

## Análisis morfométrico y contenido de ADN en el nevo displásico. Estudio comparativo frente a otras lesiones melanocíticas benignas

Beatriz Llombart<sup>a,b</sup>, Amparo Ruiz-Saurí<sup>a</sup>, Carlos Monteagudo<sup>a</sup>, Pilar Soriano<sup>a</sup>, José A. López-Guerrero<sup>a</sup>, Encarna Montesinos<sup>b</sup>, Esperanza Jordá<sup>b</sup> y Antonio Llombart<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínico Universitario. Valencia. España.

<sup>b</sup>Servicio de Dermatología. Hospital Clínico Universitario. Valencia. España.

**Resumen.**—*Introducción.* En 1978 se describió el nevo displásico como lesión con aumento del riesgo de melanoma, pero el significado del nevo displásico como precursor de melanoma es controvertido. Numerosos investigadores han intentado correlacionar la presencia de nevo displásico con un tipo específico de fenotipo y genotipo que incluyera la presencia de contenido anormal de ADN.

*Objetivo.* Comparar el contenido de ADN y la morfometría nuclear del nevo displásico con el de lesiones melanocíticas benignas. Mediante una técnica de análisis de imagen se buscó medir de una manera objetiva (cuantitativa) las atipias citológicas que se observan de manera subjetiva en el estudio histológico del nevo displásico.

*Material y métodos.* Se determinó el área nuclear, el factor de forma y el contenido de ADN de 52 lesiones melanocíticas: 8 nevos de unión, 10 nevos compuestos, 10 nevos intradérmicos, 21 nevos displásicos y 3 casos de melanoma como control. Los estudios morfométricos y citométricos se llevaron a cabo mediante un sistema de análisis de imagen CUE-2 (Olympus).

*Resultados.* Todos los casos fueron diploides, con la excepción de 2 nevos displásicos, 2 nevos intradérmicos y 3 melanomas. El factor de forma nuclear fue el mejor para diferenciar el nevo displásico del resto de lesiones melanocíticas benignas, de manera estadísticamente significativa. No se encontraron diferencias morfométricas entre los nevos displásicos familiares y/o múltiples y los esporádicos.

*Conclusión.* Los cambios citológicos nucleares observados en los nevos displásicos con la morfometría se superponen, en general, a los apreciados en las restantes lesiones melanocíticas benignas estudiadas, excepto el factor de forma nuclear, que en los nevos displásicos es más irregular.

**Palabras clave:** nevo displásico, morfometría, ADN, citometría de imagen.

## MORPHOMETRIC ANALYSIS AND DNA CONTENT IN DYSPLASTIC NEVI. COMPARATIVE STUDY WITH OTHER BENIGN MELANOCYTIC LESIONS

**Abstract.**—*Introduction.* The «dysplastic nevus» (DN) was described in 1978. This lesion is associated with an increased risk of melanoma, but the significance of DN as a precursor of melanoma is controversial. Numerous researchers have tried to correlate the presence of DN with a specific type of phenotype and genotype that would include the presence of abnormal DNA content.

*Objective.* To compare the DNA content and the nuclear morphometry of DN with that of benign melanocytic lesions. Through an image analysis technique, we sought to measure, in an objective (quantitative) manner, the cytological atypia we observed in a subjective manner in the histological study of the DN.

*Material and methods.* The nuclear area, shape factor and DNA content of 52 melanocytic lesions were determined: 8 junctional nevi, 10 compound nevi, 10 intradermal nevi, 21 DN and 3 cases of melanoma as a control. The morphometric and cytometric studies were carried out using a CUE-2 (Olympus) image analysis system.

*Results.* All of the cases were diploid, with the exception of 2 DN, 2 interdermal nevi and the 3 melanomas. The nuclear shape factor was the best discriminant in differentiating DN from the rest of benign melanocytic lesions, as it was statistically significant. We did not find morphometric differences between familial and/or multiple DN and sporadic ones.

*Conclusion.* The nuclear cytological changes observed in the DN with morphometry generally overlap those seen in the rest of the benign melanocytic lesions studied, except the nuclear shape factor, which is more irregular in the DN.

**Key words:** dysplastic nevus, morphometry, DNA, image cytometry.

## INTRODUCCIÓN

Desde 1978, y a lo largo de la década de los años 1980, se describieron unos rasgos clinicopatológicos de un síndrome hereditario familiar, caracterizado

por la presencia de nevos melanocíticos múltiples asociados a la aparición de melanomas malignos, de los que en ocasiones dichos nevos eran precursores. Inicialmente recibió los nombres de síndrome de B-K y de síndrome del nevo displásico<sup>1-4</sup>. Posteriormente se documentaron lesiones esporádicas similares<sup>5-6</sup>. Se admitió entonces que estos nevos displásicos podían ser esporádicos y que afectaban al 5-20 % de la población general<sup>7</sup>. Aunque el criterio diagnóstico de nevo displásico fuera en principio fundamentalmente clínico, pronto se sumaron caracterizaciones histológicas, tanto de tipo arquitectural como basadas

### Correspondencia:

Beatriz Llombart. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínico Universitario de Valencia. Avda. Blasco Ibáñez, 17. 46010 Valencia. España. beatrizllombart@hotmail.com

Recibido el 15 de julio de 2003.

Aceptado el 21 de octubre de 2003.

en la atipia celular<sup>8-18</sup>. A pesar de ello, los criterios histológicos siguen siendo controvertidos<sup>19-23</sup> y no son suficientemente reproducibles. El concepto de atipia nuclear/celular, que es la base de este diagnóstico, está en buena parte sujeto a criterios personales y por sí mismo no es suficiente para el diagnóstico. Estudios de Pozo et al<sup>24</sup> han tratado de objetivar estos criterios histológicos, cuantificándolos en grados.

El presente estudio es un intento de profundizar en el mejor conocimiento del nevo displásico, midiendo mediante técnicas de morfometría y citometría estática el área nuclear, el factor de forma nuclear y la ploidía, comparativamente en un grupo de lesiones melanocíticas no atípicas frente a un grupo de nevos displásicos, diagnosticados histológicamente. El objetivo es la búsqueda de posibles diferencias morfométricas o citométricas entre los nevos displásicos y los nevos melanocíticos comunes. Tratamos, mediante una técnica de análisis de imagen, de medir de una manera objetiva (cuantitativa) las atipias citológicas que observamos de una manera subjetiva (cualitativa) en el estudio histológico del nevo displásico. La existencia de células aneuploides favorecería posiblemente el criterio de lesión precancerosa, dado que la inestabilidad génica es uno de los factores fundamentales asociados a la transformación maligna<sup>25</sup>.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Nuestro estudio incluyó 52 casos de lesiones melanocíticas: 28 nevos convencionales (8 nevos de unión, 10 nevos compuestos y 10 nevos intradérmicos), 21 nevos displásicos y 3 melanomas como control. Estas lesiones se diagnosticaron íntegramente en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario de Valencia (HCUV) en el año 1999, procedentes del

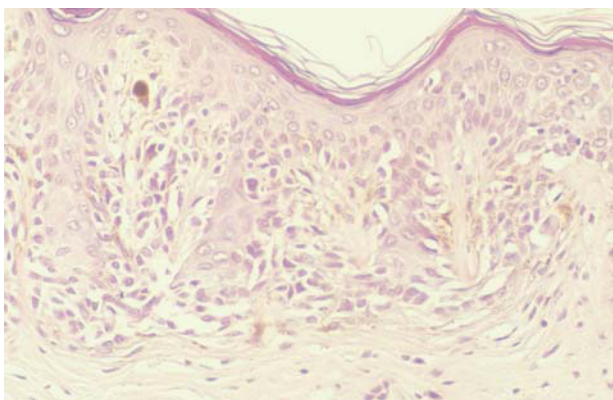


Fig. 1.—Presencia de nidos de unión, con ejes paralelos a la superficie y formación de puentes entre crestas epidérmicas. Existencia de melanocitos aislados con núcleos más grandes, irregulares y con nucleolo prominente. (Hematoxilina-eosina,  $\times 400$ .)

Servicio de Dermatología del mismo hospital. Los casos se seleccionaron retrospectivamente desde el diagnóstico histológico de manera consecutiva y aleatoria, exceptuando los casos de nevo displásico que se seleccionaron en función de la historia clínica y la histología.

Los nevos displásicos se clasificaron en dos grupos. Se denominaron familiares y/o múltiples cuando presentaban clínicamente más de 50 lesiones melanocíticas con diagnóstico histológico de al menos dos nevos. De los 11 casos incluidos en este grupo, siete presentaban además historia familiar de nevos displásicos o melanomas. Por otro lado, los 10 casos restantes fueron denominados esporádicos.

En la selección histológica de nevo displásico se utilizaron todos los siguientes criterios:

1. Presencia de nidos de unión, de forma y tamaño variables, con ejes mayores paralelos a la superficie y tendencia a la formación de «puentes» entre crestas epidérmicas adyacentes.
2. Nevos compuestos en los que el componente melanocítico epidérmico se extiende lateralmente en mayor medida que el intradérmico, hallándose este último confinado a la dermis papilar.
3. Presencia de atipia nuclear (núcleos grandes, irregulares e hiper cromáticos) en algunos melanocitos dispersos, en los nidos del componente de unión.
4. En caso de encontrarse melanocitos solitarios atípicos, éstos deben estar localizados en los estratos basales epidérmicos.
5. Existencia de fibroplasia laminar concéntrica en la dermis papilar.
6. Presencia de infiltrado linfocitario superficial independientemente de su intensidad y aumento de la vascularización de la dermis papilar.

Los estudios se llevaron a cabo sobre material fijado en formol tamponado al 10 % e incluidos posteriormente en parafina. Cada bloque se acompañó de dos cortes histológicos de 3  $\mu\text{m}$  de espesor, teñidos con la técnica convencional de hematoxilina-eosina (HE) (fig. 1).

## Análisis de imagen: morfometría y contenido de ADN

Los estudios cuantitativos (morfométricos y citométricos) se llevaron a cabo mediante el sistema de análisis de imagen CUE-2 (Olympus, Tokyo, Japan). El sistema se compone de un ordenador, un procesador digital de imágenes, una cámara CCD y un monitor de vídeo que se adapta a un microscopio Olympus modelo BH-2 con un filtro de interferencia de 436 nm para mejorar el contraste. Se realizó el estudio con la tinción de Feulgen. En cada caso se determinó la media del área nuclear, el factor de forma y el contenido de ADN con la medición de al

menos 150 núcleos. Como control interno de referencia se midieron 25 linfocitos de cada lesión. El área nuclear hace referencia al área comprendida por el trazo que delimita la estructura nuclear. El factor de forma determina la aproximación de la forma del núcleo a las estructuras circulares o elipsoidales, siendo el valor máximo igual a 1 para círculos o elipses y menor de 1 para otro tipo de estructuras. La evaluación del contenido de ADN en los histogramas se valoró según los criterios definidos por Böcking et al<sup>26</sup>, recogidos en la reunión de métodos en patología cuantitativa. El pico máximo se valoró como diploide cuando presentaba un índice de ADN menor de 1,1 y tetraploide si estaba entre 1,9 y 2,1. Otros picos máximos representativos se clasificaron como aneuploides.

**Métodos estadísticos**

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS/PC (VP10). Para comparar varios grupos de datos cuantitativos se empleó el test no paramétrico de Kurskall-Wallis ( $KW\chi^2$ ) ANOVA. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con un valor de  $p < 0,05$ .

**RESULTADOS**

**Estudio descriptivo de casos**

Se examinaron un total de 9.300 núcleos correspondientes a un total de 52 casos. Los 8 casos

de nevos de unión evaluados pertenecían a 8 pacientes diferentes. La media de su área nuclear fue de  $26,08 \mu\text{m}^2$  (tabla 1), si bien se obtuvieron valores extremos entre  $17,8$  y  $24 \mu\text{m}^2$ . La media del factor de forma nuclear fue de  $0,62$  (tabla 1) y también presentó variaciones entre  $0,54$  y  $0,74$ , coincidiendo con las variaciones del área antes señaladas. Todos presentaron un carácter homogéneo con un contenido de ADN diploide.

Los 10 casos de nevos compuestos pertenecían a 10 pacientes. La media del área nuclear fue de  $28,79 \mu\text{m}^2$  y la media del factor de forma de  $0,64$ . En el 100 % de los casos se presentó un índice de ADN diploide (tabla 1).

Los 10 nevos intradérmicos correspondían a 8 pacientes. La media del área nuclear fue de  $30,63 \mu\text{m}^2$  y la media del factor de forma de  $0,7$ . Ocho casos presentaron un índice de ADN diploide y 2 casos un índice aneuploide (tabla 1). Ambos casos pertenecían a diferentes pacientes. En los 2 casos aneuploides se revisó la histología confirmándose el carácter típico del nevo intradérmico.

La media del área nuclear de todos los nevos displásicos fue de  $29,36 \mu\text{m}^2$  y la media del factor de forma de  $0,57$  (tabla 1). La media del área nuclear de los nevos displásicos múltiples y/o familiares fue de  $29,18 \mu\text{m}^2$  y la media del factor de forma de  $0,57$  (tabla 2). Los 10 nevos esporádicos presentaron una media del área nuclear de  $29,56 \mu\text{m}^2$  y una media del factor de forma de  $0,57$  (tabla 2). Por otro lado, de los 21 casos de nevos displásicos, 19 fueron diploides y 2 casos presentaron un índice de ADN aneuploide. Sin embargo, paradójicamente, ambos

**TABLA 1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE MORFOMETRÍA Y CITOMETRÍA**

	<i>N.º de casos</i>	<i>Área nuclear (media ± DE [<math>\mu\text{m}^2</math>])</i>	<i>Factor de forma (media ± DE)</i>	<i>Ploidía</i>
Nevo de unión común	8	$26,08 \pm 4,714$	$0,62 \pm 0,082$	Diploides
Nevo compuesto común	10	$28,79 \pm 4,968$	$0,64 \pm 0,087$	Diploides
Nevo intradérmico común	10	$30,63 \pm 3,247$	$0,7 \pm 0,057$	Diploides: 8 Aneuploides: 2
Nevo displásico	21	$29,36 \pm 5,519$	$0,57 \pm 0,570$	Diploides: 19 Aneuploides: 2
Melanoma	3	$48,56 \pm 5,519$	$0,476 \pm 0,078$	Aneuploides

DE: desviación estándar.

**TABLA 2. DIFERENCIAS ENTRE EL NEVO DISPLÁSICO ESPORÁDICO Y EL NEVO DISPLÁSICO MÚLTIPLE Y/O FAMILIAR**

	<i>Número de casos</i>	<i>Área nuclear (media) (<math>\mu\text{m}^2</math>)</i>	<i>Factor de forma (media)</i>	<i>Ploidía</i>
Nevo displásico esporádico	10	$29,56 \pm 6,791$	$0,57 \pm 0,14$	Diploides: 2 Aneuploides: 8
Nevo displásico familiar y/o múltiple	11	$29,18 \pm 3,047$	$0,57 \pm 0,052$	Diploides

casos pertenecían al grupo de los nevos displásicos esporádicos (tabla 2).

Como control interno del estudio se midieron 3 melanomas, 2 casos con un Breslow inferior a 0,75 mm y uno superior a 0,75 mm (1,4 mm). Los tres melanomas presentaron un índice de ADN aneuploide (un tetraploide y dos aneuploides). La media del área nuclear fue de 48,56  $\mu\text{m}^2$  y la media del factor de forma de 0,48  $\mu\text{m}^2$  (tabla 1).

### Estudio comparativo de los casos

#### Área nuclear

Encontramos un ligero aumento en la media del área nuclear de los nevos displásicos (29,36  $\mu\text{m}^2$ ) con respecto a los nevos de unión (26,08  $\mu\text{m}^2$ ) y a los nevos compuestos (28,79  $\mu\text{m}^2$ ) (tabla 1), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa (fig. 2). No encontramos diferencias en el área nuclear entre los nevos displásicos esporádicos y los familiares o múltiples (tabla 2). Sin embargo, sí que existen diferencias notables al comparar la media del área nuclear de los nevos de unión con la de los nevos displásicos de unión (tabla 3), pero el número reducido de casos hace que el estudio no sea significativo.

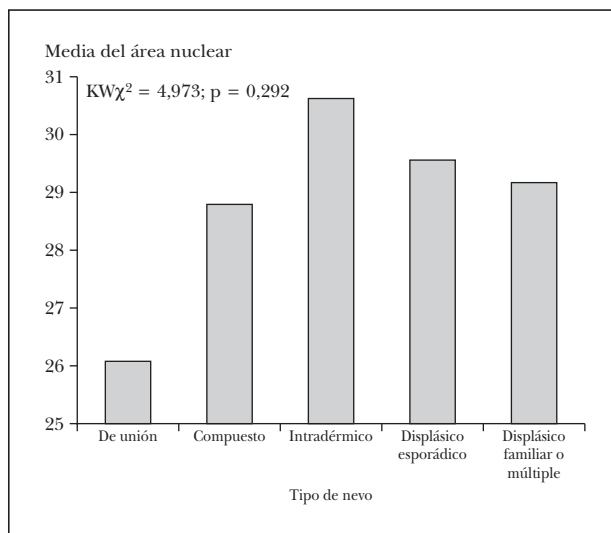


Fig. 2.—Media del área nuclear de las lesiones melanocíticas estudiadas.

#### Factor de forma

Al valorar la media del factor de forma nuclear se aprecia una tendencia constante en las lesiones melanocíticas benignas: el nevo de unión presenta un factor de forma nuclear más irregular (0,62) que el nevo compuesto (0,64) y el nevo intradérmico es el más regular (0,7) (tabla 1). Los nevos displásicos presentan un núcleo más irregular (0,57) que el resto de las lesiones melanocíticas benignas. Por tanto, la forma del núcleo es discriminante para diferenciar el nevo displásico del resto de lesiones melanocíticas benignas, con significación estadística ( $p < 0,007$ ) (fig. 3). Estas diferencias son mayores al comparar el nevo de unión con los nevos displásicos de unión (tabla 3), pero es necesario para un mayor número de casos confirmar este hecho. No hemos encontrado diferencias en la forma nuclear entre los nevos displásicos esporádicos y los familiares y/o múltiples (tabla 2).

#### Ploidía

Todas las lesiones melanocíticas fueron diploides, exceptuando dos nevos intradérmicos, dos displásicos y los tres melanomas (tabla 1). La revisión histológica de los 2 casos de nevos intradérmicos aneuploides

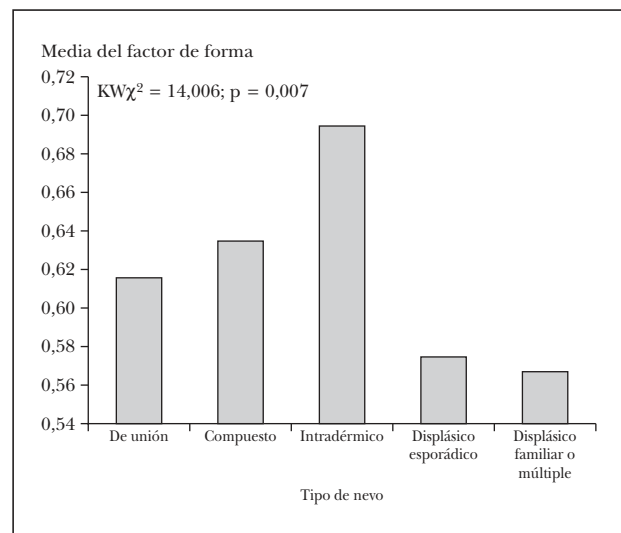


Fig. 3.—Media del factor de forma nuclear de las lesiones melanocíticas estudiadas. Los nevos displásicos presentan un núcleo más irregular, con significación estadística ( $p < 0,05$ ).

**TABLA 3.** DIFERENCIAS ENTRE NEVOS DE UNIÓN

	Número de casos	Área nuclear (media) ( $\mu\text{m}^2$ )	Factor de forma (media)	Ploidía
Nevo de unión común	8	26,08	0,62	Diploides
Nevo displásico de unión	2	38,7	0,33	Diploides

mostró multinucleación en la zona superior de la dermis papilar, que estructuralmente podría justificar la aneuploidía.

Los dos nevos displásicos aneuploides presentaban histológicamente gran atipia citológica, siendo uno de ellos de unión y otro un compuesto (tablas 3 y 4). Sin embargo, ambos casos pertenecían al grupo de los nevos displásicos esporádicos (tabla 2). La figura 4 representa un ejemplo de las tres determinaciones efectuadas en cada caso del estudio.

### DISCUSIÓN

El concepto de nevo displásico ha sido un tema controvertido desde el primer artículo escrito por

Clark et al<sup>1</sup> en 1978. El debate continúa dada la necesidad de reconocer esta lesión por su supuesta relación, como precursor y marcador de riesgo, con el melanoma<sup>27,28</sup>. Existe, por una parte, discrepancia entre el diagnóstico clínico e histológico, encontrándose nevos clínicamente atípicos con histología de nevos comunes y, por el contrario, nevos clínicamente no atípicos con histología de nevos displásicos. Por otra parte, existe una serie de criterios histológicos diagnósticos de esta entidad, caracterizados por cambios arquitecturales y citológicos<sup>8-18</sup>. Sin embargo, no parece existir un consenso en la utilización de estos criterios<sup>19-23</sup>. La mayor dificultad radica en obtener reproducibilidad intraobservador e interobservador en el diagnóstico de la atipia citológica. En este sentido, el estudio

**TABLA 4. DIFERENCIAS DE LOS NEVOS COMPUESTOS**

	Número de casos	Área nuclear (media) ( $\mu\text{m}^2$ )	Factor de forma (media)	Ploidía
Nevo compuesto común	10	28,79	0,64	Diploides
Nevo displásico compuesto	19	29,3	0,57	Diploides: 18 Aneuploide: 1

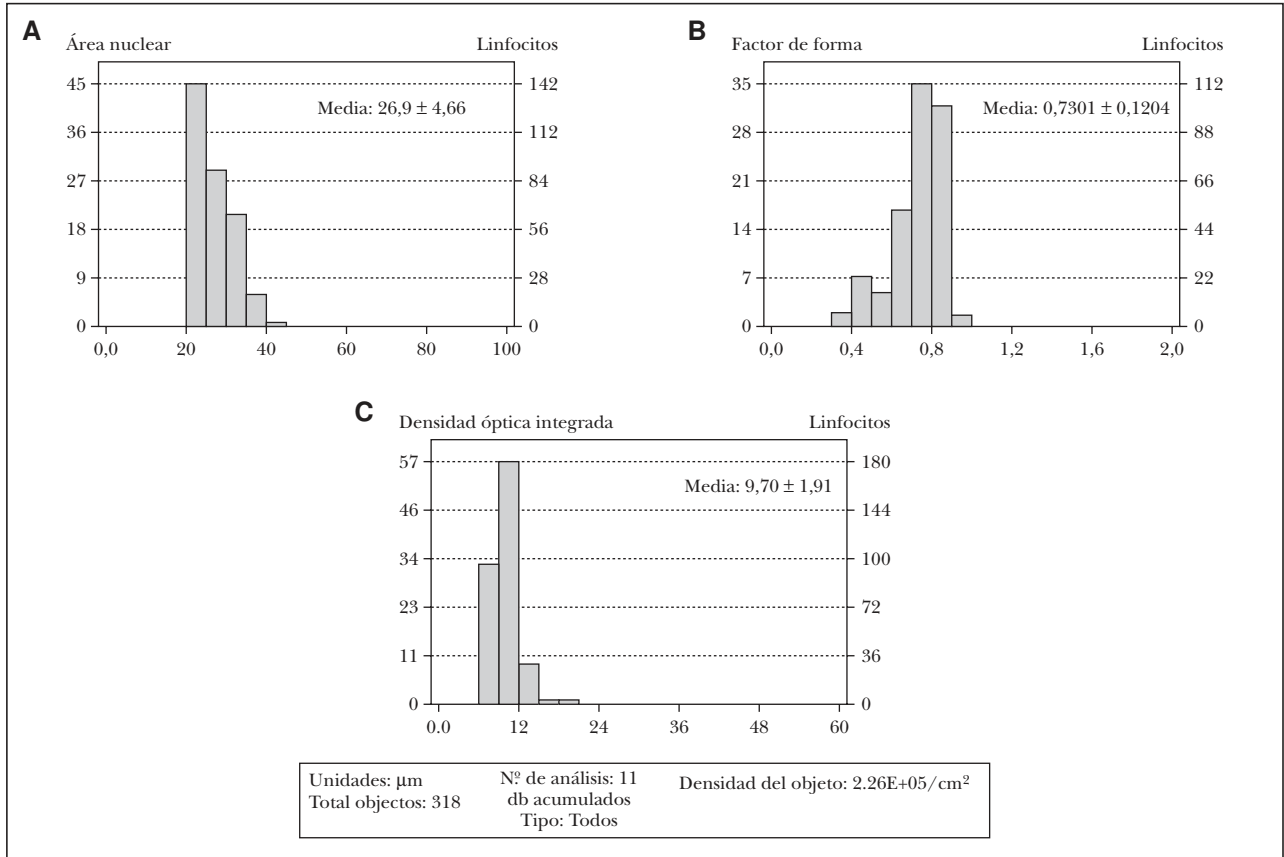


Fig. 4.—Histograma representativo del área nuclear (A), factor de forma (B), densidad óptica integrada (C).

morfométrico representa una manera objetiva (cuantitativa) de valorar la atipia citológica que se observa en el estudio histológico.

En nuestro trabajo seleccionamos un grupo variado de nevos displásicos, incluidas lesiones con grados variables de atipia nuclear. La morfometría se realizó seleccionando las zonas más atípicas de la unión dermoepidérmica y parte superior de la dermis papilar. Todos los nevos displásicos presentaron un ADN diploide, excepto 2 casos aneuploides que correspondían histológicamente con los de mayor atipia citológica. Estos resultados coinciden con lo publicado previamente en la literatura médica<sup>29-38</sup>, pues la inmensa mayoría de nevos displásicos son diploides. Por tanto, el índice de ADN no permite diferenciar el nevo displásico de las diferentes lesiones melanocíticas benignas estudiadas. El hallazgo ocasional de aneuploidía en la citometría de los nevos displásicos es similar al que se aprecia en otras lesiones melanocíticas benignas del estudio. Revisando la histología de los 2 casos aneuploides de nevos intradérmicos encontramos multinucleación de las células en la zona superior de la dermis papilar, que estructuralmente podría justificar esta aneuploidía.

Los 3 casos de melanoma utilizados como control en este estudio fueron aneuploides: 2 casos presentaban un Breslow inferior a 0,75 mm y un caso superior a 0,75 mm. Sin embargo, en la literatura no todos los melanomas son aneuploides. Bojörnhamen et al<sup>35</sup> encontraron aneuploidías en el 50 % de los melanomas de Breslow inferior a 0,8 mm frente a un 91 % de melanomas metastásicos, aunque no existe una correlación entre la aneuploidía y el grosor del melanoma.

En nuestro estudio, el factor de forma nuclear de los nevos displásicos fue más irregular que el de las lesiones melanocíticas benignas estudiadas, y este parámetro fue estadísticamente significativo (fig. 3). Por tanto, el factor de forma nuclear fue el único discriminante para diferenciar el nevo displásico del resto de lesiones melanocíticas benignas. En 1999, Williams et al<sup>37</sup> realizaron un estudio de 120 lesiones melanocíticas (30 nevos displásicos, 30 melanomas y 60 nevos comunes) y encontraron que el factor de forma y el área nuclear eran los mejores parámetros para diferenciar los nevos displásicos de los comunes, y con estos valores se pueden clasificar correctamente hasta un 74,4 % de casos. Sin embargo, al igual que nosotros, otros autores<sup>36</sup> encuentran un área nuclear parecida en los nevos displásicos y los comunes (fig. 2). Otro dato llamativo del estudio ha sido la ausencia de diferencias morfométricas entre los nevos displásicos esporádicos y los familiares y/o múltiples. Estos datos coinciden con los obtenidos en otros estudios llevados a cabo por autores como Fleming y Friedman<sup>33</sup> y Sanguenza et al<sup>34</sup>.

Podemos concluir que tanto el área nuclear como el contenido de ADN, medidos por morfometría y citometría estática, son similares en los nevos displásicos y los comunes. Sin embargo, nuestros resultados apoyan el valor del factor de forma nuclear como discriminante entre el nevo displásico y el resto de lesiones melanocíticas benignas.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Clark WH Jr, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions: The BK mole syndrome. *Arch Dermatol* 1978;114:732-8.
2. Lynch HT, Frichot BC III, Lynch JF. Familial atypical multiple mole-melanoma syndrome. *J Med Genet* 1978;15: 352-6.
3. Reimer RR, Clark WH Jr, Greene MH, et al. Precursor lesions in familial melanoma. A new genetic preneoplastic syndrome. *JAMA* 1978;114:744-6.
4. Elder DE, Goldman LI, Goldman SC, Green MH. Dysplastic nevus syndrome. A phenotypic association of sporadic cutaneous melanoma. *Cancer* 1980;46:1787-94.
5. Rahbari H, Mehregan AH. Sporadic atypical mole syndrome. A report of five nonfamilial BK mole syndrome-like cases and histopathologic findings. *Arch Dermatol* 1981; 117:329-31.
6. Halpern AC, Gerry D IV, Elder DE, et al. Dysplastic nevi as risk markers of sporadic (non-familial) melanoma: A case-control study. *Arch Dermatol* 1991;127:995-9.
7. Elder DE, Clark WH Jr, Elenitsas R. The early and intermediate precursor lesions of tumor progression in the melanocytic system: Common acquired nevi and atypical (dysplastic) nevi. *Semin Diagn Pathol* 1983;10:18.
8. Elder DE, Greene MH, Guerry D IV, Kramer KH, Clark WH Jr. The dysplastic nevus syndrome: Our definition. *Am J Dermatol* 1982;4:455-60.
9. Clemente C, Cochran AJ, Elder DE, Frcpa C, Levene A, Mackie RN, et al. Histopathologic diagnosis of dysplastic nevi: Concordance among pathologists convened by the World Health Organization Melanoma Programme. *Hum Pathol* 1991;22:313-9.
10. Barnhill RL, Roush GC, Duray PH. Correlation of histologic architectural and cytoplasmic features with nuclear atypia in atypical (dysplastic) nevocytic nevi. *Hum Pathol* 1990;21:51-8.
11. Duncan LM, Berwick M, Bruinjn JA, Byers HR, Mihm MC, Barnhill RL. Histopathologic recognition and grading of dysplastic melanocytic nevi: An interobserver agreement study. *J Invest Dermatol* 1993;100:318S-21S.
12. Halpern AC, Guerry D IV, Elder DE, Trock B, Synnestvedt M, Humphreys T. Natural history of dysplastic nevi. *J Am Acad Dermatol* 1993;29:51-7.
13. Barnhill RL. Pathology of melanocytic nevi and malignant melanoma. Boston: Butterworth-Heinemann, 1995; p. 169-95.
14. McKee PH. Pathology of the skin with clinical correlations. 2<sup>nd</sup> ed. London: Morby-Wolfe, 1996; p. 13.1-13.45.
15. Elder De, Elenitsas R. Benign pigmented lesions and malignant melanoma. En: Elder DE, Elenitsas R, Jaworsky

- Ch, Jonson B Jr, editors. *Lever's histopathology of the skin*. 8th ed. Philadelphia: Lippicott-Raven, 1997; p. 625-84.
16. Maize JC, Burgdorf WHS, Hurt MA, LeBoit PE, Metcalf JS, Smith T, et al. *Cutaneous pathology*. Philadelphia: Churchill Livingstone, 1998; p. 641-714.
  17. Weedon D. *Skin pathology*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2002; p. 819-21.
  18. Murphy GF, Mihm MC. Recognition and evaluation of cytological dysplasia in acquired melanocytic nevi. *Hum Pathol* 1999;30:506-612.
  19. Piepkorn M, Meyer LJ, Goldgar D, Seuchter SA, Cannon-Albright LA, Skolinck MH, et al. The dysplastic melanocytic nevus. A prevalent lesion that correlates poorly with clinical phenotype. *J Am Acad Dermatol* 1989;20:407-15.
  20. Ackerman AB, Mihava I. Dysplasia, dysplastic melanocytes, dysplastic nevi, the dysplastic nevus syndrome and the relation between dysplastic nevi and malignant melanomas. *Human Pathol* 1985;16:87-91.
  21. Piepkorn M. Whither the atypical (dysplastic) nevus? *Am J Clin Pathol* 2001;115:177-9.
  22. Murphy GF, Mihm MC Jr. Recognition and evaluation of cytological dysplasia in acquired melanocytic nevi. *Hum Pathol* 1999;30:506-12.
  23. Sánchez Yus E, Rueda M, Simón RS, del Cerro M, Herrera M. El nevo melanocítico displásico, 24 años después: existe, pero no es displásico. *Actas Dermosifiliogr* 2002;93: 289-309.
  24. Pozo L, Naase M, Cerio R, Blanes A, Díaz-Cano SJ. Critical analysis of histologic criteria for grading atypical (dysplastic) melanocytic nevi. *Am J Clin Pathol* 2001;15: 194-204.
  25. Marx J. Debate surges over the origins of genomic defects in cancer. *Science* 2002;297:544-6.
  26. Böcking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of the european society for analytical cellular pathology task force on standardization of diagnostic DNA Image Cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1995;17:1-17.
  27. Rhodes AR, Harris TJ, Day CL, Mihm MJ Jr, Fitzpatrick TB, Sober AJ. Dysplastic melanocytic nevi in histologic association with 234 primary cutaneous melanomas. *J Am Acad Dermatol* 1983;15:563-74.
  28. Tucker MA, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Elder DE, Sagabiel RW, et al. Clinically recognized dysplastic nevi: A central risk factor for cutaneous melanoma. *JAMA* 1997; 14:1439-44.
  29. Bergan W, Ruiter DJ, Scheffer E, Van Vloten WA. Melanocytic atypia in dysplastic nevi. *Cancer* 1988;61:1660-6.
  30. Fleming MG, Wied GL, Dytch HE. Imagen analysis cytometry of dysplastic nevi. *J Invest Dermatol* 1990;95:287-91.
  31. Kamino H, Kiryu H, Ratech H. Small malignant melanomas: Clinicopathologic correlation and DNA ploidy analysis. *J Am Acad Dermatol* 1990;22:1032-8.
  32. Sanguenza OP, Hyder DM, White CR Jr, Pallander J, Perkins M, Remple N, et al. Comparison of imagen analysis with flow cytometry for DNA content analysis in pigmented lesions of skin. *Anal Quant Cytol Histol* 1992;14:55-9.
  33. Fleming MG, Friedman RD. Multiparametric image cytometry of nevi and melanomas. *Am J Dermatopathol* 1993; 15:106-13.
  34. Sanguenza OP, Hyder DM, Bakke AC, White CR. DNA determination in dysplastic nevi. A comparative study between flow cytometry and image analysis. *Am J Dermatopathol* 1993;15:99-105.
  35. Bojörnhagen V, Bonfoco E, Brahme EM, Lindholm J, Auer G. Morphometric, DNA, and proliferating cell nuclear antigen measurements in benign melanocytic lesions and cutaneous malignant melanoma. *Am J Dermatopathol* 1994;16:615-23.
  36. Schimegelow P, Schroiff R, Breitbart E, Bahnesen J, Lindner J, Janner M. Malignant melanoma: Its precursors and its topography of proliferation. DNA-Feulgen-cytometry and mitosis index. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 1996;409: 47-59.
  37. Williams RA, Baak JPA, Meijer GA, Chariton IG. DNA ploidy and nuclear morphometry for the classification of dysplastic nevi. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21:437-44.
  38. Pilch H, Gunzel S, Schaffer U, Tanner B, Heine M. Evaluation of DNA ploidy and degree of DNA abnormality in benign and malignant melanocytic lesions of the skin using video imaging. *Cancer* 2000;88:1370-7.