15,8), pero la fase G2 + M fue 3 veces aún mayor (5,9) . Esta paciente falleció a los 2 meses de edad y el análisis histopatológico mostró un MM fusocelular. (Figura 1b) El análisis del contenido

de DNA y el ciclo celular de su melanoma mostraba DNA tetraploide patrón con una fase S similar a la segunda biopsia (16%), pero la fase G2 + M fue 2.2 veces más alta que en la primera biopsia. El paciente No 2 presentaba un NMC muy similar al paciente No 1. Cuando la paciente tenía 2 meses de edad la primera biopsia mostraba un NMC con patrón del DNA diploide (Figura 2a), sin embargo el análisis del ciclo celular reveló una fase S muy alta (36.1) y la fase G2-M fue de 0.5 (tabla 2). Esta paciente falleció a los 2 años de edad. El análisis de el melanoma reveló una lesión con 2 poblaciones celulares. Una lesión mostraba un patrón de DNA diploide y una fase S similar a su primer biopsia. Sin embargo la fase G2 + M sufrió un importante incremento del doble (100) comparado con el NMC. En otra población celular el patrón del DNA fue tetraploide con los hallazgos similares a la paciente no 1 (Figura 2b). El análisis del ciclo celular mostró una fase S con un valor mayor que el de la población diploide y una fase G2 + M mostrando un importante incremento (el doble de 64) comparado con la primera biopsia (Tabla 2 y Figura 2c). Es interesante notar que la paciente no 1 y no 2 el análisis de la citometría de flujo de las biopsias antes de aparecer el MM mostraban un contenido de DNA diploide con una fase S entre 15.5 a 36.1% y una fase G2 + M entre 0.5 a 5%. Por lo cual ambas tanto la fase S y G2 + M fueron mayores que la media encontrada en pacientes con NMC solo. Tanto el paciente No 1 como el No 2 cuando desarrollaron MM, su contenido de DNA mostraba patrón tetraploide.

Paciente No 3 femenina de un año de edad con un NMC gigante en la espalda, pecho, abdomen, muslos, biopsiado en todas sus áreas. Nueve años más tarde se efectuó una biopsia excisional en un nódulo que apareció sobre el NMC, el cual fue reportado como NMC, DNA con patrón diploide (Figura 3a), el análisis del ciclo celular mostró una fase S de 18.5 y una fase G2 + M de 6.5%.

Tres años más tarde apareció otra lesión nodular que mostraba pleomorfismo, y fue diagnosticada como MM de baja malignidad con una AP de 34.5 (fig 3a,b). Se hizo un

seguimiento de la lesión nodular, haciéndose biopsias a los 15, 16 y 18 años de edad mostrando diagnóstico de NMC. Por CF todos los nódulos presentaron mínima desviación a MM en la CF una AP de 34.5 (fig 3a,b). Se hizo un seguimiento de los pacientes con biopsias sospechosas de las lesiones nodulares hechas a los 15, 16 y 18 años de edad mostrando diagnóstico de NMC. Por CF todos estos nodulos mostraron diploidía con AP de 20.1-25.8-17.8 respectivamente (tabla 2).

Paciente No 4 masculino de 12 años de edad con una lesión en el ala nasal y parte en la punta ,pigmentada de 2 x 1.5cm . Se efectuó una biopsia excisional reportada como NCM con MM asociado. Por la CF se observo el contenido de DNA diplóide con AP de 55.1 fase S de 35% y G2 + M de 6.9% (fig 4b), el diagnóstico de MM fue cuestionado y el diagnóstico final fue de "Nevo de Reed" el paciente aún vive y en buen estado desde 1988.

Paciente No 5 , paciente femenina de 6 años de edad con una lesión pigmentada nodular en cara a nivel de región parotídea derecha. Fue operado en otro centro hospitalario y las laminillas fueron revisadas por nosotros se hizo el diagnóstico de MM nodular, sin embargo los bloques de parafina no se obtuvieron para su revisión. Los margenes fueron nuevamente resecaados y no mostraban MM residual, por la CF el AP fue de 16.9. El paciente No 6 de 3 años de edad con una lesión oscura con decoloración progresiva de la parte proximal de la uña de el segundo orjejo derecho. La lesión tenía dos años de evolución , el tercio distal de el orjejo se amputó con amplio margen. La histología reportó MM acral-lentiginoso in -situ (fig. 5a) y por CF se identificó una AP de 20 y G2 + M (5b).

Las cuatro bopsias tomadas de los tres pacientes antes del diagnóstico de MM mostró en la CF diploidía del contenido de DNA con un PA promedio de 34.8, mientras que las 30 biopsias de los NMC tuvieron una AP promedio de 19.9 que no fue mucho mayor que la AP de 17..5 encontrada en la piel normal.

DISCUSIÓN.

La citometría de flujo es un método de análisis preciso para detectar cambios en el DNA. Esta clase de análisis han sido reconocidas como un indicador potencial de pronóstico independiente de enfermedad maligna.. En el presente estudio hemos usado el análisis de la CF para conocer la ploidía celular y las variaciones en el ciclo celular de las biopsias conservadas en parafina en dos grupos de pacientes.

En 28 pacientes con NMC sin historia de MM y en 6 pacientes con MM. En el primer grupo (tabla 1) encontramos una fase S de 11.5% (+/- 4.0), es por eso que asignamos un punto de 15.5% como punto clave para la fase S normal. En la misma línea la fase G2 + M de 2.5% (+/- 2.2 %) , así que el valor asignado de 4.7% como punto clave. En este grupo 4 pacientes tuvieron una fase S >15.5 y otros 4 pacientes tuvieron G2 + M mayor o igual a 4.7%. Pero ningún paciente tuvo ambas fases S y fase G2 + M , fase más alta que el punto de ruptura. , todos los pacientes solo mostraron un DNA diploide, aun cuando un contenido de DNA diploide no se contrapone a la transformación maligna. De hecho la diploidía en el MM ha sido reportado en 57% en grandes series (16,17,18), Sin embargo la diploidía en al MM tiene un comportamiento menos agresivo sin mostrar evidencia de recurrencias o metastásis (19). También existe la tendencia de una sobrevida mayor en pacientes con contenido de DNA diploide con una fracción fase-S de < 10% (20). Por otro lado la aneuploidía en el MM con línea celular tetraploide y una fase S alta ha provado estar correlacionado con un pronóstico pobre (16,21) Nuestros dos casos tetraploides confirman esta observación desde que dos pacientes con MM diseminado llegaron a la muerte. Hay una evidencia substancial que indica el incremento de riesgo para el desarrollo de MM en paciaentes con NMC gigantes (22,23,24,25) aun que el alto riesgo ha sido documentado en NMC gigantes en una localización axial (26)

como fue el caso de nuestros dos pacientes. Es por esto que se debe mantener una mayor vigilancia en niños que presenten estos factores de riesgo para el desarrollo de MM.

Hay estudios que han mosstrado que variaciones en la fase S, fase G2 + M y el DNA aneuploide son parámetros independientes de significado pronóstico en el MM (15). Los resultados en el segundo grupo de pacientes (Tabla 2) confirman lo anterior, dos de los 3 paciantes con MM tuvieron por lo menos 2 parametros más altos que el punto de ruptura. Uno de los 3 pacientes tuvieron una fase S el doble de alto que la normal, aun cuando la fase G2+ M exhibe una fase S más alta de los normal ($p= 0.002$) y G2 + M una fase más alta que el punto de ruptura, del NMC solo ($p= 0.058$) Dos pacientes tenían tetraploidía y murieron pronto debido a la diseminación del MM.

La ploidia es aun un marcador que refleja los cambios moleculares que pueden determinar biológicamente la agresividad de un tumor en particular . La presencia del DNA aneuploide ha sido desmostrada como un parámetro de significancia pronóstica en MM (15). Aun cuando el contenido del DNA diploide no significa que en algún momento se presente una transformación maligna.

Por el otro lado el MM aneuploide con células tetraplides con fase-S aumentada ha provado correlacionarse con un pronóstico pobre (16,21). Nuestros dos casos tetraploides confirman esta observación ya que dos pacientes murieron en corto plazo con un MM diseminado.

Hay una evidencia sustancial que indica el incremento del riesgo para desarrollar MM en pacientes con NMC gigantes (22,23,24,25) y aun el riesgo aumentado ha sido documentado en NMC gigantes en localilzación axial (26) como es el caso de dos de nuestros pacientes. Es por esto que se necesita evaluar todos los NMC, y sí es posible, la excisión quirúrgica en vida. (27).

La evaluación del contenido de DNA y el ciclo celular se ha observado como un parametro lógico para valorar las lesiones precursoras así como las congénitas (9) o

adquiridas como lo es el nevo de Clark en pacientes no pediátricos (28). Sin embargo no ha habido estudios suficientes para confirmar si el ciclo celular anormal es un factor de riesgo para el MM en NMC (9,10,11). Tampoco existen hallazgos histológicos claros que puedan predecir una posible progresión a MM.

Es por eso que la CF aunque no es un método lo suficientemente sensible para detectar pequeños focos atípicos en una gran población celular, los pacientes podrían tener un beneficio adicional y complementar la evaluación de las biopsias en un NMC ya sea con la CF o con la imagen citométrica. Nuestro estudio muestra que en los pacientes con NMC que subsecuentemente desarrollan MM, la medida de la fase-S así como AP a aumentado significativamente. Esta información podría ser usada como una llamada de atención de lesiones pigmentadas activas o potencialmente de transformación maligna, ya que no existen lesiones benignas con DNA aneuploide, aun cuando lo opuesto es verdad, muchos tumores malignos incluyendo el MM son diploides (16). Por ello, las anomalías del ciclo celular pueden ser una llamada de atención más sensible pero no específica. También es interesante hacer notar que entre los 28 casos de NMC con seguimiento negativo para MM, no existieron anomalías en el ciclo celular. Aún no encontramos correlación entre la apariencia del nevo y el nivel de la fase-S, por lo que pensamos que la CF bien desarrollada puede darnos información más sutil en relación con las diferentes opiniones reportadas en la literatura (10,11).

Como consecuencia a este estudio, hemos desarrollado la política de toma de biopsias seriadas en los pacientes con NMC, pero antes de la fijación se obtiene un fragmento el cual se digiere en pepsina y se le efectúa la disgregación mecánica de tal modo que se obtenga una suspensión de núcleos para ser analizada por CF con la idea de complementar los hallazgos reportados por el estudio histológico.

Table 1. Patients with CMN and negative follow-up for Melanoma

Case	Sex	Age	CMN	G ₀ G ₁	S-phase	G ₂ +M	G ₂ /G ₁	C.V.	P.A.	Ploidy
1	F	3 Yr.	Large	88.1	11.7	0.2	2.10	7.36	11.9	Diploidy
2	M	2 Yr.		86.1	12.5	1.4	2.00	7.11	13.9	Diploidy
3	F	13 Yr.		77.1	20.9	2	2.00	9.02	22.9	Diploidy
4	M	17 Yr.		88.9	6.1	5	2.00	7.85	11.1	Diploidy
5	F	12 Yr.		89.5	7.3	3.2	1.96	10.1	10.5	Diploidy
6	F	15 Yr.		89.5	7.3	3.2	1.96	10.01	10.5	Diploidy
7	F	6 Yr.		88.6	10.4	1	2.00	7.81	11.4	Diploidy
8	M	1 Yr.		87.2	10.5	2.3	2.05	8.51	12.8	Diploidy
9	F	10 Yr.		81.1	17.5	1.3	2.45	8.06	18.8	Diploidy
10	M	5 Yr.		83.2	14.9	1.9	2.12	9.04	16.8	Diploidy
11	M	2 Yr.		78.6	9.9	11.5	2.00	7.78	21.4	Diploidy
12	M	4 Yr.		80.6	16.6	2.9	2.00	6.70	19.5	Diploidy
13	M	6 Mos.		83.6	14.1	2.3	2.24	7.51	16.4	Diploidy
14	F	3 Yr.		83.5	13.6	2.8	1.96	4.78	16.4	Diploidy
15	F	2 Yr.		82.6	16.7	0.6	2.00	4.20	17.3	Diploidy
16	M	3 Yr.		87.6	9.2	3.3	1.91	8.08	12.5	Diploidy
17	M	2 Yr.		86.8	12.8	0.4	2.00	6.46	13.2	Diploidy
18	M	11 Yr.		84.2	14.7	14.7	2.00	9.41	15.8	Diploidy
19	F	8 Yr.		92.1	5.1	2.9	2.00	9.24	8.00	Diploidy
20	F	7 Yr.		86.1	12.2	1.7	2.00	8.33	13.9	Diploidy
21	F	3 Yr.		88.0	11.7	0.3	1.70	6.13	12.0	Diploidy
22	M	2 Yr.		92.8	5.4	1.9	2.93	7.20	7.30	Diploidy
23	F	4 Yr.		89.0	6.9	4.2	1.96	6.46	11.1	Diploidy
24	M	3 Yr.		89.0	6.9	4.2	1.96	6.46	11.12	Diploidy
25	F	14 Yr.		88.9	8.7	2.4	2.14	8.71	11.1	Diploidy
26	F	13 Yr.		85.2	11.5	3.2	1.80	10.0	14.7	Diploidy
27	F	13 Yr.		83.5	11.8	4.7	2.00	8.50	16.5	Diploidy
28	F	4 Yr.		83.7	16.1	0.3	1.99	2.97	16.4	Diploidy
Mean				85.896	11.536	2.58	2.045	7.6354	14.115	
s.d.				3.831	4.0262	2.210	0.2162	1.7225	3.807	

TABLA.:2.

Paciente	SEXO	EDAD	Sitio de Biopsia	DX	Ploidia	ID	PA	Seguimiento
1	F	12 DIAS	Muslo d	NMCG	Diploide	1	13	falleció
		26DIAS	Pierna iz	NMCG	Diploide	1	37	
		2meses	Ingle iz	MM	Tetraplo	2		
2	F	2 meses	TORAX	NMCG	Diploide	1	65	falleció
		2 años	TORAX	MM	Tetraplo	2		
3	F	1año	Espalda	NMCG	Nd			viva
		10años	Espalda	NMCG	Diplide	1	25	
		13años	Espalda	MMmd	Diploide	1	35	
		15años	Tronco	NMCG	Diploide	1	20	
		16años	abdomen	NMCG	Diploide	1	26	
18años	Gluteo	NMCG	Diploide	1	18			
4	M	12años	Nariz	NMC/M M	Diploide	1	55	viva
5	F	6años	Cara/reg	MM	Nd	Nd	Nd	viva
			Parotida	Margen	Diploide	1	17	
6	M	6años	Uña de 1er ortejo der	MM Margen	No hecho Diploide	Nh 1	Nh 17	viva

NMCG:Nevo melanocítico congenito gigante.

AP: Calculado como Fase- S fracción+G2/M .

mdMM:Melanoma de desviación mínima.

NMC/sMM: Nevo melanocítico congenito con melanoma maligno superficial

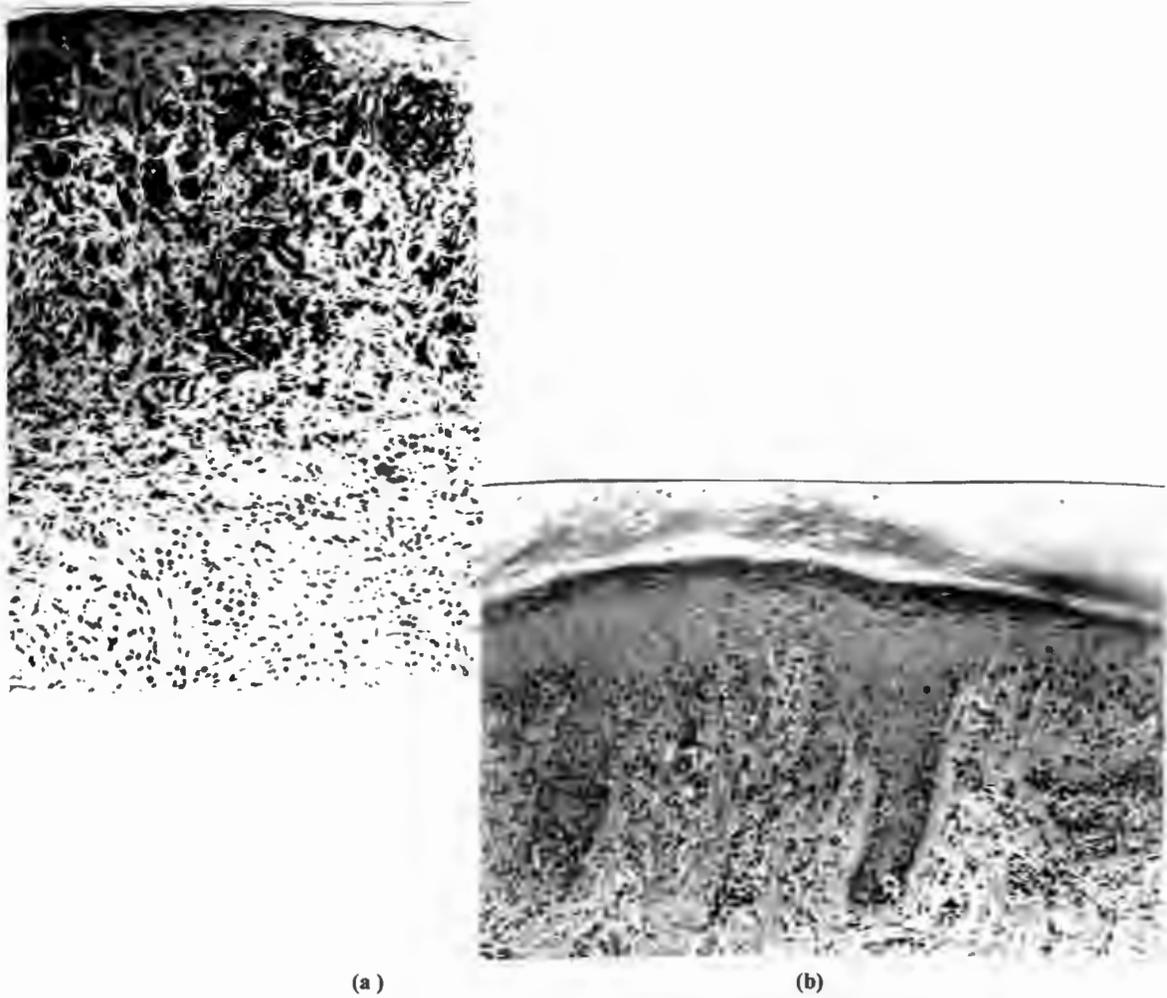
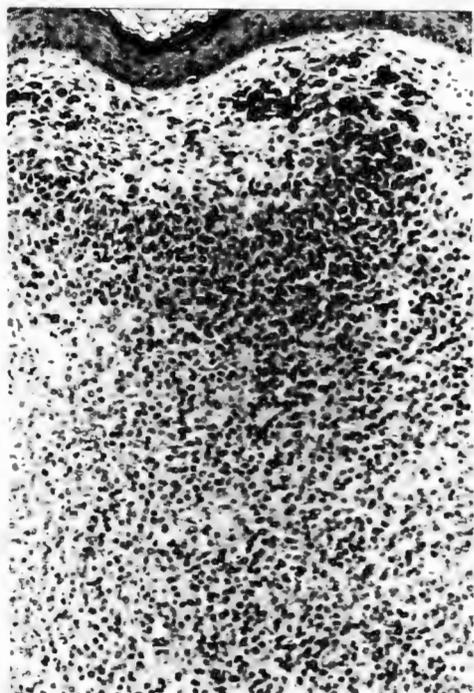
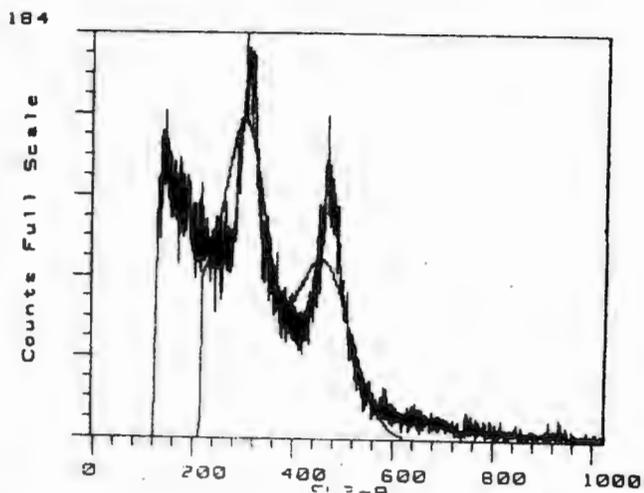


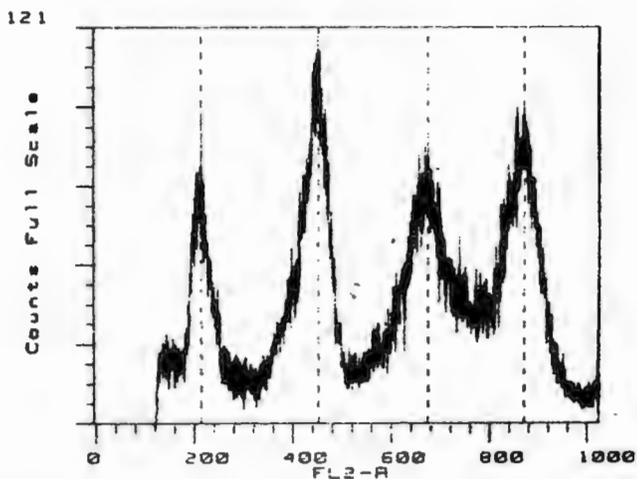
Figura 1. NMC mostrando actividad de unión y maduración a través de la dermis (a).
MM pigmentado un mes después de la biopsia anterior (b).



(a)

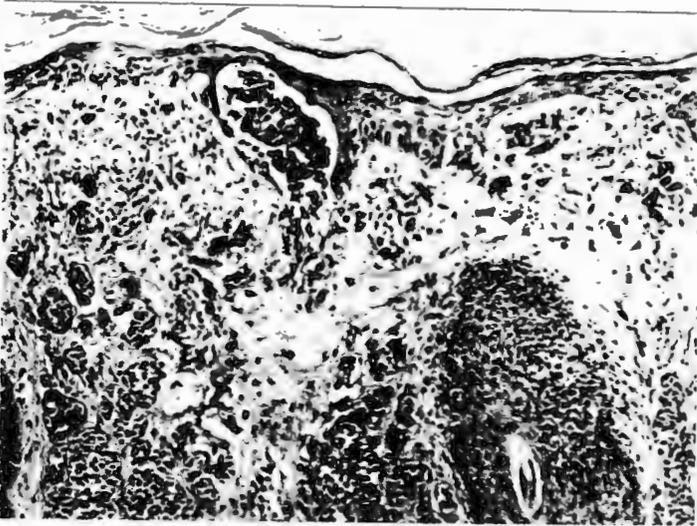


(b)



(c)

Figura 2. NCG intradérmico con un patrón celular homogéneo (a). El histograma correspondiente muestra un pico prominente en G2+M y una fase "S" elevada (b). El histograma de el MM metastásico en los gánglios linfáticos muestra un contenido tetraploide del DNA.



42

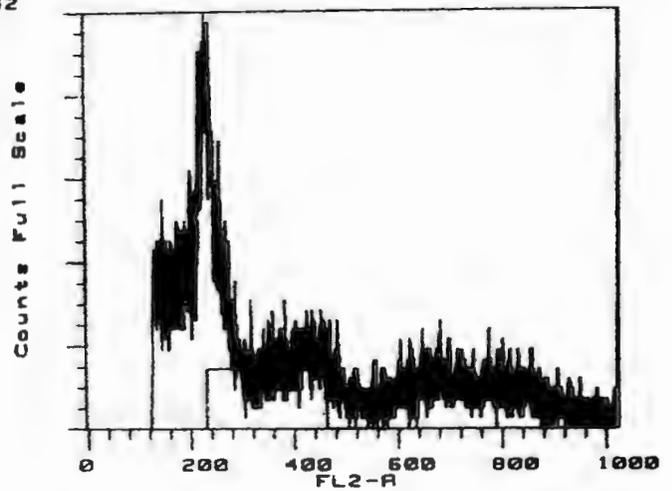


Figura 3. Imagen histológica de un nódulo bien circunscrito de un NMC. El histograma correspondiente muestra un contenido diploide del DNA con una fase "S" elevada y un pico en G2+M (b).

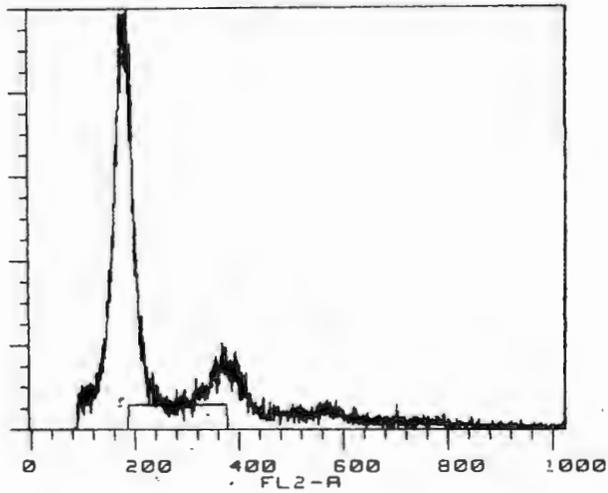
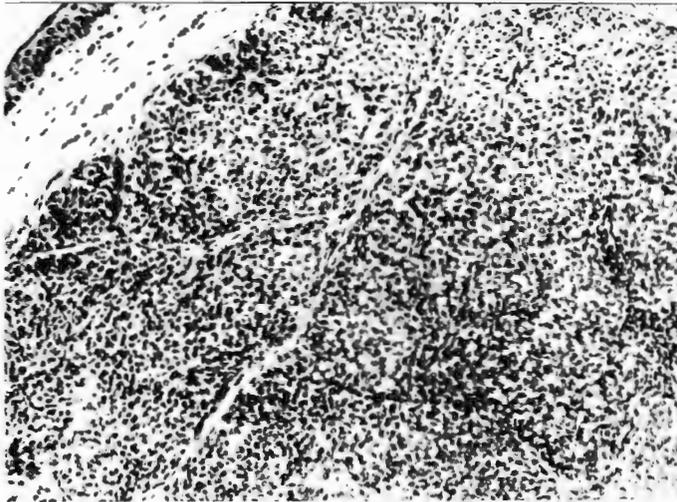
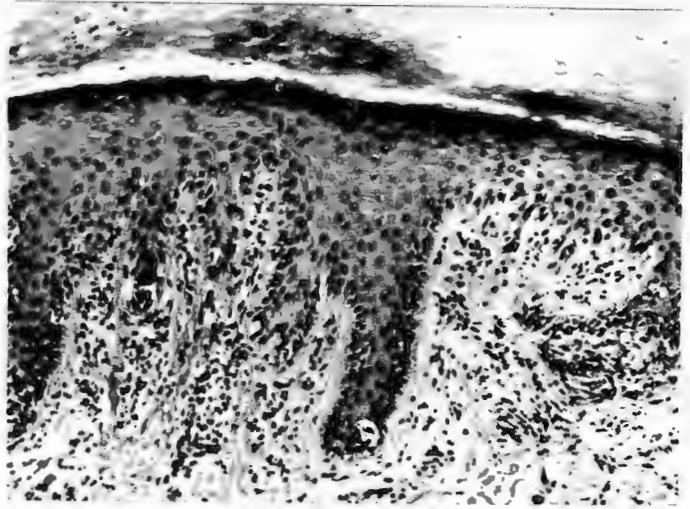


Figura 4 . Histograma con irregularidades y un bajo conteo celular, mostrando un contenido diploide del DNA, elevación de la fase "S" y de G2+M (a). La imagen histológica corresponde a un NMC con gran actividad de unión , atipia y migración transepidérmica de melanocitos. (b).



216

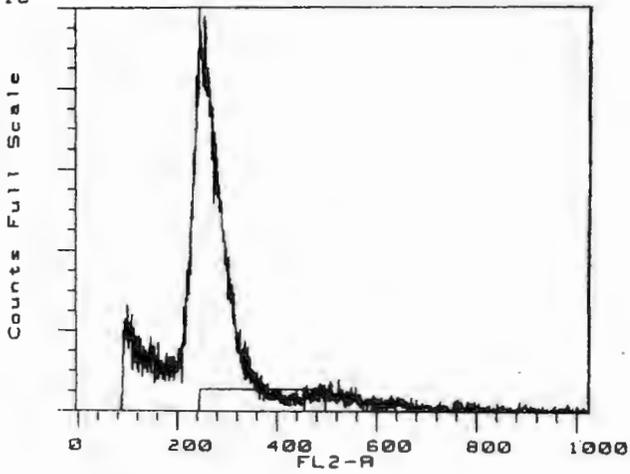


Figura 5. MM acral lentiginoso *in situ* mostrando actividad de unión , melanocitos atípicos y eliminación transepidérmica de pigmento melánico (a).El histograma correspondiente muestra hallazgos normales(b), similar a los márgenes normales.



Foto no 1 . Paciente femeninda de 1 mes de edad presenta NMCG con presencia de MM ulcerado con metástasis. Fallecida a los 2 meses de edad. A esta foto corresponde la figura 1.



Foto No 2.- Paciente femenina de 2 meses 15 días de edad con MNCG (a) Se observan múltiples neoformaciones de diferentes dimensiones y lesiones satélites . (b) La paciente al año 7 meses de edad con presencia de una gran neoformación ulcerada que corresponde a MM. (c) La misma paciente a los 2 años 15 días mostrando un NMCG y MM con metástasis, esta foto fue tomada unos días antes de su fallecimiento. Corresponde a la figura 2.



FOTO NO 2 (c)



Figura 3.- Corresponde a la figura no 3 y caso no 3. Femenina de 14 años de edad con presencia de NMC con de varias cicatrices de biopsias previas.(a).
(b) Posteriormente la misma paciente presentó un nódulo en espalda diagnosticado como MM de baja malignidad.



REFERENCIAS

1. Alper JC: Congenital nevi: The controversy rages on. *Arch Dermatol* 121:734-735, 1985
2. Alper JC, Homes LB, Mihm MC. Birthmarks with serious medical significance: nevocellular nevi, sebaceous nevi, and multiple café au lait spots. *J Pediatr* 1979; 95:9696-700.
3. Alper JC Homes LB. The incidence and significance of birthmarks in a cohort of 4 641 newborns. *Pediatr Dermatol* 1983;1:58-68.
4. Roth ME, Grant-Kels JM. Important melanocytic lesions in childhood and adolescence. *Pediatr Clin N Ame* 1991;38:791-809
5. Ruiz maldonado R, Orozco-Covarrubias ML. Malignant melanoma in children .A review. *Arch Dermatol* 1997;133:363-371
6. Kaplan EN. The risk of malignancy in large congenital nevi. *Plastic reconstr Surg* 1974;53:421-428
7. Rhodes AR, Wood WC, Sober AJ, Minhm MC. Nonepidermal origin of malignant melanoma associated with a giant congenital nevocellular nevus. *Plas Reconstr Surg* 1981;67:782-790.
8. Rohdes Ar, Melski JW. Small congenital nevocellular nevi and the risk of cutaneous melanoma. *J pediatr* 1982;100: 219-224
9. Rhodes AR, Sober AJ, Day CL, Melski JW, Harrist TJ, Mihm MC, Fitzpatrick TB. The malignant potencial of small congenital nevocellular nevi. An estimate of associatiion based on a histologic stuky of 234 primaty cutaneous melanomas. *J Amer Acad Dermatol* 1982; 6: 230-241.
10. Barhill RL, Aguilar M, Cohen C, et al. Congenital melanocytic nevi and DNA content. *Cancer* 1994; 74:2935-2943.
11. Stenzinger W, Suter L, Shuamann J. DNA aneuploidy in congenital melanocytic nevi: suggestive evidencie por premalignant changes. *J Invest Dermatol* 1984;82:569-572.
12. Newton JA, Cmplejohn RS, McGibbon DH. The flow citometry in melanocytic skin lesion *Br. J Cancaer* 1988;58:606-610.
13. Hedley DW, Friedlander ML, Taylor IW, Rugg Ca, Musgrove EA. Methods for analysis of cellular DNA coantent of paraffin -embedded tissue: five years on cytometry. *J Histochem Cytochem* 1983; 31:1333-1335
14. Hedley DW. Flow cyatometry using paraffin-embedded tissue: five years on. *Cytometry* 1989; 10:229-241.
15. Mendez herrera MC, Tamez L, Candido A, Reyes-Esparza JA, Pedernera E. Follicle stimulating hormone increases somsaatic and germ cell number in the ovaty during embryo development. *Gen compor Endoc* 1998; 3:207-217.
16. Kamino H, Ratch H,. Improved detection fo aneuploidy in malignant melanoma using multiparamenter flow cyatometry for S100 protein and DNA content. *J Invest Dermatol* 1989;93:392-396.
17. Bartkowiak D, Shumman K, Otto FJ, Lippold A Drepper H . DNA flow cytometry in prognosis of primaty malignant melanoma. *Oncology* 1991;48:39-43
18. Fuchs m, Wohlrab W, Klapperstuck T, Fuchs U. DNA flow cytometry of malignant melanoma of sthe choroid. *Ophthmologe* 1993;90:496-500.
19. Cohen C, Walker BF, Solomon AR, DeRose PB. DNA plidy and cell cycle analysis in ear maliagnant melanoma by flow and image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1992;14:81-88.

20. Herzberg AJ, Kerma BJ, Borowitz MJ, Seigler HF, Kinney RB. DNA ploidy of malignant melanoma determined by image cytometry of fresh frozen and paraffin-embedded tissue. *J Cutan Pathol* 1991; 18:440-448.
21. Ben-Izhak O, Levy R, Weill S, Froisman G, Cohen H, Stajerman S, Misselevich I, Nitecky S, Eidelman S, Kerner H. Anorectal malignant melanoma. A clinicopathologic study, including immunohistochemistry and DNA flow cytometry. *Cancer* 1997;79:18-25.
22. Barkowiak D, Otto F, Schumann J, Lippold A, Drepper H. Sequential DNA flow cytometry in metastatic malignant melanoma. *Oncology* 1991; 48:154-157.
23. Ruiz Maldonado R, Tamayo L, Laterza AM et al: Giant pigmented nevi: Clinical, Histopathologic, and therapeutic considerations. *J Pediatr* 1992; 120:906-911.
24. Quaba AA, Wallace AF. The incidence of malignant melanoma (0 to 15 years of age) arising in "large" congenital nevocellular nevi. *Plast Reconstr Surg* 1986;78:174-179.
25. Marghoob AA, Schoenbach SP, Koft AW et al. Large congenital melanocytic nevi and risk of developing malignant melanoma: a prospective study. *Arch Dermatol* 1996; 132:170-175.
26. Gari LM, Rivers JK, Kopf AW. Melanomas arising in large congenital nevocytic nevi: a prospective study. *Pediatr Dermatol* 1988; 5:151-158.
27. DeDavid M, Orlov SJ, Provost N. et al. A study of large congenital melanocytic nevi and associated malignant melanomas: Review of cases in the New York University Registry and the world literature. *J Am Acad Dermatol* 1997;36:409-416
28. Rhodes Ar. Melanocytic precursors of cutaneous melanoma: estimated risks and guidelines for management. *Med Clin North Am* 1986;70:3-37.
29. Harlay S, Walch NA. A new look at nevus-associated melanomas. *Am J Dermatopathol*.
30. Arons MS, Hurwitz S: Congenital nevocellular nevus: A review of treatment controversy and report of 46 cases. *Plast Reconstr Surg* 72:355-365,1983
31. Bader JL, Li Fp, Olmstead PM, et al :Childhood malignant melanoma-incidence and etiology. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 7:341-345,1985
32. Balch CM, Murad TM, Soong S-J, et al: A multifactorial analysis of melanoma:Prognostic histopathological features comparing Clark's and Breslow staging methods. *Ann Surg* 188:732-742,1978.
33. Boddie AW, McBride CM: Melanoma in children and adolescence. In Balch CM,Milton GW:Cutaneous Melanoma:Clinical Management and Treatment Results Worldwide. Philadelphia, JB Lippincott, 63-70, 1985.
34. Boddie AW Jr, Smith JL, McBride CM: Malignant melanoma in children and young adult: Effect of diagnostic criteria on staging and end results. *South Med J* 71:1074-1078,1978.
35. Breslow A, Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma:*Ann Surg* 172:902-908, 1970.
36. Brodsky I, Baren M, Kahn SB,et al: Metastatic malignant melanoma from mother to fetus. *Cancer* 18:1048-1054,1965.
37. Bystryn J-C Immunosurveillance and melanoma. *J Invest Dermatol* 92:318s-320s,1989.
38. Cavell B:Transplacental metastasis of malignant melanoma. *Acta Paediatr* 146:37-40,1963.

39. Castilla EE, Da Gracca Dutra M Orioli-Parreiras IM: Epidemiology of congenital pigmented naevi: Incidence rates and relative frequencies. *Br J Dermatol* 104:307-315,1981.
40. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D, et al: A study of tumor progression: The precursor lesion of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathol* 15:1147-1165, 1984.
41. Dargeon HW, Eversole JW, Del Duca V: Malignant melanoma in an infant. *Cancer* 18:299-306,1950.
42. Elder DE. Human melanocytic neoplasms and their etiologic relationship with sunlight. *J invest dermatol* 92: 297s-303s,1989.
43. Elwood Jm, Gallagher RP, Davison J et al: Sunburn, suntan and the risk of cutaneous malignant melanoma: The Western Canada Melanoma study. *Br J Cancer* 51:543-549, 1985.
44. Fish J Smith EB, Canby JP . Malignant melanoma in childhood. *Surgery* 59:309-315,1966.
45. Freedman WL, Mc Mahon FJ. Placental metastasis, Review of the literature and report of a case of metastatic melanoma. *Obstet Gynecol* 16:220-560.
46. Freinkel RK, Cage GW, Caro WA, et al : Precursors to malignant melanoma. National Institutes of Health Consensus Development Conference Consensus Statement, Vol 4,1983.
47. Friedman RJ, Rigel DS, Heilman ER. The relationship between melanocytic nevi and malignant melanoma. *Dermatol Clin* 6:249-256,1988.
48. Gallagher RP, Mc Lean DI, Yang CP. Et . Anatomic distribution of acquired melanocytic nevi in white children. A comparison with melanoma. The Vancouver mole study *Arch Dermatol* 126:466-471,1990.
49. Gari LM, Rivers JK, Kopf AW: melanomas arising in large congenital nevocytic nevia. A prospective study.
50. Greene MH, Clark WH Jr, Toker MA et al. Acquired precursors of cutaneous malignant melanoma. *N Engl J med* 312:91-97,1985.
51. Ho Vc, Sober AJ. Therapy for cutaneous melanoma: An update. *J Am Acad Dermatol* 22:159-176,1990.
52. Kaplan EN. The risk of malignancy in large congenital nevi. *Plas Reconstr Surg* 53:421-424,1974.
53. Kibbi AG, Mihm MC, Sober AJ, et al: Diagnosis and management of malignant melanoma. *Compr Ther* 12:23-31, 1986.
54. Kirkwood JM, Ernstoff MS: Role of interferons in the therapy of melanoma. *J Invest Dermatol* 95:180s-184s, 1990.
55. Kopf AW, Bart RS, Hennessey P: Congenital nevocytic nevi and malignant melanomas *J Am Acad Dermatol* 1:123-130,1979.
56. Lorentzen M., Pers M, Bretteville-Jscand G. The incidence of malignant transformation in giant pigmented nevi. *Scand J plast Reconstr Surg* 11_163-167,1977.
57. Illig L, Weidner F, Hunderer M, et al. Congenital nevi < 10 cm as precursors to melanoma. *Arch Dermatol* 121:12274-1281,1985.