

**Títol del treball:**

**UTILITZACIÓ DE SONES FISH PER AL DIAGNÒSTIC DE MELANOMA CUTANI A PARTIR DE CASOS REALS**

---

Estudiant: Sara Gómez Esteve

Grau en Biologia

Correu electrònic: sagoes94@hotmail.com

Tutor: Jesús García

Cotutor\*: Llúcia Alòs

Empresa / institució: Hospital Clínic Universitari de Barcelona

**Vistiplau tutor (i cotutor\*):**

**Nom del tutor:** Jesús García

**Nom del cotutor\*:** Llúcia Alòs

**Empresa / institució:** Hospital Clínic Universitari de Barcelona

**Correu(s) electrònic(s):** jesus.garcia@udg.edu;  
lalos@clinic.cat

\*si hi ha un cotutor assignat

Data de dipòsit de la memòria a secretaria de coordinació: 24-05-2018

## TAULA DE CONTINGUTS

---

<b>RESUM</b> .....	2
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	5
<b>OBJECTIVES</b> .....	9
<b>METODOLOGIA</b> .....	10
<b>CRITERIS ARQUITECTURALS EN HISTOLOGIA</b> .....	10
<b>DIAGNÒSTIC A PARTIR D'IMMUNOHISTOQUÍMICA</b> .....	11
<b>PROCEDIMENT DE LA TÈCNICA FISH</b> .....	11
<b>INTERPRETACIÓ DELS RESULTATS DE FISH</b> .....	13
<b>ESTUDI BIBLIOMÈTRIC</b> .....	15
<b>RESULTATS</b> .....	16
<b>DISCUSSIÓ</b> .....	22
<b>ÈTICA I SOSTENIBILITAT</b> .....	23
<b>CONCLUSIONS</b> .....	24
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	25
<b>PÀGINES WEB CONSULTADES</b> .....	25

## RESUM

---

Aquest projecte està enfocat a estudiar la importància de la tècnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) per al diagnòstic de melanomes cutanis i la determinació de casos ambigus.

L'estudi parteix del protocol complet que es segueix en la resolució d'un cas complex, des de que arriba la mostra al departament d'Anatomia Patològica de l'Hospital Clínic de Barcelona fins a que es conclou l'informe definitiu per al pacient.

Aquest protocol tracta d'un estudi microscòpic inicial, una anàlisi immunohistoquímica i un FISH en cas que no s'hagi assolit un diagnòstic concloent amb les altres dues tècniques. És a dir, s'exposen els criteris diagnòstics observables al microscopi que ajuden a diferenciar tumors malignes de benignes, remarcant que no sempre és possible concloure aquesta diferència sense l'ús de FISH.

Per a analitzar-ho s'ha realitzat un estudi amb 10 casos, dels quals 3 han resultat ser melanoma i els 7 restants han estat benignes. En gairebé tots ells (amb excepció d'un) ha estat imprescindible l'ús de la tècnica estudiada per tal de poder resoldre'ls.

D'aquests casos se'n destaquen alguns que han permès demostrar que els estudis histològics i immunològics sovint són insuficients per a conèixer la gravetat d'un tumor i que, en aquests casos, l'ús d'una tècnica com FISH pot ser decisiu per a diagnosticar correctament.

Paral·lelament a aquests casos, s'ha realitzat un petit estudi geogràfic que fa referència al nombre d'hospitals arreu d'Espanya que utilitzen FISH per a diagnosticar melanomes cutanis. També s'ha realitzat un estudi bibliomètric que recull un seguit d'articles destacats que es centren a subratllar la importància que té aquesta tècnica en aquest tipus de diagnòstic. D'aquests se n'ha valorat l'any de publicació per tal de conèixer l'interès que ha despertat el FISH arreu del món i a partir de quan es va començar a estudiar amb profunditat.

Amb aquest projecte s'assoleix confirmar la hipòtesi de la rellevància de la tècnica en aquest camp i es subratlla la manca del seu ús i el seu estudi actualment, en contrast amb els resultats tant positius que se n'obtenen.

## RESUMEN

---

Este proyecto está enfocado a estudiar la importancia de la técnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) para el diagnóstico de melanomas cutáneos y la determinación de casos ambiguos.

El estudio parte del protocolo completo que se sigue en la resolución de un caso complejo, desde que llega la muestra al departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínic de Barcelona hasta que se concluye el informe definitivo para el paciente.

Este protocolo trata de un estudio microscópico inicial, un análisis inmunohistoquímico y un FISH en caso que no se haya llegado a un diagnóstico concluyente con las otras dos técnicas. Es decir, se exponen los criterios diagnósticos observables al microscopio que ayudan a diferenciar tumores malignos de benignos, recalando que no siempre es posible concluir esta diferencia sin el uso de FISH.

Para analizarlo se ha realizado un estudio con 10 casos, de los cuales 3 han resultado ser melanoma y los 7 restantes han sido benignos. En casi todos ellos (con excepción de uno) ha resultado imprescindible el uso de la técnica estudiada para poder resolverlos.

De estos casos se destacan algunos que han permitido demostrar que los estudios histológicos e inmunológicos a menudo son insuficientes para reconocer la gravedad de un tumor y que, en estos casos, el uso de una técnica como FISH puede ser decisivo para diagnosticar correctamente.

Paralelamente a estos casos, se ha realizado un pequeño estudio geográfico que hace referencia al número de hospitales en toda España que utilizan FISH para diagnosticar melanomas cutáneos. También se ha realizado un estudio bibliométrico que recoge un conjunto de artículos destacados que se centran en subrayar la importancia que tiene esta técnica en este tipo de diagnóstico. De estos se ha valorado el año de publicación con la intención de conocer el interés que ha despertado FISH alrededor del mundo y a partir de cuando se empezó a estudiar con profundidad.

Con este proyecto se consigue confirmar la hipótesis de la relevancia de la técnica en este campo y se subraya la falta de su uso y su estudio actualmente, en contraste con los resultados tan positivos que se obtienen.

## ABSTRACT

---

This project is focused on studying the importance of FISH technique (Fluorescence In Situ Hybridization) for the diagnosis of cutaneous melanomas and the determination of ambiguous cases.

The study begins with the complete protocol that is followed in the resolution of a complex case, since the sample arrives at the Pathological Anatomy Department of Hospital Clínic of Barcelona until the final report for the patient is concluded.

This protocol deals with an initial microscopic study, an immunohistochemical analysis and, in case of a non-conclusive diagnosis, a FISH technique is implemented. Thus, the diagnostic criteria observable under the microscope that helps to differentiate malignant tumors from benign ones are exposed, emphasizing that it is not always possible to conclude this difference without the use of FISH.

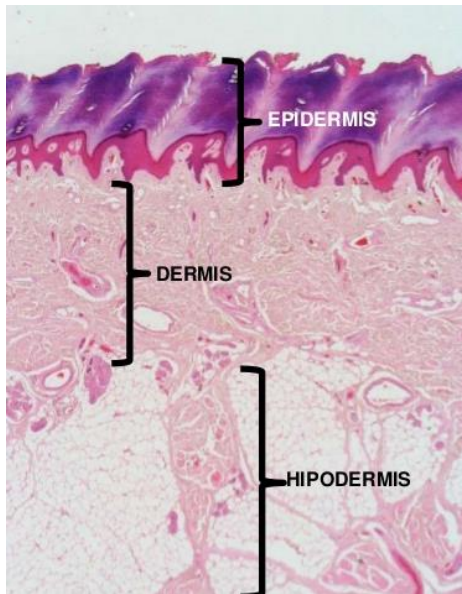
To analyze it, a study was carried out with 10 cases, of which 3 of them have been melanoma and the remainder have been benign. In almost all of them (with one exception) it has been essential to use the technique studied to solve them.

Of these cases, there are some that have allowed us to demonstrate that histological and immunological studies are often inadequate to recognize the seriousness of the tumor and that, in these cases, the use of a technique such as FISH can be decisive for a correct diagnosis. Simultaneously to these cases, one geographic study has been carried out. It refers to the number of hospitals throughout Spain that use FISH to diagnose cutaneous melanomas. A bibliometric study has also been carried out and it includes a set of outstanding articles that focus on emphasizing the importance of this technique in this type of diagnosis. From these studies the year of publication has been valued with the intention of knowing the interest that FISH has aroused around the world and since when it began to be studied in depth.

With this project it is possible to confirm the hypothesis of the relevance of the technique in this field and makes remarkable the lack of its use and study, in contrast to the positive results obtained.

## INTRODUCCIÓ

La pell és l'òrgan més gran del cos i es fa càrrec de moltes funcions importants: recobreix i protegeix els òrgans interns, fa de barrera a agents externs, ajuda a controlar la temperatura corporal i protegeix el cos de rajos UV, entre d'altres.



**Figura 1:** Esquema que exemplifica la distribució de les tres capes de la pell humana. Disponible a: <https://es.slideshare.net/julianazapat/acardona/histologia-de-la-piel-41057741>

La pell està dividida en tres capes: la epidermis, la dermis i la hipodermis. La epidermis és la més superficial i està en constant activitat i renovació. És la responsable de moltes de les funcions esmentades anteriorment (Wheater et al., 1979). Com s'exposa a l'Enciclopèdia de la Salut, en aquesta capa es troben els melanòcits, que són les cèl·lules productores del pigment i encarregades, per tant, de bloquejar els rajos ultraviolats del sol per evitar que es malmeti el DNA de la pell exposada a la llum.

Per molts possibles motius i factors, i no tots coneguts, aquest òrgan pot ser susceptible d'originar tumors, els quals poden provenir de diferents orígens.

Quan una cèl·lula melanocítica produeix una neoplàsia (proliferació) és quan es pot formar un nevus (benigne) o un melanoma (maligne) i és necessari estudiar-ho. Els nevus melanocítics són lesions cutànies benignes molt freqüents que es troben en un percentatge molt elevat de la població. Són proliferacions (tumors) derivades dels

melanòcits. Es caracteritzen per ser lesions planes, asimptomàtiques, simètriques, de contorn ben delimitat, de coloració regular i, en general, de diàmetre petit (<6mm) (Weedon et al., 2002).

Per altra banda, el melanoma és un càncer de pell molt agressiu que ha augmentat les seves taxes d'incidència i mortalitat. Els registres de les taxes d'aquest càncer mostren un increment del 3 al 7% cada any en les poblacions de pell blanca; aquest percentatge és més elevat que el que es coneix de qualsevol altre càncer (Gerami et al., 2009).

El melanoma presenta dues fases diferents de creixement: una radial (intraepidèrmica) i una vertical (intradèrmica). En la primera, la tumoració queda delimitada en la epidermis, sense capacitat de produir metàstasi, i la solució és la extirpació quirúrgica. En la fase de creixement vertical, la tumoració envaeix la dermis adoptant la capacitat de produir metàstasis limfàtiques o sanguínies.

Les principals característiques clíniques del melanoma són: creixement asimètric, contorn imprecís i coloració irregular amb àrees negres i àrees menys pigmentades i blavoses (les quals representen àrees de regressió).

Segons el Dr. Víctor Alegre de Miquel, la utilització sistemàtica dels criteris clínics resumits en l'acrònim ABCD (A: Asimetria; B: "Bordes" irregulars; C: Coloració heterogènia; D: Diàmetre major de 6mm) és útil i molt emprada per discriminar entre lesions benignes i malignes a ull nu.

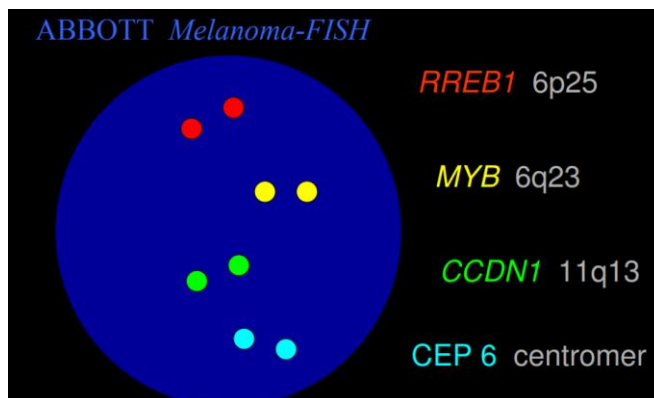
La majoria dels melanomes es poden distingir fàcilment de nevus gràcies a un examen histopatològic. No obstant, també existeix ambigüitat diagnòstica en alguns casos, degut a les seves semblances morfològiques i/o histopatològiques (Gerami et al., 2009).

Aquesta ambigüitat ve donada per casos com els nevus atípics (tumor spitzoide), cèl·lules amb característiques sospitoses de malignitat, com contorn irregular i/o de mida gran, però que es corresponen a una lesió benigne. Aquests tumors són els que generen més discrepàncies entre els patòlegs a l'hora de diagnosticar.

A més, tant nevus com melanoma comparteixen algunes alteracions genètiques en els inicis del seu procés de formació.

No obstant, mentre en els nevus no es troben aberracions cromosòmiques detectables, els melanomes mostren patrons recurrents d'aquestes. Aquestes diferències en els patrons d'aberracions cromosòmiques confereixen l'avantatge de poder dissenyar tècniques per a diferenciar-los, com és FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) (Gerami et al., 2009).

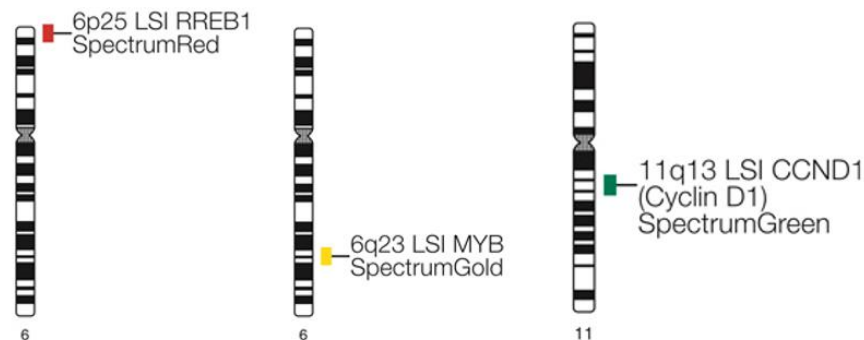
S'ha demostrat que els melanomes contenen regions afectades per alteracions en el nombre de còpies de DNA. Gràcies a aquestes regions s'han pogut dissenyar sondes que hi hibriden i ajuden en la classificació diagnòstica de tumors melanocítics que es poden classificar de manera més fiable que amb altres mètodes convencionals. De totes maneres és necessari l'ús simultani de la clínica estàndard i l'avaluació histopatològica amb l'estudi de FISH (Gerami et al., 2009).



**Figura 2:** Esquema que representa com s'expressarien les sondes en una cèl·lula sense malignitat, és a dir, s'hauria de veure el nucli amb dues còpies de cada sonda (una per cromosoma). Font: Una Patologia para el siglo XXI. Disponible a: [https://www.seap.es/documents/228448/524247/04\\_Rguez\\_Peralto.pdf](https://www.seap.es/documents/228448/524247/04_Rguez_Peralto.pdf)

Per aprofundir en les característiques de la tècnica, cal destacar que els patrons recurrents d'aberracions cromosòmiques que mostra el melanoma són, per exemple, les pèrdues dels cromosomes 6q, 8p, 9p i 10q, i/o l'increment en el nombre de còpies dels cromosomes 1q, 6p, 7, 8q, 17q i 20q (Adrienne et al., 2009).

El kit de la tècnica emprat en aquest projecte conté una combinació de 4 sondes: PREB1, CEP6, MYB i CCND1 dirigides, respectivament, als cromosomes 6p25, centròmer 6, 6q23 i 11q13, de manera que proporciona una gran discriminació per al diagnòstic.



**Figura 3:** Esquema on s'han representat els cromosomes 6 i 11 amb les regions complementàries a les seves respectives sondes. Font: Abbott molecular Oncology and Genetics (2016). Disponible a: <https://www.molecular.abbott/sal/en-us/staticAssets/AMD-US-Oncology-and-Genetics-Catalog.pdf>

Com ja s'ha esmentat, aquestes sondes hibriden amb la seva regió complementària, per a la qual han estat dissenyades, i permeten reconèixer-la gràcies a la fluorescència que tenen. Quan s'analitzen els resultats del FISH al microscopi de fluorescència es fa un recompte i s'avalua si en una mateixa cèl·lula hi ha menys de dues còpies (deleció), dues còpies (normal) o més de dues còpies (amplificació) a cada nucli per cada sonda, ja que cadascuna es correspon a un color. Per tant, mitjançant el comptatge de FISH es podrà determinar si hi ha deleció o amplificació d'alguna regió cromosòmica (Gerami et al., 2009).

Segons la bibliografia consultada, s'ha demostrat que FISH és un mètode amb alt percentatge de sensibilitat i especificitat per a classificar tumors melanocítics benignes i malignes. Aquesta tècnica, per tant, té el potencial d'ajudar en la estratificació del subgrup de tumors melanocítics que són difícils de classificar emprant la histologia convencional.

Hi ha altres tècniques, com CGH i MLPA, que permeten la quantificació precisa de les alteracions en el nombre de còpies de DNA. En canvi, FISH permet la visualització directa d'alteracions genètiques quantitatives en les cèl·lules tumorals de l'individu i permet obtenir una anàlisi de la població tumoral pura (Adrienne et al., 2009).

El diagnòstic exacte i precís del tipus de tumor és imprescindible, ja que un fals positiu pot derivar en una teràpia inapropiada i una greu càrrega psicològica, però un fals negatiu pot suposar una deficiència en el tractament d'un càncer mortal (Gerami et al., 2009). Cal tenir en compte que els diagnòstics basats en morfologia tenen un grau elevat de subjectivitat interobservador, per tant, el fet que s'hagin dissenyat tècniques com el FISH, ha resultat una eina molt útil per a unificar criteris.

Tot i això, cal tenir en compte alguns avantatges i desavantatges de la tècnica, segons Julie D. R. Reimann et al. (2012):



Avantatges de FISH:

- Precisió diagnòstica millorada per a tumors melanocítics histològicament ambigus.
- Es realitza en teixit fixat en formol i inclòs en parafina.
- Requereix una petita quantitat de teixit, en comparació amb la tècnica CGH, i es manté la morfologia del teixit.
- Els requeriments de l'equip de laboratori per a la tècnica no són prohibitius econòmicament.
- La tria de la zona a avaluar ha de ser controlada per mans expertes, buscant l'àrea del tumor amb major aberració cromosòmica, i després realitzar allà l'anàlisi.

Desavantatges de FISH:

- Poden donar-se falsos negatius, per tant, un resultat positiu és generalment més fiable que un resultat negatiu.
- També es poden donar falsos positius, generalment degut a una poliploïdia, superposició nuclear o falta de precisió al realitzar la prova.
- La tècnica té una sensibilitat variable segons el subtipus de melanoma.
- La precisió del resultat depèn de la selecció de la població més pura de melanòcits per a la avaluació, l'aplicació estricta de l'algoritme de diagnòstic, el control de la poliploïdia i un alt nivell de capacitació i experiència en l'aplicació de l'enfoc algorítmic.

Per tant, com en tantes tècniques aplicades a la biologia humana, el FISH per al diagnòstic de melanoma pot no resultar exacte, ja que hi ha una subjectivitat, una possibilitat d'error i una experiència requerida en totes les etapes del procés. Per això és molt important fer èmfasi en conèixer bé totes les fases, el funcionament i la interpretació dels resultats.

## **OBJECTIVES**

---

### MAIN OBJECTIVE:

The main purpose of this study is to verify that the FISH technique is more sensitive and specific than the conventional histopathological study and the immunohistochemical techniques, traditionally used for the diagnosis of melanocytic tumors.

### Secondary objectives:

- Observation and identification of benign and malignant melanocytic tumor cells.
- Learn the method of the FISH technique in woven, fixed with formol and included in paraffin.
- Learn the evaluation of results with a fluorescence microscope
- Study through the FISH technique a series of melanocytic tumors and compare the results with the histological and immunohistochemical characteristics of the lesions.

## METODOLOGIA

Per a emetre un diagnòstic d'una mostra que arriba al laboratori d'Anatomia Patològica cal seguir un procediment determinat.

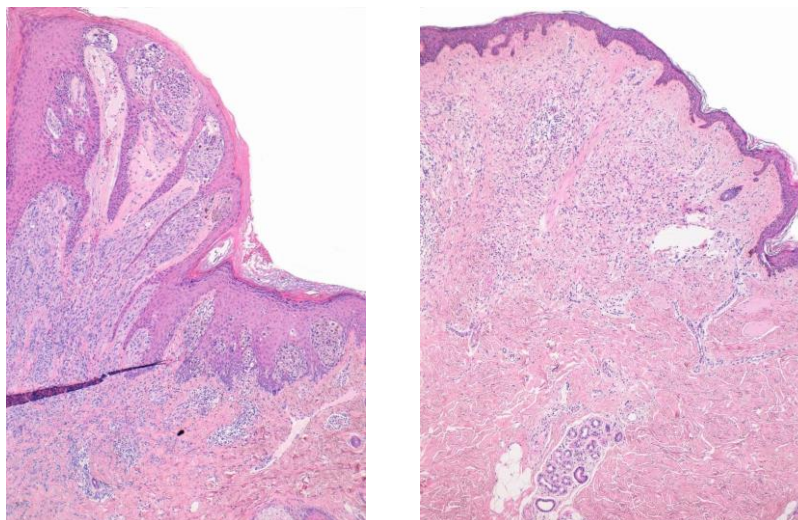
Primer es fa una inclusió en parafina i un tall histològic de la mostra, seguidament es tenyeix amb hematoxilina eosina i, finalment, s'observa al microscopi, on s'identifiquen les característiques arquitecturals de la mateixa. Si en aquest punt no es conclou el diagnòstic amb prou certesa, com succeeix en molts casos, es requereixen tècniques immuno-histoquímiques.

La més emprada en dermatopatologia és el Melan A amb KI67 i ajuda a diferenciar, moltes vegades, els tumors malignes dels benignes. Tot i així, com ja s'ha esmentat, no sempre s'aconsegueix arribar al diagnòstic definitiu només amb aquests dos passos, i és en aquest punt quan el FISH pot resoldre els casos ambigus.

## CRITERIS ARQUITECTURALS EN HISTOLOGIA

Les mostres histològiques dels casos estudiats han estat mirades amb un microscopi Olympus BX-41 a 40x, 100x i 400x, on s'han observat totes les seves característiques arquitecturals. Per a considerar una mostra maligna aquesta ha de complir els següents criteris:

- Asimetria: Fent mentalment un tall longitudinal a la mostra s'ha d'observar una clara asimetria a banda i banda.
- Creixement Pagetoide: Aquest creixement consisteix en una invasió epidèrmica per part de les cèl·lules de la dermis i es considera un criteri de malignitat.
- Pleomorfisme: Consisteix en observar cèl·lules molt diferents les unes de les altres.
- Augment de la relació nucli/citoplasma: És a dir, observar un augment en la mida del nucli respecte el citoplasma.
- Observació de cèl·lules en mitosi a la dermis: És un criteri diferencial de melanoma.
- Maduració: Consisteix en trobar cèl·lules atípiques a la dermis.

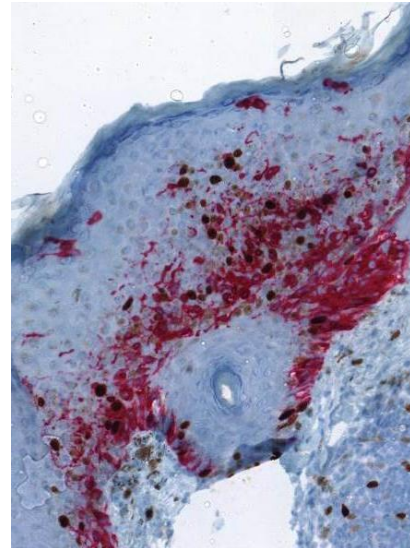


**Figures 4 i 5:** Imatges histològiques de casos reals de mostres observades al microscopi Olympus BX-41 a 40x. A l'esquerra un exemple de melanoma i a la dreta un cas benigne.

## DIAGNÒSTIC A PARTIR D'IMMUNOHISTOQUÍMICA

Les mostres resultants de la tècnica Melan A i Ki67 també han estat mirades amb el microscopi Olympus BX-41 A 40x, 100x i 400x. Aquesta tècnica utilitza dos marcadors: Melan A, que marca positivament de vermell el citoplasma de les cèl·lules melanocítiques, i Ki67, el qual marca en marró el nucli de les cèl·lules que estan en qualsevol cicle cel·lular excepte G0, és a dir, que estan en proliferació.

D'aquesta manera, es fa un doble marcatge perquè així quan s'observin cèl·lules amb citoplasma vermell i nucli marró voldrà dir que estan proliferant i són melanocítiques, i si a més s'observa que infiltrin la epidermis i són més d'un 10% respecte les cèl·lules totals es pot considerar un criteri clar de malignitat.



**Figura 6:** Imatge d'un cas real observat al microscopi Olympus BX-41 a 40x que mostra les cèl·lules marcades amb Melan A i Ki-67.

## PROCEDIMENT DE LA TÈCNICA FISH

El protocol de la tècnica es duu a terme a partir de mostres de teixits fixats amb formalina neutre tamponada i inclosos en parafina. Els passos d'aquest protocol són els següents:

1. **Desparafinació-Rehidratació:** Consisteix en situar les mostres en una bateria per a portaobjectes i anar-les rentant amb les següents reactius i dilucions: Xilol (5 min.), Xilol (5 min.), Etanol 96% (2 min.), Etanol 96% (2 min.), Etanol 70% (2 min.), Etanol 70% (2 min.), Wash /Buffer (2min).
2. **Pretractament per a Microones:** S'incuben les mostres durant 10 minuts al microones Whirlpool JT 479 SL Jet chef Premium amb la funció d'ebullició (steam), la qual manté una temperatura entre 95 i 100°C. Passats els 10 minuts es deixen temperar dins el microones però amb la porta oberta i destapades durant 15 minuts a temperatura ambient. A continuació es submergeixen les mostres en Tampó de Rentat (Wash Buffer) durant 3 minuts a temperatura ambient i es repeteix amb tampó fresc.
3. **Digestió amb Pepsina RTU (Ready To Use):** Es retiren les mostres de la bateria i s'asseca el voltant del portaobjectes amb un paper sense assecar la mostra. Seguidament s'afegeix la Pepsina RTU freda sobre la mostra assegurant que el teixit queda ben recobert i s'incuba a temperatura ambient entre 10 i 15 minuts. Passat aquest temps s'incuba la mostra amb Pepsina en el Hybridizer DAKO Statspin a 37°C durant 8 minuts.



**Figura 7:** Imatge dels dos Hybridizers DAKO Statspin emprats per a la tècnica.

4. **Deshidratació:** Es retiren les mostres del Hybridizer i es deixen assecat en posició vertical a temperatura ambient durant uns 15-20 minuts.
  
5. **Desnaturalització i Hibridació:** Mentre les mostres s'estan deshidratant s'han de descongelar la Sonda i el IQBuffer equilibrant-los a temperatura ambient (uns 30 minuts) i intentant evitar que la Sonda s'exposi a la llum. A continuació s'han de vortejar a 2.500 rpm uns 15 segons per tal d'homogeneïtzar-los. Seguidament, per a cada portaobjectes, es barregen 9  $\mu$ l de IQBuffer + 1  $\mu$ l de la sonda (3') + 1  $\mu$ l de la sonda (5'). Aquesta barreja (11  $\mu$ l) s'afegeix sobre el portaobjectes i, seguidament, es col·loca el cobreobjectes per tal de facilitar la seva dispersió sobre la mostra i evitar la formació de bombolles. En el cas que aquestes es formin s'han de treure pressionant suaument sobre el cobreobjectes. Quan es confirma que no hi ha cap bombolla s'ha de segellar tot el voltant del cobreobjectes amb el segellador assegurant que queda ben unit.  
Per tal de que es dugui a terme la Hibridació entre la sonda i la regió cromosòmica específica de la mostra s'introdueixen els portaobjectes segellats a l'Hybridizer amb el següent programa: 10 minuts de desnaturalització a 80°C seguit de la Hibridació 120 minuts a 45°C, i iniciar el procés d'hibridació.
  
6. **Rentat d'Estringència:** Un cop passats els 120 minuts d'hibridació s'han de fer uns rentats a les mostres. S'omplen dues bases de Tampó de Rentat d'Estringència, una d'elles a temperatura ambient i l'altra s'introdueix amb una tapa en un bany d'aigua per a escalfar-lo a 63°C. Mentre el Tampó s'escalfa, es retiren, amb molt de compte, el segellador i els cobreobjectes de les mostres i s'introdueixen, d'un en un, dins la bateria de la base amb Tampó de Rentat d'Estringència a temperatura ambient. Es transfereixen aquests portaobjectes del Tampó a temperatura ambient al Tampó a 63°C durant 10 minuts estrictes. Finalment, es retiren els portaobjectes i es posen en Tampó de rentat durant 3 minuts i es repeteix amb Tampó fresc.
  
7. **Deshidratació:** Un cop fet el rentat cal deshidratar les mostres. Per a fer-ho, se'ls aplica una bateria seriada d'etanol de graus 70%, 85% i 96% (2 minuts en cada pas) i, seguidament, cal assecat els portaobjectes a l'aire.
  
8. **Muntatge i visualització:** Per a finalitzar tot el procés s'apliquen 15  $\mu$ l de Medi de Muntatge de Fluorescència amb DAPI (Fluorescence Mounting Medium) sobre l'àrea de la mostra en el portaobjectes i es posa el cobreobjectes. Un cop ja es té la mostra finalitzada i llesta per examinar, seria ideal mantenir aquesta a la foscor i a -20°C per tal de que no perdi la senyal fluorescent. El portaobjectes podrà ser visualitzat entre els 15 minuts després de ser muntat i els 7 dies posteriors, utilitzant filtres DAPI i Cy3/FITC simple o doble.

### **INTERPRETACIÓ DELS RESULTATS DE FISH**

Un cop feta la tècnica s'ha mirat amb el microscopi de fluorescència Olympus BX-61 a 100x en oli d'immersió i/o s'han escanejat les imatges obtingudes del portaobjectes i s'ha fet el recompte de nuclis per a cada sonda a la pantalla de l'ordinador amb el programa *Isis FISH Imaging System*. S'ha emprat un kit de 4 sondes Vysis Melanoma FISH probe kit (Abbott) i cadascuna es correspon amb un color:

- CCND1: verd
- PREB1: vermell
- CEP6 (centromèrica): blau
- MYB: groc

Per a interpretar els resultats del FISH en cada cas es fa un recompte de 30 cèl·lules. Primer cal observar la definició i la forma de la cèl·lula amb el filtre DAPI del programa. Un cop la cèl·lula està identificada, cal canviar de filtre i comptar quants punts s'hi observen de cada color i apuntar-ho en una taula. Aquest procés s'ha de repetir fins a obtenir les 30 cèl·lules comptades. Es descarten aquelles cèl·lules que no mostren senyals per a més d'una sonda.

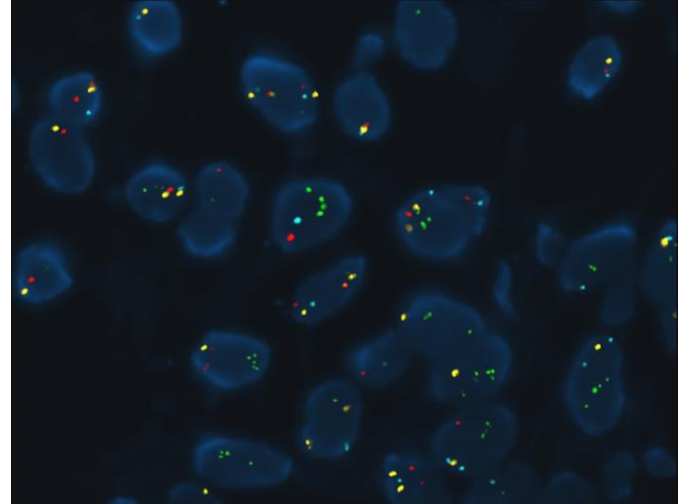
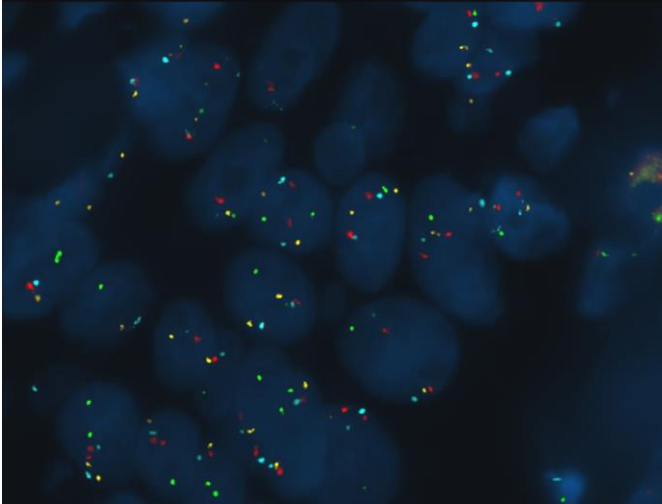
<b>NUCLIS</b>	<b>CCND1</b>	<b>PREB1</b>	<b>CEP6</b>	<b>MYB</b>
1				
2				
3				
4				
...30				

***Taula 1:** Exemple de la taula emprada per a fer el recompte de nuclis de FISH. A les caselles en blanc s'apunta el nombre de senyals que es veuen a cada cèl·lula de les respectives sondes, fins a tenir-ne 30 comptades. A partir dels valors obtinguts es fan els càlculs pertinents.*

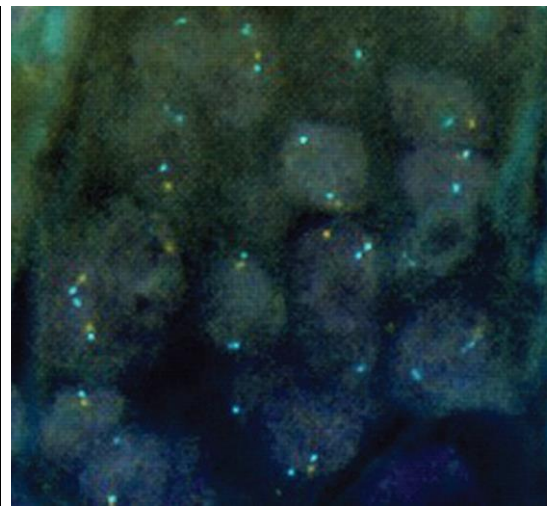
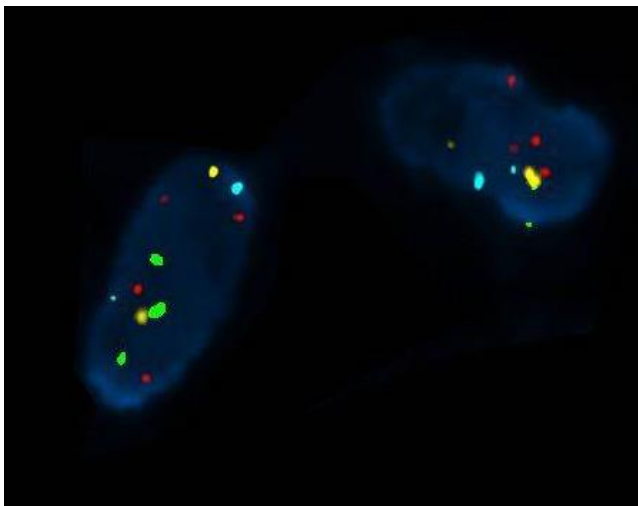
Finalment, es calculen els següents percentatges, i el diagnòstic serà positiu (melanoma) en cas que es compleixi, com a mínim, un dels següents criteris:

- >38% dels nuclis mostren guany (>2 còpies) de **CCND1**.
- >29% dels nuclis mostren guany (>2 còpies) de **PREB**.
- >55% dels nuclis mostren guany (més còpies) de **PREB** sobre **CEP6**.
- >40% de les cèl·lules mostren pèrdues (menys còpies) de **MYB** en relació a **CEP6**

Per a exemplificar possibles resultats de casos reals obtinguts amb FISH, es mostren les següents imatges:



**Figures 8 i 9:** Imatges de casos reals de la tècnica FISH observats amb el programa Isis FISH Imaging System. A l'esquerra un cas negatiu, on s'hi observen dues sondes de cada tipus per nucli (corresponents a les dues còpies de cada cromosoma d'una persona sana). A la dreta, imatge d'un melanoma amb la sonda CCND1 (verda) amplificada. Es veu clarament en més d'una cèl·lula com aquesta sonda té més d'una còpia.



**Figures 10 i 11:** Imatges de casos reals de la tècnica FISH observats amb el programa Isis FISH Imaging System. A l'esquerra un altre tipus de cas positiu, amb amplificació de la sonda PREB1 (vermella). A la dreta, imatge d'un melanoma amb pèrdua de MYB (grogua) respecte CEP6 (blava), per tant una deleció. Es pot observar com a cada nucli hi ha menys senyals de MYB que de CEP6.

Paral·lelament a aquest reduït estudi experimental, també s'ha fet un petit estudi bibliogràfic d'aquesta tècnica. A través de fonts internes del Clínic, s'han pogut conèixer aquells hospitals arreu d'Espanya que també fan servir el FISH com a eina principal de diagnòstic de melanoma. D'aquestes petites dades s'ha dissenyat un mapa per a poder interpretar una aproximació de l'ús d'aquesta tècnica al país.

### **ESTUDI BIBLIOMÈTRIC**

A més, s'han cercat via la pàgina Pubmed els estudis publicats arreu del món que han relacionat la tècnica amb el diagnòstic de melanoma. Les paraules claus emprades per a realitzar aquesta cerca han sigut: Fluorescence in situ Hybridization, FISH, melanoma. D'aquests estudis s'ha tingut en compte l'any de publicació i s'ha dissenyat un petit gràfic amb aquest paràmetre per estudiar-ne, a petita escala, l'evolució a tot el món. (Disponible a: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).



## RESULTATS

Per tal de confirmar la hipòtesi de que la tècnica FISH és una eina fonamental per al diagnòstic de melanomes cutanis, s'ha fet un estudi en profunditat de 10 casos que han passat per, com a mínim, dues de les tres fases d'aquest diagnòstic, incloent FISH.

Els resultats obtinguts a partir de l'estudi microscòpic, immunohistoquímic (en alguns casos) i del FISH dels 10 casos treballats en el projecte són els següents, continguts en la Taula 2:

	CAS 1	CAS 2	CAS 3
<b>DESCRIPCIÓ MICROSCÒPICA</b>	Lesió tumoral melanocítica simètrica, 6mm, formada per grans nius de cèl·lules atípiques associades a mitosi.	Proliferació melanocítica amb arquitectura simètrica i amb un component inflamatori. No s'observa creixement pagetoide. S'identifica una mitosi per mm <sup>2</sup> .	Lesió cutània que mostra epidermis hiperplàsica. S'hi observa proliferació de cèl·lules melanocítiques. No es distingeixen signes de maduració en profunditat. S'identifica una mitosi per mm <sup>2</sup> .
<b>IMMUNO-HISTOQUÍMICA</b>	Índex proliferatiu elevat en el component epidèrmic i menor de l'1% en el component dèrmic.	Positiva (>10%) de manera irregular en les zones superficials i profundes.	L'índex proliferatiu és d'aproximadament un 10% en algunes àrees profundes.
<b>MOTIU PEL FISH</b>	S'observen trets atípics, però no compleix criteris complerts per a melanoma.	S'observa atípia però és necessari confirmar mitjançant FISH.	La immuno-histoquímica ha donat resultat positiu (>10%) però només en algunes àrees.
<b>RESULTAT FISH</b>	CCDN1: 0% PREB1: 3% PREB1 vs CEP6: 13% MYB vs CEP6: 33%	CCDN1: 10% PREB1: 23% PREB1 vs CEP6: 26% MYB vs CEP6: 10%	CCDN1: 16% PREB1: 10% PREB1 vs CEP6: 30% MYB vs CEP6: 40%
<b>DIAGNÒSTIC</b>	NEGATIU	NEGATIU	NEGATIU

	<b>CAS 4</b>	<b>CAS 5</b>	<b>CAS 6</b>
<b>DESCRIPCIÓ MICROSCÒPICA</b>	Lesió cutània caracteritzada per proliferació de cèl·lules melanocítiques, predominant a la dermis. Hi ha atípia nuclear moderada i figures ocasionals de mitosi. S'observen signes de pseudomaduració en profunditat.	Lesió cutània amb proliferació de cèl·lules melanocítiques, algunes d'elles multinucleades. S'observa atípia nuclear, escasses figures de mitosi dèrmica i signes de maduració cel·lular en profunditat.	S'observa proliferació melanocítica composta, discretament asimètrica. S'observen alguns nius d'aspecte clarament expansiu, i ocasionals figures de mitosi. No s'aprecia extensió pagetoide. Component dèrmic format per petits nius amb tendència a la maduració i sense mitosi.
<b>IMMUNO-HISTOQUÍMICA</b>	No es va dur a terme. Es va fer directament el FISH.	Proliferació cel·lular negativa (<10%).	No es va dur a terme. Es va fer directament el FISH.
<b>MOTIU PEL FISH</b>	Hi havia moltes sospites de melanoma a partir de l'estudi microscòpic i es necessita confirmar amb FISH.	Es sol·licita el FISH degut a que no es veu un clar negatiu a la histologia, tot i que la immuno-histoquímica hagi sortit negativa.	S'observen moltes característiques atípiques tot i que cap d'elles 100% discriminatòria en una histologia i es veu necessari fer directament un FISH.
<b>RESULTAT FISH</b>	CCDN1: <b>67%</b> PREB1: 20% PREB1 vs CEP6: 17% MYB vs CEP6: 23%	CCDN1: <38% PREB1: <29% PREB1 vs CEP6: <55% MYB vs CEP6: <40%	CCDN1: 2% PREB1: 10% PREB1 vs CEP6: 11% MYB vs CEP6: 20%
<b>DIAGNÒSTIC</b>	POSITIU	NEGATIU	NEGATIU

	<b>CAS 7</b>	<b>CAS 8</b>
<b>DESCRIPCIÓ MICROSCÒPICA</b>	És una proliferació melanocítica situada a la dermis amb arquitectura asimètrica. S'hi observen nius tumorals amb índex mitòtic elevat. No obstant, a les parts profundes aquest índex és molt escàs. El gruix de la lesió és de 2,8mm.	S'observa proliferació en cèl·lules melanocítiques en la unió dermo-epidèrmica i la dermis superficial, amb tendència al creixement pagetoide. Les cèl·lules melanocítiques mostren moderada atípia citològica, sense evidenciar figures de mitosi. En general és una atípia de grau considerable.
<b>IMMUNO-HISTOQUÍMICA</b>	No es va dur a terme. Es va fer directament el FISH.	S'observen cèl·lules en proliferació només en la unió dermo-epidèrmica.
<b>MOTIU PEL FISH</b>	Tot i complir alguns criteris de malignitat, no es veu del tot clar el diagnòstic positiu i es sol·licita el FISH.	Degut a que s'observa una atípia considerable en les dues anàlisis anteriors es demana confirmar una negativitat de la lesió amb el FISH.
<b>RESULTAT FISH</b>	CCDN1: 55% PREB1: 3.2% PREB1 vs CEP6: 13% MYB vs CEP6: 13%	CCDN1: 23% PREB1: 3% PREB1 vs CEP6: 23% MYB vs CEP6: 13%
<b>DIAGNÒSTIC</b>	POSITIU	NEGATIU

	CAS 9	CAS 10
<b>DESCRIPCIÓ MICROSCÒPICA</b>	S'observa elevada proliferació de cèl·lules melanocítiques, pleomorfisme general, una clara asimetria i unes 11 mitosi per mm <sup>2</sup> .	Lesió cutània predominantment dèrmica, formada per cèl·lules melanocítiques. No es distingeix creixement Pagetoide però sí una atípia moderada.
<b>IMMUNO-HISTOQUÍMICA</b>	No es va dur a terme. Es va fer directament el FISH.	Índex proliferatiu d'aproximadament un 5%.
<b>MOTIU PEL FISH</b>	Es tracta d'un cas control per al funcionament de les sondes. Era un clar positiu microscòpicament.	S'ha observat atípia en l'estudi microscòpic i es vol confirmar la benignitat amb FISH.
<b>RESULTAT FISH</b>	CCDN1: <b>80%</b> PREB1: <b>53%</b> PREB1 vs CEP6: 53% MYB vs CEP6: <b>43%</b>	CCDN1: 0% PREB1: 6% PREB1 vs CEP6: 16% MYB vs CEP6: 16%
<b>DIAGNÒSTIC</b>	POSITIU	NEGATIU

**Taula 2:** Taula on es recullen els resultats obtinguts dels tres paràmetres estudiats en els 10 casos treballats. Es mostra la descripció microscòpica, la immunohistoquímica, el motiu pel qual es va fer el FISH, el resultat del FISH i el diagnòstic final de cada cas. S'han marcat amb groc aquells resultats de la tècnica que compleixen criteri de malignitat i atribueixen al diagnòstic un resultat positiu.

A la Taula 2 s'han reflectit els resultats de tots els casos que s'han pogut recollir per a l'estudi. S'observa que, dels 10 casos treballats, 7 han resultat negatius i 3 s'han diagnosticat com a melanoma. També, que els tres casos positius han sigut melanomes amb la sonda CCND1 amplificada, ja que el recompte d'aquesta dins dels nuclis era força més elevat que el normal. Però en el cas 9 també ha amplificat la sonda PREB1, i MYB ha mostrat pèrdues considerables respecte CEP6.

Cal remarcar que el cas 9, com s'especifica a la taula, ha sigut molt útil per a discriminar alguns problemes que s'han tingut amb les sondes a l'hospital les últimes setmanes a l'hora de diagnosticar. Seguint el protocol, aquest cas no hagués requerit de FISH per al diagnòstic, però com s'ha vist clarament amb la histologia que es tracta d'un melanoma, ja que en compleix molts dels seus criteris arquitecturals, s'ha sol·licitat el FISH per a comprovar si la tècnica estava funcionant bé. Es tracta d'un cas molt interessant com a interpretació de resultats del FISH ja que ha complert molts criteris de malignitat per a la tècnica.

A partir de la Taula 2 també s'observa que no tots els casos han precisat del Melan A i el Ki-67, sinó que n'hi ha 4 que han passat directament de la histologia al FISH degut a les seves característiques.

En aquests resultats també es pot comprovar com s'han observat al microscopi la majoria dels criteris arquitecturals definits a la metodologia. Es veu com el cas 6 i el cas 7 mostren asimetria. El cas 6 més discreta que el 7, i aquest últim ha resultat maligne. Pel que fa al creixement Pagetoide, només se n'ha observat una lleugera tendència en el cas 8, el qual ha acabat sent negatiu. També es pot considerar que l'únic cas que ha presentat pleomorfisme ha estat el cas 9, i aquest criteri va ser un dels quals va ajudar a diagnosticar-lo histològicament com a melanoma. Un altre criteri, que s'observa en gairebé tots els casos, en més o menys mesura, són les cèl·lules en mitosi. Els dos casos que en presenten amb més abundància són el 7 i el 9, els quals s'han acabat diagnosticant com a malignes. Finalment, pel que fa a la maduració, només en presenten de manera molt lleu els casos 4, 5 i 6, tots ells negatius.

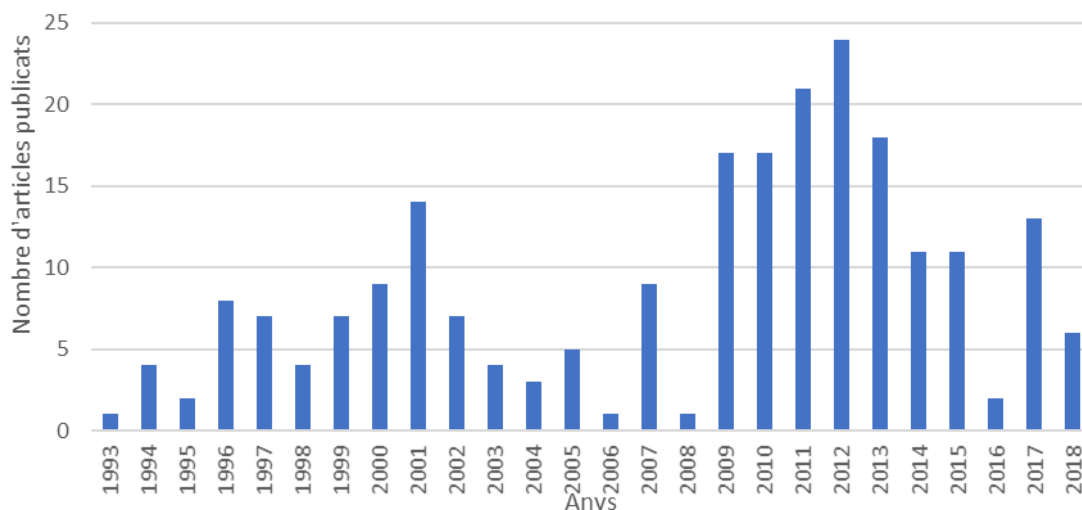
Pel que fa a l'estudi geogràfic, el mapa obtingut a partir dels hospitals on es duu a terme actualment la tècnica per al diagnòstic de melanoma és el següent:



**Figura 12:** Mapa de la distribució geogràfica d'Espanya on figuren els hospitals del país que fan servir la tècnica FISH per al diagnòstic de melanomes.

Cal destacar que hi ha algun hospital més que la va fer servir però actualment ja no i no s'han comptat per al mapa, com per exemple l'hospital Vall d'Hebron de Barcelona. També s'ha de tenir en compte que hi ha diverses universitats a tota Espanya que estan treballant i estudiant la tècnica, però al no ser hospitals tampoc s'han ressenyat.

Per altra banda, l'estudi bibliomètric referent als articles publicats arreu del món dona com a resultat el següent gràfic:



**Figura 13:** Gràfic on es reflecteixen un total de 226 estudis relacionats amb el seu any de publicació en tot el món que estan focalitzats a subratllar la importància del FISH en el diagnòstic de melanoma.

Aquests resultats reflecteixen que el 2012 es va crear el màxim interès entorn al FISH i les seves qualitats en distingir nevus de melanomes. També s’observa que és una tècnica força moderna, que fa relativament pocs anys que s’utilitza als hospitals, ja que el primer article trobat data de 1993, i que s’estan duent a terme estudis per a perfeccionar-la. És cert que els últims 5 anys sembla que s’ha perdut una mica l’interès en investigar sobre aquesta tècnica, ja que el nombre de publicacions ha disminuït.

## DISCUSSIÓ

---

Com s'ha esmentat anteriorment és molt important tenir en consideració que la feina d'un patòleg no és senzilla, un diagnòstic d'aquest tipus no és matemàtic. Existeix un punt de subjectivitat molt elevat que té en compte molts coneixements, casos anteriors i depèn sempre de la localització física del tumor i la manera com s'hagi obtingut la mostra a analitzar. El FISH millora molt aquesta situació però tampoc es pot considerar una tècnica objectiva. En el recompte de sondes per nucli s'ha de conèixer molt bé com funciona la tècnica, tenir en compte tipus de cèl·lules, solapaments entre elles i altres malalties que puguin generar uns resultats semblats.

Tenint en compte això es pot entendre com alguns dels casos que presentaven criteris arquitecturals malignes han resultat ser benignes i viceversa. S'ha de considerar, també, que aquests casos han estat escollits perquè se'ls ha realitzat un FISH, que és la tècnica que interessava estudiar en aquest projecte. Per tant, només pel simple fet que hagin arribat fins a un FISH ja vol dir que alguna cosa no es veia clara en les dues proves anteriors per a poder diagnosticar-los.

Gràcies a aquesta tècnica, per tant, no només s'han confirmat casos que semblaven positius, sinó que ha ajudat a sortir de dubtes en els casos de diagnòstic ambigu que han acabat sent negatius. Com, per exemple el cas 2, en el qual s'ha observat una atípia microscòpicament i la immunohistoquímica ha donat positiva en algunes zones, però FISH ha demostrat clarament que aquella lesió no es tractava d'un melanoma.

L'exemple del cas 7 és important per a aquest estudi ja que, sense la tècnica FISH, existia la possibilitat que s'hagués conclòs un diagnòstic erroni i s'hagués tractat com a benigne. És cert que en l'observació microscòpica s'han complert alguns criteris de malignitat, però, tenint en compte la subjectivitat que acompanya els estudis histològics, no s'ha vist un diagnòstic clar i s'ha fet directament un FISH, tècnica que ha confirmat la sospita del melanoma.

Un altre cas important a tenir en compte i que cal destacar és el 8. Al microscopi no ha presentat uns criteris arquitecturals preocupants, exceptuant una atípia de grau considerable en alguna zona, que és la característica que ha fet dubtar. Al realitzar la immunohistoquímica s'han observat cèl·lules amb el nucli marró, és a dir, en proliferació, en la unió dermo-epidèrmica, per la qual cosa no s'ha pogut confirmar que es tractés d'un cas negatiu. Finalment, FISH ha estat especialment determinant perquè ha permès confirmar amb seguretat la benignitat del tumor.

Si ens fixem en els resultats obtinguts, una altra dada que ens proporciona la Taula 2 és que en 5 dels 10 casos no s'ha realitzat immunohistoquímica abans de fer el FISH. En general, quan amb l'estudi microscòpic s'ha sospitat d'un diagnòstic de melanoma ja s'ha sol·licitat directament un FISH per a accelerar el procés i obtenir un resultat fiable i clar. S'ha de tenir en compte que darrere d'una mostra hi ha un pacient esperant a rebre una notícia que pot

suposar-li greus conseqüències. Això ha succeït en els tres melanomes, per tant, en general l'estudi microscòpic ja dona una idea del diagnòstic final, però la seva subjectivitat requereix d'una tècnica més ferma abans de donar notícies greus a un pacient, a no ser que aquest diagnòstic es vegi molt clar histològicament.

Tot i estar demostrat que és una tècnica tan important, en aquest projecte queda reflectit que no és molt emprada a Espanya, i un dels motius principals pot ser el preu de les sondes, ja que són molt cares, i la desconexió que es pot tenir encara dels seus avantatges, degut a que és una prova força moderna. A més, la situació econòmica actual que ha propiciat retallades en els pressupostos destinats a sanitat no ajuden a que els hospitals puguin innovar amb la implementació de noves tecnologies.

Una altra dada que ens transmet aquest estudi és que arreu del món aquesta tècnica va tenir molt ressò sobretot l'any 2012. S'observa, també, que des de llavors ha disminuït el nombre de publicacions referents a aquesta tècnica degut a que les característiques bàsiques per al seu ús ja estan implementades, però aquesta dada no en suggereix necessàriament un desinterès. FISH per al diagnòstic de melanomes cutanis va començar a estudiar-se a partir de 1993 com a solució pels casos ambigus en diversos Hospitals i Universitats. Des de llavors, s'han seguit estudiant els seus beneficis, i no només per a diagnosticar tumors cutanis sinó per a altres diverses aplicacions. Segons l'Associació Espanyola de la Genètica Humana, aquesta tècnica també és emprada arreu d'Espanya amb mostres com líquid amniòtic, medul·la òssia, sang perifèrica, altres tumors, vellositat coriònica i altres teixits.

En aquest projecte, com ja s'ha vist, s'ha treballat amb un nombre reduït de casos, fet que impedeix treure'n conclusions estadístiques significatives, però segons l'estudi realitzat per Vergier et al. (2010), es va demostrar que FISH té una eficiència del 91%, la qual podria ser encara més alta si no fos pels errors que es poden produir en els processos de fixació o hibridació. També es confirma que aquesta tècnica té una sensibilitat del 85%, un valor predictiu positiu del 89.5% i un valor predictiu negatiu del 86%.

## **ÈTICA I SOSTENIBILITAT**

Si es valora el projecte realitzat des del punt de vista ètic cal destacar que aquest projecte s'ha beneficiat de la necessitat de diagnosticar uns pacients per tal de realitzar-ne un estudi. A més, en cap cas s'ha sol·licitat cap prova extra a cap pacient per a interessos propis del treball.

També cal considerar com a criteri ètic molt important el fet que no s'han proporcionat en cap moment les dades personals dels pacients amb els quals s'ha treballat per tal de mantenir-ne la confidencialitat en tot moment.

Des del punt de vista de la sostenibilitat, tots els reactius emprats per a la metodologia del projecte han estat gestionats per l'Hospital Clínic Universitari de Barcelona de manera correcta. El tractament de residus s'ha realitzat segons els protocols del mateix hospital.



## CONCLUSIONS

---

FISH is a fundamental technique for the diagnosis of skin melanomas. Not only does it help to confirm cases that are more or less clear, but it solves those that can not be diagnosed exclusively with a microscopic or immunohistochemical studies. However, this technique has advantages and its disadvantages. It should be taken into account that skilled workers are required for all the steps of the technique: from the extraction of the sample, the entire process of hybridization of the probes, to the interpretation of the results and until the final diagnosis that receives the patient.

This project, is based in 10 experimental cases, all of them very difficult to diagnose exclusively with the microscopic and / or immunohistochemical study (excepting case 9). In fact, out of the 10 cases, only 3 have become malignant, therefore, FISH greatly reduces the diagnostic index of false positive and negative.

On the other hand, from the geographic and bibliometric study that have been carried out in the project, little use of the technique has been observed. Although, based on this study and others mentioned above, it is clear that is a decisive technique for the diagnosis. Therefore, it is considered that all hospitals in the world specialized in diagnosis of cutaneous tumors should be taken into account.

In conclusion, FISH should not only be a complementary technique to the microscopic and immunohistochemical studies of skin tumor samples. This project shows that it is the main tool to solve ambiguous cases and it is also very useful to reaffirm in a controversial diagnosis.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Adrienne L. Morey, Rajmohan Murali, Stanley W. McCarthy, Graham J. Mann, Richard A. Scolyer. (2009). Diagnosis of cutaneous melanocytic tumours by four-colour fluorescence in situ Hybridisation. *Pathology*, 41(4), 383–387.
- Asociación Española de Genética Humana (AEGH). Situación de la genética clínica en España. 1-80.
- Beatrice Vergier, Martina Prochazkova-Carlotti, Arnaud de la Fouchardière, Lorenzo Cerroni, Daniela Massi, Vincenzo De Giorgi, Christiane Bailly, Ulrich Wesselmann, Apollon Karlseidze, Marie-Francoise Avril, Thomas Jouary and Jean-Philippe Merlio. (2010). Fluorescence in situ hybridization, a diagnostic aid in ambiguous melanocytic tumors: European study of 113 cases. *Modern Pathology*, 1–11.
- David Weedon, Geoffrey Stratton. 2002. *Skin Pathology*, 1-958.
- Julie D. R. Reimann. (2012). Integrating Fluorescence in situ Hybridization and Genomic Array Results into the Diagnostic Workup of Melanoma, 1-14.
- Pedram Gerami, Susan S. Jewell, Larry E. Morrison, Beth Blondin, John Schulz, Teresa Ruffalo, Paul Matushek, Mona Legator, Kristine Jacobson, Scott R. Dalton, Susan Charzan, Nicholas A. Kolaitis, Joan Guitart, Terakeith Lertsbarapa, Susan Boone, Philip E. LeBoit, y and Boris C. Bastian. (2009). Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) as an Ancillary Diagnostic Tool in the Diagnosis of Melanoma. *Am J Surg Pathol*, 33, 1146–1156.
- P.R.Wheater, H.G.Burkitt, V.G.Daniels. (1979). *Histología funcional*, 1-277.
- Su J, Yu W, Liu J, Zheng J, Huang S, Wang Y, Qi S, Ma X, Chen J, Zhang Y. (2017). Fluorescence in situ hybridization as an ancillary tool in the diagnosis of acral melanoma: a review of 44 cases. *J.Pathol*, 49(7), 740-749.

## PÀGINES WEB CONSULTADES

- American Cancer Society. 2015. *Acerca del cáncer de piel tipo melanoma*. Recuperat de:  
<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-piel-tipo-melanoma/acerca/que-es-melanoma.html>
- Enciclopediasalud. 2016. *Definición de melanocito*. Recuperat de:  
<http://www.enciclopediasalud.com/definiciones/melanocito>

- Parc de Salut Mar. 2006. *Nevus melanocíticos*. Recuperat de:  
[http://www.parcdesalutmar.cat/dermatologia/informacio-malalties/es\\_nevus.html](http://www.parcdesalutmar.cat/dermatologia/informacio-malalties/es_nevus.html)